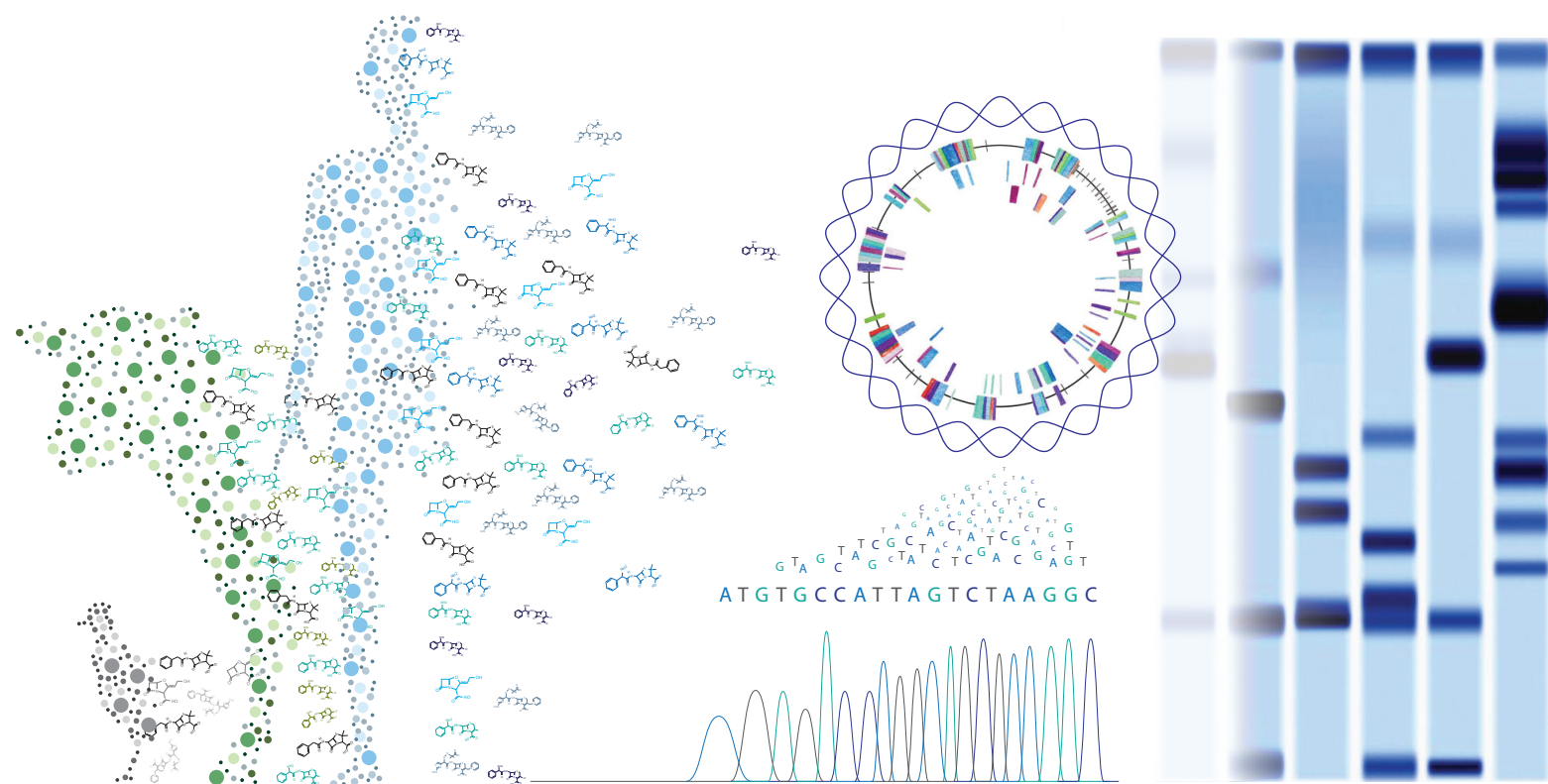


# REZISTENCE ENTEROBAKTERIÍ KE KLINICKY VÝZNAMNÝM ANTIBIOTIKŮM

Molekulární epidemiologie a úloha mobilních  
genetických elementů



Monika Dolejská

# REZISTENCE ENTEROBAKTERÍ KE KLINICKY VÝZNAMNÝM ANTIBIOTIKŮM

Mobilní genetické elementy v šíření rezistence  
k beta-laktamům a chinolonům

habilitační práce

Monika Dolejská

2016

Questo lavoro è dedicato a un grande uomo M. M.  
Grazie per il tuo amore, il tuo sostegno e la tua amicizia!

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mě náročnou cestou vědce provází. V první řadě děkuji dvěma důležitým osobám, které považuji za své mentory. Stojí při mně od počátku mé vědecké dráhy, dávají mi prostor k seberealizaci v oboru a pomáhají razit cestu k cíli. Tímto děkuji prof. MVDr. Aloisu Čížkovi, CSC. který mě už jako studentku mikrobiologie na Přírodovědecké fakultě k tématu antibiotické rezistence přivedl, za jeho podporu především v těžkých časech a otcovský přístup. Můj velký dík patří prof. MVDr. Ivanu Literákovi, CSc. za personální a finanční podporu a znamenitou organizaci našich výzkumných aktivit, které umožnily rozvoj naší „rezistentní rodiny“. Díky jeho expedicím po světě a zahraničním kontaktům jsem byla zavazena cenným materiálem pro experimentální práci.

Obrovský dík patří všem mým kolegům a studentům nejen za jejich skvělou a tvrdou práci a nepostradatelnou pomoc při řešení výzkumných projektů, ale také za jejich přátelství a pochopení pro velké požadavky, které jsou na ně kladeny. Bez nich bych nemohla tuto habilitační práci oživit takovým množstvím příloh našich vědeckých výstupů. Děkuji tímto Ivě Jamborové, Hance Dobiášové, Dáši Taušové, Katce Albrechtové, Ivu Papouškovi, Martině Masaříkové, Daně Halové, Ludmile Kohoutové, Evě Suchanové, Janě Hofírkové, Marii Slavíkové, Martě Křenové a mnoha dalším, se kterými mám nebo jsem měla tu čest spolupracovat.

Zvláštní poděkování patří také mým zahraničním kolegům, kteří mě posunuli výrazně kupředu. Mezi ně patří má „vědecká máma“ Alessandra Carattoli, která mě zasvětila do světa plazmidů. Vážím si jejího přátelství, odborných rad a podpory v práci i osobním životě. Děkuji také kolegům z Kodaně, kde jsem měla možnost strávit nějaký čas a seznámit se s novými technikami a vědeckými přístupy.

Děkuji také Ivě Kutilové a Jarce Laušové za pomoc s přípravou podkladů k habilitačnímu řízení a jazykovou korekturu textu. Za kritické čtení rukopisu, cenné připomínky a rovněž za plodnou spolupráci děkuji kolegovi a drahému příteli Jardovi Hrabákovi.

Výsledky předkládané v této práci byly získány s finanční podporou několika grantových agentur a výzkumných subjektů. Na tomto místě bych chtěla poděkovat Grantové agentuře České republiky, Interní grantové agentuře Ministerstva zdravotnictví, Agentuře zdravotnického výzkumu a Interní grantové agentuře VFU Brno. Velký dík patří mé alma mater Veterinární a farmaceutické univerzitě Brno, především Fakultě veterinární hygieny a ekologie, a dále výzkumnému centru CEITEC za podporu mé vědecké a akademické kariéry.

Tuto práci bych chtěla věnovat skvělému člověku a znamenitému vědci Marco Minoia. Vděčím mu za jeho lásku, přátelství a podporu. Děkuji mu také za spolupráci na poli vědeckém a za velikou podporu v době přípravy habilitační práce, zejména pak za pomoc s grafickou úpravou textu. Poděkování patří i mé rodině za jejich pochopení pro cestu, kterou jsem si zvolila.



# Obsah

---

Seznam zkratk	4
1. Úvod	7
2. <i>Escherichia coli</i>	9
3. Antimikrobiální látky	13
3.1 Charakteristika klinicky významných antimikrobiálních látek	15
3.1.1 Cefalosporiny	15
3.1.2 Karbapenemy	17
3.1.3 Chinolony	18
3.2 Antimikrobiální látky ve veterinární medicíně	20
3.2.1 Antimikrobiální látky ke stimulaci růstu zvířat	20
3.2.2 Antibiotika u potravinových zvířat a rizika pro člověka	22
3.2.3 Cefalosporiny a karbapenemy v terapii zvířat	22
3.2.4 Fluorochinolony v terapii zvířat	24
3.3 Vliv antimikrobiálních látek na životní prostředí	25
4. Antimikrobiální rezistence	27
4.1 Mechanizmy antibiotické rezistence a jejich genetický základ	29
4.2 Prostedí v kontextu původu antibiotické rezistence	30
4.3 Jednotky v šíření antibiotické rezistence	33
4.4 Cesty šíření rezistentních bakterií	35
5. Mechanizmy rezistence ke klinicky významným antibiotikům	37
5.1. Mechanizmy rezistence k cefalosporinům a karbapenemům	39
5.1.1 Obecná charakteristika a klasifikace beta-laktamáz	40
5.1.2 Širokospektré beta-laktamázy (ESBL)	41
5.1.2.1 Metody detekce producentů ESBL	44
5.1.3 AmpC beta-laktamázy	44
5.1.3.1 Plazmidové AmpC beta-laktamázy	46
5.1.3.2 Metody detekce producentů AmpC beta-laktamáz	46
5.1.3.3 Molekulární epidemiologie AmpC	47
5.1.4 Karbapenemázy	48
5.1.4.1 Charakteristika metalo-beta-laktamáz	48
5.1.4.2 Charakteristika karbapenemáz molekulární třídy A	49
5.1.4.3 Charakteristika karbapenemáz molekulární třídy D	49
5.1.4.4 Metody detekce karbapenemáz	50
5.1.4.5 Molekulární epidemiologie producentů karbapenemáz	50
5.1.4.6 Producenti karbapenemáz u zvířat a v prostředí	51
5.2 Mechanizmy rezistence k fluorochinolonům	53
5.2.1 Chromozomální mechanismy rezistence k fluorochinolonům	54
5.2.1.1 Změny na úrovni buněčných membrán a aktivní eflux	54
5.2.1.2 Mutace cílových struktur chinolonů	56
5.2.2 Plazmidy determinovaná rezistence k fluorochinolonům (PMQR)	57
5.2.2.1 Qnr proteiny	57
5.2.2.2 Aminoglykozidová N-acetyltransferáza AAC(6')-Ib-cr	59
5.2.2.3 Efluxní pumpy QepA a OqxAB	60
5.2.3 Původ genů PMQR a jejich biologická role	60

5.2.4	Klinický význam PMQR	61
5.2.5	PMQR a mutačně selekční koncentrace	63
5.2.6	Metody detekce bakterií s PMQR	64
5.2.7	Charakteristické vlastnosti izolátů s PMQR	65
5.2.8	Výskyt PMQR u člověka, zvířat a v prostředí	66
<b>6.</b>	<b>Mobilní genetické elementy v šíření rezistence</b>	<b>69</b>
6.1	Horizontální přenos genů u bakterií	72
6.1.1	Transformace	73
6.1.1.1	Úloha transformace v šíření rezistence k antibiotikům	74
6.1.2	Transdukce	74
6.1.2.1	Úloha transdukce v šíření rezistence k antibiotikům	75
6.1.3	Konjugace	75
6.2	Mobilní genetické elementy	76
6.2.1	Inzerční sekvence	77
6.2.2	Transpozony	78
6.2.3	Struktury příbuzné inzerčním sekvencím	80
6.2.4	Mechanismus transpozice	81
6.2.5	Integrony	85
6.2.5.1	Obecná struktura MRI integronů	85
6.2.5.2	Klasifikace MRI integronů	86
6.2.5.3	Mobilizace integronů	87
6.2.5.4	Rezistence sdružená s integrony	89
6.2.5.5	Superintegrony	90
6.2.6	Integrativní konjugativní elementy	91
6.2.7	Genomové ostrovy	92
6.2.8	Plazmidy	94
6.2.8.1	Základní organizace plazmidů	94
6.2.8.2	Nomenklatura plazmidů	98
6.2.8.3	Replikace plazmidů	98
6.2.8.4	Regulace replikace plazmidů	101
6.2.8.5	Inkompatibilita plazmidů	102
6.2.8.6	Koexistence plazmidů ze stejné Inc skupiny	104
6.2.8.7	Klasifikace plazmidů Enterobacteriaceae	104
6.2.8.8	Horizontální přenos plazmidů	105
6.2.8.9	Hostitelské rozmezí plazmidů	108
6.2.8.10	Mechanismy stabilního udržování plazmidů	109
6.2.8.11	Funkce kódované plazmidy	113
<b>7.</b>	<b>Epidemiologie širokospektrých beta-laktamáz</b>	<b>121</b>
7.1	Charakteristika beta-laktamázy CTX-M	123
7.2	Původ beta-laktamázy CTX-M	126
7.3	Faktory ovlivňující šíření CTX-M	127
7.4	Rozšíření ESBL u humánních izolátů	128
7.5	Výskyt ESBL u izolátů z potravinových zvířat	130
7.6	Výskyt ESBL u izolátů ze zvířat chovaných ze záliby	132
7.7	Šíření ESBL v prostředí – význam odpadních vod	133
7.8	Výskyt ESBL izolátů u volně žijících zvířat	134
7.9	Rizikové a úspěšné klony <i>E. coli</i> v šíření ESBL	136
7.10	Mobilní genetické elementy v šíření ESBL	139
7.10.1	ISEcp1 v šíření ESBL	140
7.10.1.1	Struktura modulu ISEcp1- <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	140

7.10.1.2	ISEcp1 v mobilizaci a expresi genu <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	141
7.10.2	Další mobilní elementy sdružené s ESBL	143
7.10.3	Plazmidy v šíření ESBL	145
7.10.3.1	Virulentní plazmidy rodiny IncF v šíření CTX-M-15	146
7.10.3.2	Multirezistentní IncA/C <sub>2</sub> plazmidy v šíření beta-laktamáz	147
7.10.3.3	IncN s širokým spektrem hostitelů v šíření CTX-M-1	148
7.10.3.4	Multirezistentní IncHI plazmidy	149
7.10.3.5	Zoonotický potenciál IncI1 v šíření širokospektrých beta-laktamáz	151
7.10.3.6	IncL/M v globálním šíření OXA-48	152
7.10.3.7	IncK v šíření CTX-M-14 a CMY-2	152
8.	Závěr	153
	Seznam literatury	155
	Přílohy	188

## Seznam zkratek

---

AAC(6')-Ib-cr	bifunkční acetyltransferáza inaktivující aminoglykozidy a fluorochinolony
ABC	rodina efluxních pump („adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette“)
ACC	rodina beta-laktamáz
ACT	rodina beta-laktamáz
AIEC	adherentní invazivní <i>E. coli</i>
AmpC	rodina beta-laktamáz
APEC	aviární patogenní <i>E. coli</i>
ATP	adenozintrifosfát
BES	rodina beta-laktamáz
bp; kb	páry bazí („base pair“); kilobaze („kilobase“)
CcdAB	typ plazmidového adikčního systému
CDEC	„cell-detaching“ <i>E. coli</i>
CLSI	„Clinical Laboratory and Standards Institute“
CMY	rodina beta-laktamáz
Col	skupina plazmidů sdružená s geny pro produkci kolicinů
CS	konzervativní segment integronu
CTX-M	rodina beta-laktamáz
ČOV	čistírna odpadních vod
DAEC	difuzně adherentní <i>E. coli</i>
DANMAP	dánský program pro monitorování antibiotické rezistence („The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring“)
DHA	rodina beta-laktamáz
DR	přímá repetice („direct repeat“)
EAEC	enteroagregativní <i>E. coli</i>
EARS-Net	„Antimicrobial resistance interactive database“
ECDC	„European Centre for Disease and Prevention Control“
ECOFF	epidemiologický předěl („epidemiological cut-off value“)
EcoRII	typ restriktivně modifikačního systému
EAHEC	enteroagregativní hemoragická <i>E. coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin („European Food Safety Authority“)
EHEC	enterohemoragická <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvazivní <i>E. coli</i>
EMA	Evropská léková agentura („European Medicines Agency“)
EPEC	enteropatogenní <i>E. coli</i>
ESBL	širokospektrá beta-laktamáza („extended-spectrum beta-lactamase“)
ETEC	enterotoxigenní <i>E. coli</i>
EUCAST	„The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing“
ExPEC	extraintestinálně patogenní <i>E. coli</i>
F+	buňka nesoucí fertilní (F, IncF) plazmid
FOX	rodina beta-laktamáz
FQ	fluorochinolony
GEI	genomový ostrov („genomic island“)
GES	rodina beta-laktamáz
GIM	rodina beta-laktamáz
GIT	gastrointestinální trakt
GyrA	podjednotka DNA gyrázy (topoizomerázy II)
GyrB	podjednotka DNA gyrázy (topoizomerázy II)

HGT	horizontální tok genů („horizontal gene transfer“)
Hok-Sok	typ plazmidového adikčního systému
ICE	integrativní konjugativní element („integrative conjugative element“)
IMI	rodina beta-laktamáz
IMP	rodina beta-laktamáz
Inc	skupina inkompatibility plazmidů
IR	obrácená/invertovaná repetice („inverted repeat“)
IRi	obrácená repetice u genu integrázy
IRL	levá obrácená repetice („left inverted repeat“)
IRR	pravá obrácená repetice („right inverted repeat“)
IRt	obrácená repetice v oblasti <i>tni</i>
IS	inzerční sekvence
ISCR	inzerční sekvence transponovaná mechanismem replikace na otáčející se kružnici
KPC	rodina beta-laktamáz
LAT	rodina beta-laktamáz
LGT	laterální tok genů („lateral gene transfer“)
MALDI-TOF	hmotnostní spektrometrie („matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight“)
MATE	rodina efluxních pump („multidrug and toxic compound extrusion“)
MBL	metalo-beta-laktamáza
MDR	multirezistence („multidrug resistance“)
MFS	rodina efluxních pump („major facilitator superfamily“)
mg/PCU	množství účinné látky vztažené na velikost populace („population correction unit“)
MGE	mobilní genetický element
MIC	minimální inhibiční koncentrace nebo mobilní inzerční kazeta
MIR	rodina beta-laktamáz
MITE	typ mobilního genetického elementu
MLST	metoda typizace izolátů; multilokusová sekvenční typizace
Mob	mobilizovatelný plazmid
MOX	rodina beta-laktamáz
MPC	mutačně preventivní koncentrace („mutation prevention concentration“)
MRI	multirezistentní integron neboli integron nesoucí několik genů rezistence („multiresistance integron“)
MRR	oblast multirezistence („multiresistance region“)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> rezistentní k meticilinu
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> citlivý k meticilinu
NDM	rodina beta-laktamáz
NMC	rodina beta-laktamáz
NMEC	<i>E. coli</i> vyvolávající novorozenecké meningitidy
NTEC	nekrotoxigenní <i>E. coli</i>
Omp	protein vnější plazmatické membrány („outer membrane protein“)
OqxAB	efluxní pumpa; plazmidy kódovaná determinanta rezistence k chinolonům
orf	otevřený čtecí rámec („open reading frame“)
<i>oriV</i>	počátek replikace plazmidu („origin of vegetative replication“)
<i>oriT</i>	počátek přenosu plazmidu („origin of transfer“)
OXA	rodina beta-laktamáz
PAI	ostrov patogenity („pathogenicity island“)
Par	systém stabilní segregace plazmidů při buněčném dělení („partitioning“)
ParC	podjednotka topoizomerázy IV
ParE	podjednotka topoizomerázy IV

BBP	protein vázající penicilin („penicilin-binding protein“)
PBRT	metoda typizace replikonů založená na PCR („PCR-based replicon typing“)
PCR	polymerázová řetězová reakce („polymerase chain reaction“)
PDR	„panrezistence“; rezistence ke všem dostupným antibiotikům („pandrug resistance“)
PemKI	typ plazmidového adikčního systému
PER	rodina beta-laktamáz
PFGE	pulzní gelová elektroforéza („pulse-field gel electrophoresis“)
pMLST	metoda typizace plazmidů, multilokusová sekvenční typizace plazmidů („plasmid multilocus sequence typing“)
PMQR	plazmidy determinovaná rezistence k chinolonům („plasmid-mediated quinolone resistance“)
PndAC	typ plazmidového adikčního systému
QepA	efluxní pumpa; plazmidy kódovaná determinanta rezistence k chinolonům
Qnr	rodina plazmidy kódovaných determinant rezistence k chinolonům
QRDR	oblast určující rezistenci k chinolonům („quinolone resistance determining region“)
RC	transpozice zahrnující replikaci na otáčející se kružnici („rolling circle“)
RelBE	typ plazmidového adikčního systému
Rep	protein účastnící se replikace DNA
RM systém	restrikčně modifikační systém
RND	rodina efluxních pump („resistance-nodulation-cell division“)
SGI	genomový ostrov salmonel („Salmonella genomic island“)
SHV	rodina beta-laktamáz
SIM	rodina beta-laktamáz
SME	rodina beta-laktamáz
SMR	rodina beta-laktamáz
SPM	rodina beta-laktamáz
SPN	rodina beta-laktamáz
SrnB	typ plazmidového adikčního systému
SSCmec	genová kazeta pro rezistenci k met icilinu vázaná na chromozom <i>Staphylococcus</i> spp. („staphylococcal cassette chromosome“)
ST	sekvenční typ
STC	komplex sekvenčních typů, alternativní název klonální komplex (CC–„clonal complex“)
STEC	shigatoxigenní <i>E. coli</i>
SVARM	veterinární monitorovací program antimikrobiální rezistence ve Švédsku („Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring“)
TEM	rodina beta-laktamáz
tIS	transferová IS
Tn	transpozon
Tra	oblast plazmidu obsahující geny pro konjugativní přenos
UPEC	uropatogenní <i>E. coli</i>
VagCD	typ plazmidového adikčního systému
VCR	repetitivní oblasti v superintegronech <i>V. cholerae</i>
VEB	rodina beta-laktamáz
VIM	rodina beta-laktamáz
XDR	extenzivní neboli rozšířená rezistence („extensive drug resistance“)
XerCD	systém rozdělování multimerních plazmidových forem
WHO	Světová zdravotnická organizace

# 1. Úvod

---

Antibiotika jsou považována za jeden z nejdůležitějších objevů v historii lidstva. O antibioticích se bez nadsázky mluví jako o „záračných“ lécích, které změnily charakter medicíny, umožnily terapii dříve neléčitelných infekcí, provádění chirurgických zákroků a transplantací. V důsledku domněnky záračnosti, neškodnosti a naprosté univerzálnosti antibiotik jako nástrojů v boji proti mikrobům tomu odpovídalo i jejich neuvážené a nadbytečné používání. To se postupem času odrazilo v jednom ze současných palčivých problémů, kterým je rezistence bakterií k antibiotikům. Rezistence celosvětově narůstá, stoupá četnost multirezistentních gramnegativních bakterií a těch, které odolávají všem dostupným antimikrobiálním látkám. Současný stav je popisován jako antibiotická krize. Snižuje se účinnost klinicky významných antibiotik humánní i veterinární medicíny a dochází k šíření bakterií rezistentních k lékům poslední volby vyhrazených pro léčbu život ohrožujících infekcí člověka. Nejdramatičtější z hlediska rostoucího trendu je situace v případě bakteriálních druhů *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a dalších druhů čeledi Enterobacteriaceae. Jedná se o skupinu bakterií s kosmopolitním rozšířením, která tvoří běžnou součást střevní mikroflóry člověka a zvířat a zároveň disponuje patogenním potenciálem.

Cílem této habilitační práce je podat ucelený přehled tématu bakteriální rezistence ke klinicky významným antibiotikům humánní i veterinární medicíny. Práce popisuje problematiku epidemiologie rezistence gramnegativních bakterií, zejména zástupců čeledi Enterobacteriaceae, rezistentních k širokospektrým beta-laktamovým antibiotikům a fluorochinolonom. Pozornost je věnována výskytu bakterií s touto rezistencí u člověka, zvířat i v prostředí s ohledem na dnes široce skloňovaný termín „One Health“ neboli „jedno zdraví“. Habilitační práce je koncipována jako ucelený popis problematiky doplněný původními vědeckými publikacemi autora<sup>1</sup>, které dokládají jeho přínos v oboru. Tyto vědecké výstupy vznikly pod vlajkou Ústavu biologie a chorob volně žijících zvířat a Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie, VFU Brno. Práce bude v budoucnu sloužit jako výchozí materiál pro přípravu rozsáhlejšího učebního textu věnovaného tématice antibiotické rezistence, který bude primárně určen pro studenty mikrobiologie a blízkých přírodovědných či lékařských oborů.

*E. coli* je jedním z nejdůležitějších bakteriálních druhů v šíření klinicky významné rezistence k antibiotikům. Slouží rovněž jako vhodný ukazatel při sledování stavu a vývoje antibiotické rezistence. První kapitola je proto věnována jeho stručnému představení. Další text popisuje vybrané skupiny beta-laktamových antibiotik a fluorochinolony v kontextu jejich použití u zvířat a člověka, negativních dopadů na selekci rezistentních bakterií a vlivů na životní prostředí. Tato kapitola je následována obecným úvodem do problematiky antibiotické rezistence, který pojednává o původu rezistentních bakterií, věnuje

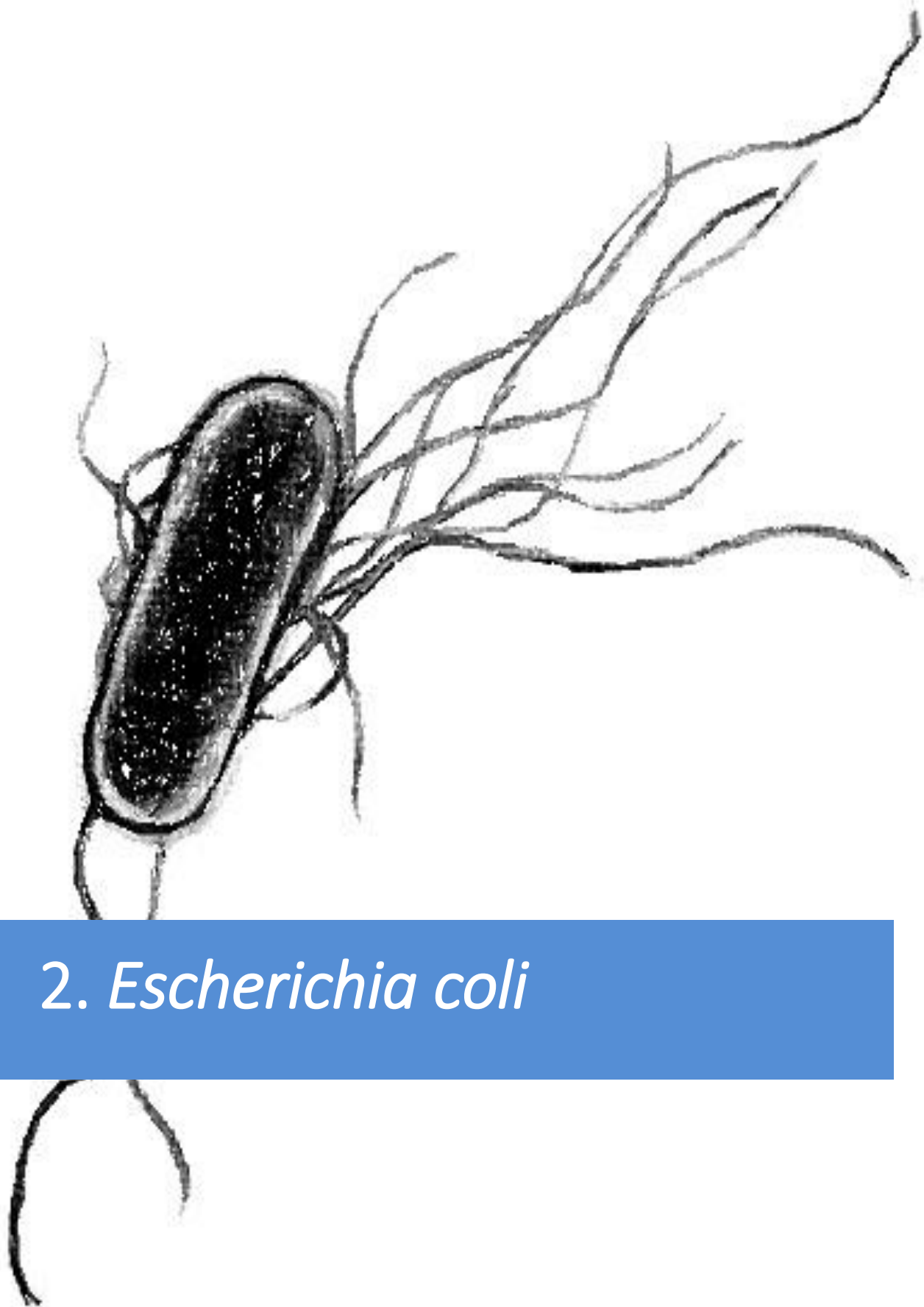
---

<sup>1</sup>Citace původních prací autora, které jsou součástí této habilitační práce, jsou v textu označeny šedým písmem. Citace je následována číselným odkazem na přílohu, která obsahuje kopii dané publikace.

se faktorům a cestám jejich šíření. Další kapitoly jsou věnovány bližšímu popisu mechanismů, které bakterie využívají k inaktivaci inhibičního účinku výše uvedených skupin antibiotik.

V šíření rezistence k antibiotikům u gramnegativních bakterií hraje úlohu horizontální přenos genů zprostředkovaný úseky DNA – mobilními genetickými elementy. Tyto elementy si mezi sebou bakterie ochotně předávají a spolu s nimi i genetickou informaci pro rezistenci k antibiotikům, dezinfekčním látkám, těžkým kovům či virulenci. Vazba genů rezistence na přenosné plazmidy utváří současný obraz epidemiologie rezistence k beta-laktamovým antibiotikům, udává její rostoucí charakter a je spojena s četným výskytem multirezistence. Podstatná část textu je proto věnována mobilním genetickým elementům v šíření klinicky významné rezistence. Je představena jejich strukturu a způsoby přenosu mezi bakteriálními genomy. Poslední kapitola se soustředí na molekulární epidemiologii producentů širokospektrých beta-laktamáz, které jsou jedním z nejvýznamnějších mechanismů rezistence enterobakterií vázaných na plazmidy a zároveň předmětem výzkumného zaměření autora.





## 2. *Escherichia coli*



*Escherichia coli* je gramnegativní fakultativně anaerobní tyčka. Řadíme ji do čeledi Enterobacteriaceae, třídy Gammaproteobacteria. Do této čeledi náleží geneticky příbuzné druhy s rozdílnou ekologií, rozmanitým spektrem hostitelů a různou mírou patogenního působení. Pro zástupce čeledi Enterobacteriaceae je někdy používán termín „enterobakterie“. Většina enterobakterií není patogenní, některé druhy jsou však podmíněnými či obligátními patogeny a způsobují závažná onemocnění člověka nebo zvířat (např. *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia pestis*, patogenní kmeny *E. coli* atd.). Některé druhy způsobují onemocnění rostlin. Enterobakterie nalézáme ve vodě a půdě, kde je jejich výskyt indikací fekálního znečištění. Čeď Enterobacteriaceae se v posledních letech stala významnou skupinou bakterií v humánní i veterinární medicíně v souvislosti s narůstající rezistencí k antibiotikům.

*E. coli* získala své jméno podle rakouského lékaře a mikrobiologa Theodora von Eschericha, který ji v roce 1885 izoloval. Je nejběžnější fakultativně anaerobní bakterií v trávicím traktu člověka a mnoha dalších teplokrevných živočichů. Většina kmenů tohoto bakteriálního druhu je nepatogenních a vykazuje do jisté míry symbiotický stav se svým hostitelem, podílí se na syntéze některých vitamínů a přispívá k ochraně trávicího traktu před kolonizací patogenními organizmy. Schopnost některých kmenů vyvolat onemocnění je spojena s přítomností specifických genů kódujících faktory virulence. Genetickou informaci pro virulenci může *E. coli* získat procesem horizontálního toku genů (HGT – „horizontal gene transfer“) nesených plazmidy, bakteriofágy nebo ostrovy patogenity. Specifický patotyp *E. coli* je definován kombinací určitých virulenčních faktorů a je spojen s limitovanou škálou klinických symptomů. Komplikovaná nomenklatura patotypů *E. coli* je důsledkem několika faktorů, zahrnujících podobnosti jmen jednotlivých patotypů a dále nesprávné nebo inkonzistentní používání jmen v odborné literatuře. Přibývající poznatky v evoluci a patogenezi a průkaz nových patotypů rovněž vnášejí do nomenklatury další nejasnosti (Donneberg, 2013; Mainil, 2013). Podle místa infekce dělíme patogenní *E. coli* do dvou velkých skupin na intestinální patogenní *E. coli* způsobující střevní infekce a extraintestinálně patogenní *E. coli* (ExPEC) vyvolávající infekce mimo střevo. Nejčastější infekce mimo střevo zahrnují infekce močového ústrojí případně novorozenecké meningitidy. Přehled nejvýznamnějších patotypů uvádí **Tab. 1**.

*E. coli* je vysoce proměnlivým bakteriálním druhem s vysokou schopností adaptace k měnícím se podmínkám vnějšího prostředí. Základní genetická informace *E. coli* sdílená všemi kmeny tohoto druhu tvoří pouze 20 % celkové velikosti genomu (Rasko *et al.*, 2008). Složení genomu je ovlivněno konstantním tokem genů zprostředkovaným plazmidy a bakteriofágy. *E. coli* je ochotným dárce a vděčným příjemcem genetické informace včetně té, která udílí rezistenci k antibiotikům. Je zároveň vhodným indikátorovým mikroorganizmem při zjišťování stavu rezistence k antibiotikům, a proto je využíván pro studium šíření antibiotické rezistence v různých prostředích.

Tab. 1: Přehled nejvýznamnějších patotypů *E. coli*

Zkratka	Celý název	Základní patogeneze	Typ onemocnění
EPEC	enteropatogenní <i>E. coli</i>	adheze k epitelu střevní sliznice, tvorba „attaching-effacing“ lézí, produkce enteroagregativního termostabilního enterotoxinu 1	průjmová onemocnění lidí v rozvojovém světě
STEC	shigatoxigenní <i>E. coli</i>	adheze k epitelu střevní sliznice, produkce shigatoxinu s cytopatogenním efektem	průjmové onemocnění člověka, edémová choroba prasat
EHEC <sup>1</sup>	enterohemoragická <i>E. coli</i>	jako STEC, navíc sekreční systém typu III a plazmid virulence s molekulovou hmotností 60MDa, tvorba „attaching-effacing“ lézí	průjem, hemoragická kolitida a hemolyticko-uremický syndrom (HUS)
ETEC	enterotoxigenní <i>E. coli</i>	adheze k epitelu střevní sliznice, termolabilní LT a termostabilní ST toxin	průjmová onemocnění dětí v rozvojovém světě, cestovatelské průjmy, vodnaté průjmy selat
EIEC <sup>2</sup>	enteroinvazivní <i>E. coli</i>	invazi bakterií do buněk střevní sliznice, produkce cytotoxinů a enterotoxinů	vodnatý průjem neodlišitelný od průjmu způsobeného shigelou
EAEC	enteroagregativní <i>E. coli</i>	agregativní adherence k povrchu enterocytů střeva, sekrece střevní sliznice, tvorba biofilmu	průjmová onemocnění v rozvojovém světě
DAEC	difúzně adherentní <i>E. coli</i>	adherence k povrchu enterocytů střeva nebo epitelu močových cest	průjmové onemocnění a cystitida dětí, peylonefritida těhotných, recidivní infekce močových cest
AIEC	adherentní invazivní <i>E. coli</i>	adheze k epitelu střevní sliznice, invaze do buněk střevní sliznice	ileální léze pacientů s Crohnovou chorobou, granulomatózní kolitida některých plemen psů
EAHEC <sup>3</sup>	enteroagregativní hemoragická <i>E. coli</i>	agregativní adherence k povrchu enterocytů střeva, tvorba shigatoxinu Stx2	gastroenteritida a HUS
CDEC	„cell-detaching“ <i>E. coli</i>	oddělení střevních buněk od epitelu zprostředkované $\alpha$ -hemolysinem, fimbriemi asociovanými s pyelonefritidou a cytotoxickým faktorem 1	průjmová onemocnění dětí
APEC	aviární patogenní <i>E. coli</i>	adheze k epitelu plicních vaků a tvorba lézí, produkce aerobaktinu, toxinů a kolicinů	respirační infekce a septicémie domestikovaných ptáků
UPEC	uropatogenní <i>E. coli</i>	adheze k epitelu močových cest prostřednictvím fimbrií a nefibrilárních adhezínů, produkce toxinů, sideroforů	infekce močových cest lidí i zvířat, ojedinele zánět ledvin vedoucí k bakteriémii
NMEC	<i>E. coli</i> vyvolávající neonatální meningitidy	tvorba kapsulárního antigenu - uniká imunitnímu systému a proniká do mozkomíšního moku přes hematoencefalickou bariéru	meningitida novorozenců
NTEC	nekrotoxigenní <i>E. coli</i>	adheze k povrchu epitelu, tvorba toxinů (např. cytotoxický nekrotizující faktor)	průjmová onemocnění lidí i zvířat, různé typy extraintestinálních infekcí člověka a zvířat (např. močové infekce, meningitida)

Vytvořeno podle Allocati *et al.*, 2013; Belanger *et al.*, 2011; Biju *et al.*, 2012; De Rycke *et al.*, 1999; Donneberg, 2013; Johnson a Russo, 2002a, b; Kolenda *et al.*, 2015; Marks *et al.*, 2011; Nagy a Fekete, 2005; Nakazato *et al.*, 2009; Paciorek, 2002; Pitout, 2012a, b; Rubin a Pitout, 2014; Wales *et al.*, 2005; Walker *et al.*, 2007.

<sup>1</sup>podskupina STEC nesoucí přídavné faktory virulence, <sup>2</sup>blíže příbuzná rodu *Shigella*, <sup>3</sup>hypervirulentní patotyp, rekombinant STEC a EAEC, zahrnuje serotyp O104:H.



### 3. Antimikrobiální látky



Název antibiotikum či antimikrobiální látka se datuje již do roku 1889, kdy Vuillemin definoval termín „antibióza“ jako jakýkoliv antagonistický vztah mezi živými organizmy. Přímo termín antibiotikum byl poprvé použit Waksmanem v roce 1942. Antimikrobiální látka je definována jako substance produkovaná mikroorganismy nebo připravená synteticky či semisynteticky, která v nízkých koncentracích usmrcuje jiné mikroorganismy nebo inhibuje jejich růst. Při svém účinku zasahují antimikrobiální látky do nejrůznějších procesů života bakteriální buňky. Narušují funkci plazmatické membrány, zasahují do tvorby buněčné stěny nebo inhibují syntézu proteinů a nukleových kyselin, případně působí jako kompetitivní inhibitory některých metabolických drah.

Jedním z prvních antibiotik, které změnilo charakter medicíny 20. století, byl penicilin. Izolace penicilinu A. Flemingem z plísně *Penicillium notatum* v roce 1928 byla ve 40. letech minulého století následovaná přípravou penicilinových preparátů ke klinickému použití. Objev penicilinu odstartoval zlatou éru antibiotik. Byli hledáni producenti látek s potenciálním antimikrobiálním účinkem v prostředí nebo byly tyto látky připravovány chemickou syntézou. Antibiotickou éru dokumentuje skutečnost, že mezi lety 1940 a 1962 bylo uvedeno na trh přes 20 tříd antimikrobiálních látek. Vývoj nových antibiotik však postupně ustával a v posledních letech se na trh dostala pouze hrstka zcela nových preparátů.

Jedny z nejdůležitějších antimikrobiálních látek, vzhledem k jejich komplexnímu použití v humánní i veterinární medicíně a širokému spektru účinku, jsou fluorochinolony a beta-laktamová antibiotika (cefalosporiny a karbapenemy). Tyto antibiotické skupiny jsou zároveň v popředí světového zájmu z důvodu narůstající prevalence rezistentních izolátů mezi zástupci čeledi Enterobacteriaceae. Následující kapitoly stručně charakterizují tyto skupiny antimikrobiálních látek, popisují mechanismy jejich účinku, věnují se terapeutickému použití včetně jeho negativních dopadů.

## 3.1 Charakteristika klinicky významných antimikrobiálních látek

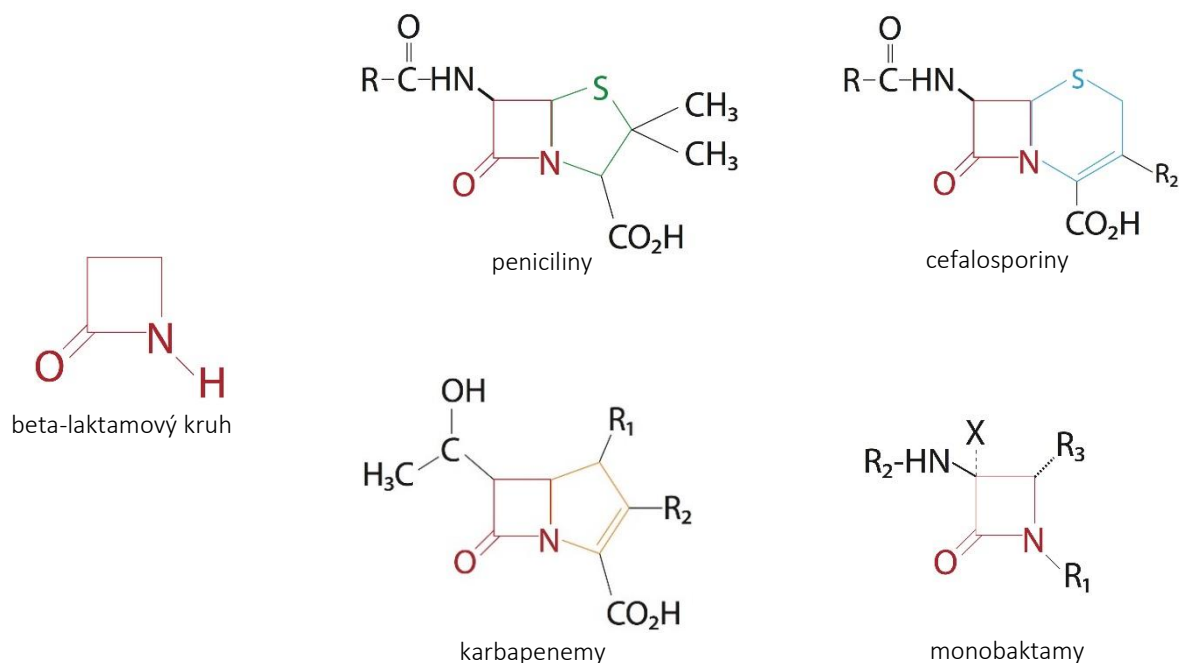
### 3.1.1 Cefalosporiny

Cefalosporiny řadíme mezi beta-laktamová antibiotika, jelikož podobně jako peniciliny obsahují klasickou čtyřčlennou strukturu beta-laktamového kruhu. Oproti penicilinům je navíc k tomuto kruhu připojena šestičlenná dihydrothiazolová struktura udávající charakteristickou bicyklickou podobu molekuly cefalosporinu. Antimikrobiální účinky prvního známého producenta cefalosporinů, plísně *Acremonium chrysogenum* (dříve *Cephalosporium acremonium*), byly popsány v roce 1945. Následně byla na univerzitě v Oxfordu z této kultury izolována krystalická látka s antimikrobiálními účinky, cephalosporin C. Klinické použití cefalosporinu C bylo limitováno jeho slabou antimikrobiální aktivitou, která však byla zvýšena modifikací postranního řetězce za vzniku 7-aminocefalosporanové kyseliny. Ta se stala základem pro syntézu od ní odvozených nových molekul. Substituce postranních řetězců v této pozici je spojena se

změnou antimikrobiální aktivity a odolnosti vůči beta-laktamázám neboli enzymům degradujícím beta-laktamová antibiotika (Finch *et al.*, 2003; Mascaretti, 2003). Základní chemické struktury cefalosporinů a dalších skupin beta-laktamových antibiotik jsou představeny na **Obr. 1**.

Podobně jako všechna beta-laktamová antibiotika zasahují cefalosporiny do procesu syntézy buněčné stěny. Cílovým místem účinku jsou proteiny vázající penicilin (PBP – „penicilin binding protein“), které vykazují funkci transpeptidáz a účastní se spřáhování peptidových řetězců při tvorbě buněčné stěny. Cefalosporiny inhibují vznik síťové struktury buněčné stěny, negativně tak ovlivňují její rigiditu a zároveň aktivují autokatalytické enzymy s konečným výsledkem lyze bakteriální buňky (Mascaretti, 2003).

Cefalosporiny jsou tříděny do různých kategorií. Bylo navrženo několik systémů jejich dělení zahrnující klasifikaci chemickou (na základě struktury molekuly), farmakokinetickou (dle poločasu rozpadu molekuly) nebo mikrobiologickou. Mikrobiologická klasifikace je používána nejčastěji a dělí cefalosporiny do čtyř generací (I-IV). Vychází ze schopnosti cefalosporinů inhibovat jednotlivé skupiny bakterií a z jejich stability k beta-laktamázám. Vybraní zástupci jednotlivých generací cefalosporinů a jejich spektrum účinku je uvedeno v **Tab. 2**. Dle antimikrobiální aktivity je možné obecně říci, že od I. do III. generace roste jejich působení proti gramnegativním bakteriím a naopak klesá k bakteriím grampozitivním. Čtvrtá generace zahrnuje nejnovější preparáty se širokou aktivitou proti grampozitivním kokům a gramnegativním bakteriím produkujícím některé typy beta-laktamáz (Mascaretti, 2003).



**Obr. 1:** Základní struktura vybraných skupin beta-laktamových antibiotik

Vytvořeno podle Bryskier, 2005.



Tab. 2: Klasifikace a spektrum účinku cefalosporinů

Generace	Příklady základních molekul	Antimikrobiální aktivita
I	cefalotin, cefazolin, cefadroxil, cefaloridin	grampozitivní koky ( <i>Streptopoccus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , MSSA); <i>Neisseria</i> spp.; Enterobacteriaceae neprodukující beta-laktamázu
II	cefamandol, cefuroxim, cefamyciny-cefotetan, cefoxitin	grampozitivní koky (nižší účinek v porovnání s I. generací); variabilní aktivita proti Enterobacteriaceae (stabilita vůči úzkospektrým beta-laktamázám, cefamyciny stabilní také vůči ESBL)
III	cefotaxim, ceftazidim, cefoperazon, cefpiramid, ceftriaxon, ceftiocef	grampozitivní i gramnegativní bakterie; <i>Haemophilus influenzae</i> a <i>Neisseria gonorrhoeae</i> produkující beta-laktamázy; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; neúčinné vůči MRSA a <i>Enterococcus</i> spp.; různá stabilita vůči beta-laktamázám Enterobacteriaceae
IV	cefepim, cefpirom, cefchinom	vysoká aktivita vůči gramnegativním bakteriím (Enterobacteriaceae, <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>P. aeruginosa</i> ), streptokokům a MSSA; stabilní vůči AmpC beta-laktamázám

Volně podle Finch *et al.* 2003; Giguère *et al.* 2013; Mascaretti, 2003. MSSA, *S. aureus* citlivý k meticilinu. MRSA, *S. aureus* rezistentní k meticilinu. ESBL a AmpC představují skupiny širokospektrých beta-laktamáz, které budou blíže představeny v kapitole 5.1.

### 3.1.2 Karbapenemy

Další skupinou klinicky významných beta-laktamových antibiotik jsou karbapenemy, jejichž obecná struktura je uvedena na **Obr. 1**. Prvním objeveným karbapenemem byl thienamycin izolovaný z půdní bakterie *Streptomyces cattleya* v roce 1976. Nestabilita této molekuly byla překonána následnou chemickou syntézou. První karbapenem, imipenem, byl uveden na trh ke klinickému použití v roce 1985. Limitací imipenemu je jeho nestabilita vůči dehydropeptidáze I produkované ledvinami a z tohoto důvodu se podává spolu s inhibitory cilastatinem nebo betaminopronem. Nestabilita imipenemu aktivovala snahu syntetizovat nové molekuly, které daly vznik dalším zástupcům skupiny karbapenemů odolávajících dehydropeptidáze, například meropenemu, ertapenemu, doripenemu a biapenemu (Papp-Wallace *et al.*, 2011).

Karbapenemy jsou antibiotika se širokým spektrem účinku proti různým druhům grampozitivních i gramnegativních bakterií. Jejich širokospektrální aktivita je dána několika faktory. Jednak dobře pronikají do buněk gramnegativních bakterií díky specifickým transportním mechanismům zprostředkovaným vnějšími membránovými proteiny Omp, dále jsou vysoce stabilní k většině beta-laktamáz a silně se vážou k PBP. Díky těmto vlastnostem je řadíme mezi rezervní antibiotika nebo antibiotika poslední volby pro léčbu život ohrožujících infekcí člověka (Papp-Wallace *et al.*, 2011). Jejich použití pro veterinární účely nebylo schváleno.

Karbapenemy se vyznačují svoji širokou aktivitou, která zahrnuje většinu zástupců čeledi Enterobacteriaceae, acinetobaktery (kromě meropenemu), streptokoky, stafylokoky, pseudomonády (kromě ertapenemu), gramnegativní anaerobní bakterie a grampozitivní tyčky (*Clostridium* spp.). Výhodou karbapenemů je jejich schopnost odolávat širokospektrým beta-laktamázám, což je odlišuje od cefalosporinů (Papp-Wallace *et al.*, 2011).

### 3.1.3 Chinolony

Chinolony byly objeveny jako vedlejší produkty při syntéze antimalarika chlorochininu. Ačkoliv tato látka vykazovala slabou antimikrobiální aktivitu proti některým gramnegativním bakteriím, objev stimuloval snahy syntetizovat nové analogy. Jako první byla připravena v roce 1962 kyselina nalidixová (Leshner *et al.*, 1962). Jednalo se o první chinolon určený k léčbě močových infekcí. V následujícím desetiletí byly připraveny další preparáty chemickou modifikací kyseliny nalidixové. Jednotlivé molekuly chinolonů se různí ve své struktuře (**Obr. 2**). Chinolony se dělí na dvě základní skupiny sloučenin, které se odlišují v pozici 8. Jedná se o 1,8-naftyridiny (např. kyselina nalidixová) nesoucí v této pozici atom dusíku a 4-chinolony (např. ciprofloxacin), které obsahují v pozici 8 atom uhlíku. Substituce ve vedlejších pozicích (1, 5, 6, 7, 8) základní molekuly tvoří základ spektra účinku a farmakologických vlastností daného antimikrobiálního přípravku (Hooper a Rubinstein, 2003; Mascaretti, 2003). Například pro skupinu fluorochinolonů uvedených na trh v 80. letech je charakteristický atom fluoru v pozici C-6 (Paton a Reeves, 1988). Fluorochinolony (FQ) na rozdíl od kyseliny nalidixové dosahují vyšších hladin v séru a lepší aktivity proti gramnegativním bakteriím (Hooper a Rubinstein, 2003).

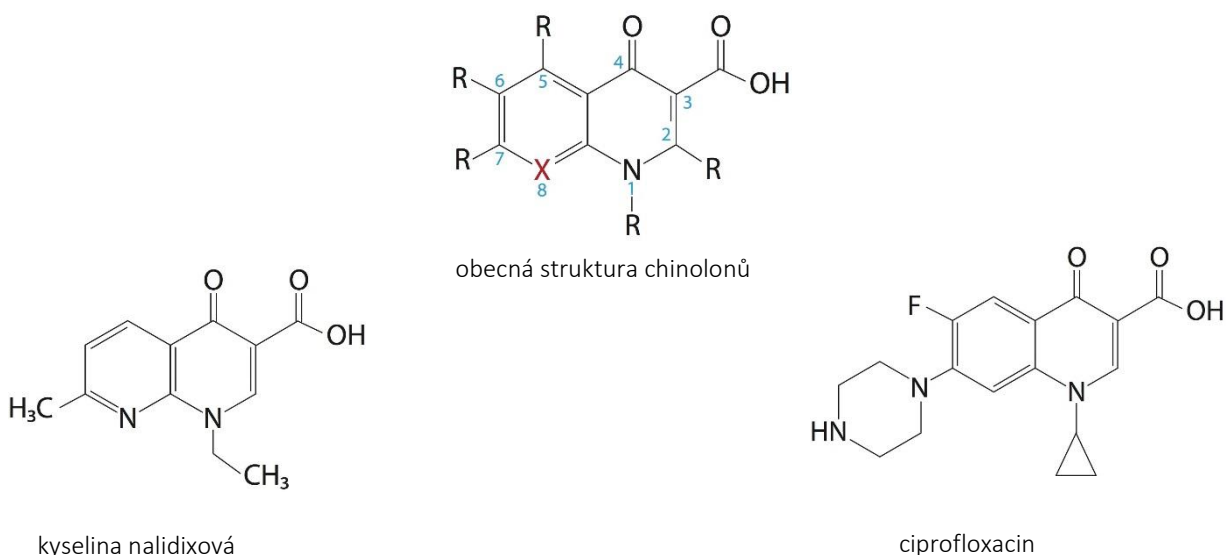
Cílovými molekulami chinolonů jsou enzymy účastníci se replikace DNA, DNA gyráza (topoizomeráza II) a topoizomeráza IV. Oba enzymy se vyznačují heterotetramerní strukturou a jsou tvořeny dvěma podjednotkami přítomnými v páru. U gramnegativních bakterií je DNA gyráza primárním místem zásahu chinolonů a je tvořena dvěma páry GyrA a GyrB. Topoizomeráza IV skládající se ze dvou párů podjednotek ParC a ParE je místem sekundárním. DNA gyráza zavádí negativní vinutí do DNA a topoizomeráza IV se podílí především na oddělování dceřiných nukleoidů vzniklých replikací.

Základním mechanismem účinku chinolonů je nekovalentní vazba komplexu topoizomeráza II-DNA (Hooper, 2000; Hooper a Rubinstein, 2003). Chinolony při svém účinku využívají základní biologické funkce gyrázy a topoizomerázy IV, kterou je tvorba zlomů v dvouřetězcové DNA vznikající při replikaci bakteriálního chromozomu. Vazbou na komplex enzym-DNA znemožňují opětovné spojení rozštěpených konců DNA a tím navyšují množství tohoto letálního komplexu. Následná kolize replikační vidlice nebo transkripčních faktorů se vzniklým komplexem vede ke vzniku trvalých dvouřetězcových zlomů v bakteriálním chromozomu. Tvorba zlomů spouští SOS odpověď a jiné reparační systémy poškozené DNA. Nahromaděné dvouřetězcové zlomy, které není buňka schopná odstranit, se pak stávají letálními.

Chinolony rovněž ovlivňují aktivitu gyrázy a topoizomerázy IV a působí jako inhibitory těchto enzymů, což přispívá k celkovému toxickému účinku (Aldred *et al.* 2014).

V současné době patří chinolony díky širokému spektru účinku a výborným farmakokinetickým vlastnostem mezi jedny z nejvýznamnějších antimikrobiálních látek humánní i veterinární medicíny. První generace chinolonů se využívá zejména při léčbě infekcí močových cest. Druhá generace nachází své uplatnění při léčbě infekcí gastrointestinálního a urogenitálního ústrojí vyvolaných gramnegativními bakteriemi. Používají se také při infekcích dýchacího ústrojí, měkkých tkání a kostí. Třetí generace chinolonů je méně účinná proti gramnegativním bakteriím, vykazuje naopak lepší aktivitu proti grampozitivům a používá se při léčbě infekcí respiračního ústrojí. Čtvrtá generace chinolonů je účinná proti grampozitivním i gramnegativním mikroorganismům. Používá se především pro léčbu respiračních infekcí a onemocnění vyvolaných anaeroby nebo *Mycobacterium tuberculosis* (Hooper a Rubinstein, 2003).

Fluorochinolony jsou řazeny mezi rezervní antibiotika, která by měla být podávána pouze v případech, kdy jsou jiná antibiotika *in vitro* neúčinná nebo nevhodná z důvodu toxicity a nežádoucích účinků. Velikou nevýhodou fluorochinolonů je selekce rezistentních mutant, které často vznikají jako důsledek nesprávného dávkování (Doss *et al.*, 1995; Drago *et al.*, 2010; Hooper, 2000).



Obr. 2: Struktura molekuly chinolonů

Vytvořeno podle Applebaum a Hunter, 2000; Hooper a Rubinstein, 2003. Chinolony se dělí na dvě základní skupiny sloučenin, které se odlišují v pozici 8 (pozice označena červeným křížkem X ve struktuře molekuly chinolonu). Jedná se o 1,8-naftyridiny (např. kyselina nalidixová) nesoucí v této pozici atom dusíku a 4-chinolony (např. ciprofloxacin), které obsahují v pozici 8 atom uhlíku.

Tab. 3: Klasifikace a spektrum účinku chinolonů

Generace	Příklady základních molekul	Antimikrobiální aktivita
I	kyselina nalidixová, kys. pipemidová, kys. oxolinová, cinoxacin, flumequin	střední aktivita vůči gramnegativním bakteriím, vůči pseudomonádám neaktivní
II	ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, enoxacin, enrofloxacin	lepší aktivita vůči gramnegativním bakteriím než I. generace (včetně pseudomonád), grampozitivní aerobní bakterie
III	gatifloxacin, grepafloxacin, sparfloxacin	podobná aktivita jako II. generace, navíc lepší aktivita proti grampozitivním bakteriím, atypickým bakteriím ( <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> )
IV	trovafloxacin, moxifloxacin, gemifloxacin	obdobná aktivita vůči grampozitivním a gramnegativním bakteriím jako III. generace, zvýšená aktivita vůči anaerobům, <i>Pseudomonas</i> spp.

Vytvořeno podle Andriole, 2005. Literatura uvádí různá klasifikační schémata, některá z nich operují pouze se třemi generacemi chinolonů. Rovněž příslušnost základních molekul do jednotlivých tříd (zejména v případě III. a IV. generace) se může lišit.

## 3.2 Antimikrobiální látky ve veterinární medicíně

Počátky antibiotické terapie u zvířat se datují do 40. let minulého století, kdy se k léčbě mastitid skotu začaly používat penicilinové preparáty ve formě intramamárních infuzí. V současné době jsou ve veterinární medicíně antibiotika používána ke dvěma velice odlišným účelům, a to k prevenci a léčbě bakteriálních infekcí a dále ke stimulaci růstu. **Terapeutickým** použitím antibiotika je vnímáno individuální podávání léčebné látky perorální nebo parenterální cestou pouze jedincům s bakteriální infekcí. Ve většině případů se ve velkých chovech zvířat, kde existuje vysoké riziko šíření infekce z nemocných na zdravé jedince (chovy drůbeže, prasat, ryb), přistupuje k **metafylaktickému** podání antibiotika ve vodě nebo potravě všem jedincům dané skupiny. **Profylakticky** se antibiotika podávají zdravým jedincům preventivně v situacích nebo fázích života, kdy jsou vystaveni zvýšenému riziku rozvoje bakteriální infekce, které hrozí například při chirurgických zákrocích, vakcinaci, transportu nebo u skotu na konci laktačního období (Schwarz a Chaslus-Dancla, 2001; Schwarz *et al.*, 2001).

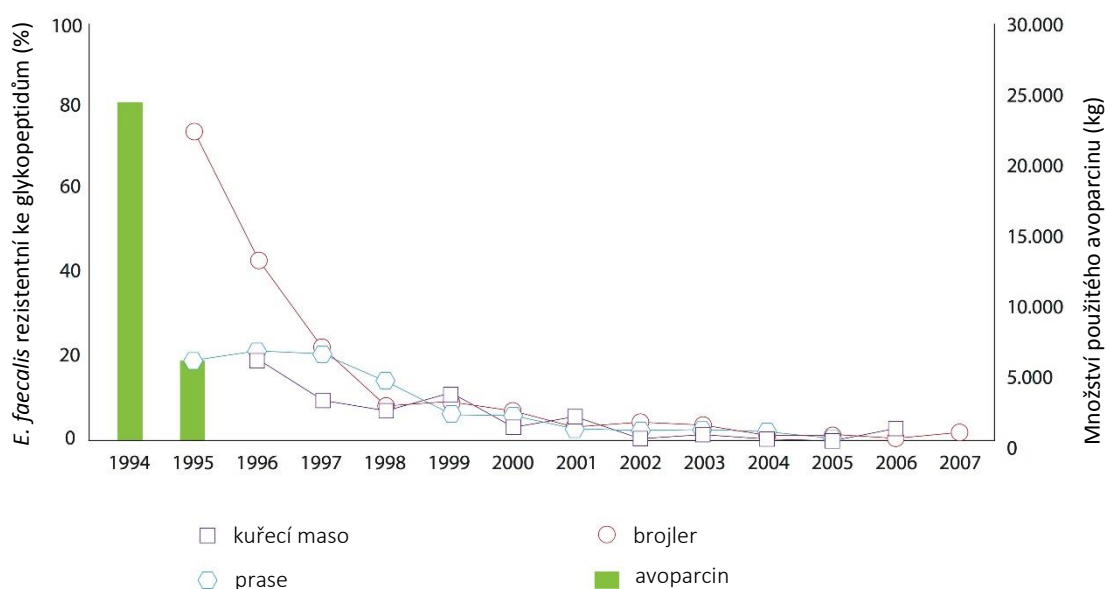
### 3.2.1 Antimikrobiální látky ke stimulaci růstu zvířat

Použití antibiotik ke stimulaci růstu je specifické pro zvířata chovaná pro potravinové účely (Dibner a Richards, 2005). Již v 50. letech byl prokázán vliv přídatku některých antibiotik do potravy na rychlejší růst kuřat, skotu nebo prasat (Jukes *et al.*, 1950; Moore *et al.*, 1946). Spojitost mezi podáváním subinhibičních koncentrací (tj. koncentrací pod hladinou nutnou pro inhibici růstu bakteriální buňky) tetracyklinu pro stimulaci růstu kuřat a izolací bakterií rezistentních k tomuto antibiotiku z medikovaných jedinců byla záhy prokázána několika studiemi (Barnes, 1958; Elliott a Barnes, 1959).

Pozitivní účinek antibiotika na růst je nepřímý a pravděpodobně souvisí s nárůstem produkce vitaminů (např. B12) bakteriemi střevní mikroflóry, eliminací subpopulací patogenních bakterií a zvýšeným vstřebáváním živin ve střevě (Dibner a Richards, 2005).

Obavy z negativních dopadů antibiotických růstových stimulátorů vzrostly v 90. letech. Bylo upozorňováno na souvislost s použitím avoparcinu a nárůstem prevalence enterokoků rezistentních k vankomycinu v chovech drůbeže a prasat a s tím související riziko přenosu těchto multirezistentních bakterií k člověku cestou potravinového řetězce (Dibner a Richards, 2005; Wegener *et al.*, 1999). Tato zjištění vedla v roce 1997 k zákazu avoparcinu ke stimulaci růstu zvířat v celé EU (Dibner a Richards, 2005). Obavy z ekonomických dopadů na potravinovou produkci po ukončení používání růstových stimulátorů nebyly potvrzeny. Studie realizovaná v Dánsku, v jedné z prvních zemí vůbec, která ukončila používání antibiotických růstových stimulátorů, neprokázala signifikantně negativní efekt na výtěžnost potravinové produkce, zdraví zvířat, bezpečnost a cenu potravin pro konzumenta. Naopak demonstrovala mnohé benefity jako vyšší produktivitu, snížení celkové spotřeby antimikrobiálních látek pro veterinární účely a pokles rezistence k antibiotikům v chovech potravinových zvířat (WHO, 2003). Zákaz používání antibiotik ke stimulaci růstu se odrazil v poklesu prevalence rezistence vybraných patogenů člověka a zvířat, např. *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* a *Campylobacter* spp. (Obr. 3; Phillips, 2007; WHO, 2003).

Používání antibiotik pro podporu růstu hospodářských zvířat je ve členských státech EU od 1. ledna 2006 zakázáno. V jiných částech světa s vyspělým chovem potravinových zvířat (např. USA) jsou však antibiotika ke stimulaci růstu i nadále používána.



**Obr. 3:** Výskyt rezistence ke glykopeptidům u *E. faecalis* v Dánsku ve vztahu ke spotřebě avoparcinu v letech 1994–2007

Vytvořeno podle Hammerun *et al.*, 2007.

### 3.2.2 Antibiotika u potravinových zvířat a rizika pro člověka

Většina antibiotik používaná v terapii zvířat náleží do stejných antimikrobiálních tříd jako látky určené k terapii člověka. To znamená, že antibiotika používaná pro veterinární účely mají své příslušné analogy v medicíně humánní včetně antibiotik určených k léčbě závažných a život ohrožujících infekcí. Tato skutečnost se týká rovněž antibiotik klasifikovaných WHO jako kriticky důležitá, kterými jsou některé skupiny beta-laktamů, chinolony, aminoglykozidy a makrolidy (WHO, 2012). Podobně jako při použití antibiotik v terapii člověka existují i ve veterinární medicíně velké geografické rozdíly v celkových spotřebách. Nejvíce antibiotik (vyjádřeno v mg/PCU) je v Evropě pro terapii potravinových zvířat spotřebováno na Kypru, který je následován Itálií, Španělskem, Německem, Maďarskem a Belgií (EMEA, 2013). Například v ČR je podíl antibiotik použitých pro terapii zvířat srovnatelný s množstvím spotřebovaným medicínou humánní, naproti tomu 80 % z celkové spotřeby antibiotik v USA je použito k veterinárním účelům. Velkým problémem jsou země, ve kterých není použití antibiotik regulováno, a nemají vedená spolehlivá data o jejich spotřebě. Volný prodej antibiotik pro veterinární účely bez nutnosti preskripce veterinárním lékařem je praktikován např. v Číně, která je významným producentem masa a akvakultur pro světový trh. Současné tendence (zejména v EU, částečně v USA a Austrálii) vedou ke snižování celkové spotřeby antibiotik u potravinových zvířat a k omezení nebo úplnému ukončení používání kriticky důležitých antibiotik u cílových skupin potravinových zvířat (cefalosporiny vyšších generací, fluorochinolony, aj.). Kromě mnoha národních antibiotických programů (např. DANMAP v Dánsku, SVARM ve Švédsku) byl v EU vytvořen harmonizovaný systém detekce a monitoringu šíření rezistentních bakterií v potravním řetězci (Rozhodnutí EU: 2013/652/EU).

Systém kontroly a regulace použití antibiotik pro veterinární účely je v ČR dobře propracován a od roku 2000 je zajištěn Ústavem pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv (ÚSKVBL). Sleduje se celková spotřeba antimikrobiálních látek na základě dat dostupných od distributorů a prodejců léčiv, spotřeba v rámci jednotlivých skupin antibiotik a použité množství jednotlivých substancí. Veterinárním lékařům pak stanovuje odpovědnost vést evidenci o antibiotické léčbě. Dále uděluje povinnost provádět testy citlivosti původců bakteriálních infekcí na antibiotika, předepisovat antimikrobiální látky na základě diagnózy, druhu zvířete, současného stavu antibiotické rezistence a dále stanovovat optimální dávky a délku léčby zvířete. V neposlední řadě také spolupracovat s chovatelem při tvorbě preventivních postupů proti výskytu infekčních onemocnění.

### 3.2.3 Cefalosporiny a karbapenemy v terapii zvířat

Cefalosporiny jsou klasifikovány jako kriticky důležitá antibiotika humánní medicíny (WHO, 2012). Zároveň jsou nejpoužívanějšími antibiotiky u potravinových zvířat pro léčbu systémových infekcí

(EMEA, 2013). První a druhá generace cefalosporinů (např. cefadroxil, cephapirin, cephalexin, cefalonium, cefazoline, cefacetrile) je široce používaná pro terapii mastitid mléčného skotu. Ceftiofur (III. generace) a cefchinom (IV. generace) jsou určeny čistě pro veterinární použití. Cefchinom je v mnoha zemích autorizován pro terapii respiračních onemocnění skotu a prasat a mastitid mléčného skotu. Ceftiofur se nejčastěji používá pro léčbu respiračních chorob prasat, přežvýkavců a koní a při metritidě skotu (Hornish a Kotarski, 2002). Dvě výše zmíněná antibiotika mají v terapii skotu pro chovatele výhody z důvodu nulové ochranné lhůty. V řadě případů jsou proto upřednostňovány oproti jiným preparátům s obdobnými terapeutickými účinky ale s delší ochrannou lhůtou, kterými jsou např. tetracykliny (Seiffert *et al.*, 2013). Naopak u drůbeže se cefalosporiny používají velmi zřídka (Guardabassi *et al.*, 2008). Diskutabilní oblastí v terapii cefalosporiny je jejich off-label používání. V tomto případě je antimikrobiální přípravek použit na jinou infekci nebo u jiného zvířete než k jakým účelům je registrován. Touto formou však může být antibiotikum aplikováno pouze v případě, že neexistuje jiná dostupná alternativa (EMEA, 2012). V USA a některých státech EU byly touto formou cefalosporiny využívány pro prevenci časných úhynů jednodenních kuřat, k ošetření vajec sprejováním případně *in ovo* a dále k profylaxi septikémie selat (EFSA, 2011). Off-label použití cefalosporinů u skotu, prasat a drůbeže je dnes v USA a EU zakázáno.

Negativním důsledkem cefalosporinů vyšších generací je výrazná selekce bakterií rezistentních k této skupině antibiotik, což bylo experimentálně prokázáno v chovech prasat a skotu (Cavaco *et al.*, 2008; Seiffert *et al.*, 2013). Dopady terapie cefalosporiny byly demonstrovány také naší recentní studií. V chovu mléčného skotu s vysokou spotřebou ceftiofuru byl prokázán zvýšený výskyt izolátů *E. coli* rezistentních k cefalosporinům vyšších generací (39 %) v porovnání s chovem ekologickým (< 1 %), kde není použití těchto antibiotik povoleno (Dolejska *et al.*, 2011c<sup>6</sup>). Podobný trend byl pozorován v chovech prasat. Většina vyšetřených prasat z chovů s častým použitím ceftiofuru byla kolonizována izoláty *E. coli* rezistentními k cefalosporinům, naopak v chovech s nízkou nebo nulovou spotřebou ceftiofuru byl výskyt rezistence k této skupině antibiotik minimální (A. Čížek *et al.*, VFU Brno, nepublikovaná data).

V současné době dochází v řadě zemí k poklesu spotřeby cefalosporinů III. a IV. generace u cílových druhů potravinových zvířat. Použití těchto antibiotik v chovech prasat a skotu zastavily nebo výraznou mírou snížily Francie, Nizozemí a Dánsko (EMEA, 2012). V současné době představují cefalosporiny přibližně 1 % celkové spotřeby antibiotik u zvířat pro potravinové účely v EU. Cefalosporiny vyšších generací jsou rovněž omezovány v terapii zvířat chovaných ze záliby (EMEA, 2012).

Karbapenemy nejsou ve veterinární medicíně autorizovány z důvodu rizika selekce a dalšího šíření bakterií rezistentních k tomuto kriticky důležitému antibiotiku určenému pro léčbu život ohrožujících infekcí člověka. Off-label jsou používány v terapii malých zvířat a koní při léčbě močových a pooperačních infekcí vyvolaných multirezistentními bakteriemi (Gibson *et al.*, 2008; Weese *et al.*, 2011). Problematika rezistence ke karbapenemům se však začíná týkat i veterinární sféry. Bakterie produkující

karbapenemázy byly u potravinových zvířat a zvířat chovaných ze záliby izolovány a toto téma bude blíže rozpracováno v kapitole 5.1.4.6.

### 3.2.4 Fluorochinolony v terapii zvířat

Na rozdíl od cefalosporinů vyšších generací a karbapenemů jsou chinolony zvířatům podávány kromě formy injekční také ve vodě či krmivu. Druhý způsob aplikace je obecně čtenější (EMEA, 2012). FQ jsou používány v terapii průjmových a respiračních onemocnění mláďat i starších zvířat (skot, prasata, drůbež), v případě prasat také při mastitidách a metritidách. Jsou lékem volby pro prevenci koliseptikémie u jednodenních kuřat. Používají se rovněž pro léčbu širokého spektra infekcí zvířat chovaných ze záliby, u kterých je však dokumentováno časté off-label použití preparátů autorizovaných pro humánní medicínu (Hooper a Rubinstein, 2003). FQ by měly být používány pouze pro léčbu vážných bakteriálních infekcí, jako mastitid, septikémií, gastroenteritid a respiračních onemocnění vyvolaných gramnegativními bakteriemi a to jen v případě, že není k dispozici jiná léková alternativa a zároveň byla prokázána citlivost daného patogena laboratorním vyšetřením. V chovech ryb patří chinolony k nejvýznamnějším antibiotikům především díky širokému spektru účinku zahrnující grampozitivní i gramnegativní bakterie (Quesada *et al.*, 2013). Jejich nadměrné použití v akvakulturách je dnes široce diskutováno.

Chinolony nachází své uplatnění při skupinové léčbě zvířat, která je spojena s mnoha úskalími. V důsledku tohoto typu léčby se často do těla zvířete dostanou pouze subinhibiční koncentrace antibiotika, které nejsou schopné usmrtit infekční agens a navíc zvyšují riziko rozvoje rezistence. Rezistence k chinolonům vzniká mimo jiné v důsledku tvorby bodových mutací v cílových strukturách antibiotika, které pak není v této pozměněné formě molekulou chinolonu rozpoznáno (Hooper, 2003). Mechanizmy rezistence k chinolonům jsou blíže představeny v kapitole 5.2. Fluorochinolony tvoří 3 % celkové spotřeby antimikrobiálních látek pro potravinové účely v EU (EMEA, 2012). Nejvyšší spotřebu uvádí Maďarsko, Portugalsko a Polsko (EMEA, 2012). Naopak v Austrálii nebyly chinolony pro použití u potravinových zvířat nikdy autorizovány, což se odráží v nízkém výskytu bakterií rezistentních k této skupině antimikrobiálních látek v porovnání se světem (Gottlieb *et al.*, 2008; Turnidge *et al.*, 2003; Unicomb *et al.*, 2006). Největší spektrum chinolonových preparátů je autorizováno v Asii (Hooper a Rubinstein, 2003; Quesada *et al.*, 2013). Z důvodu zvyšující se spotřeby FQ, jejich důležitosti pro humánní medicínu a současnému trendu v nárůstu rezistence (např. u *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *E. coli*) je možné sledovat iniciativy vedoucí k omezení jejich spotřeby nebo úplnému zákazu pro potravinové účely. Použití fluorochinolonů u drůbeže ukončilo několik států jako např. USA, Dánsko, Finsko a nedávno také Velká Británie.



### 3.3 Vliv antimikrobiálních látek na životní prostředí

Kontaminace životního prostředí farmaceuticky aktivními sloučeninami představuje závažný problém, který nabývá na svém významu. Díky rozvoji citlivých analytických metod jsou tyto látky prokazovány ve vodě, v půdě, v sedimentech a kalech. Prostředí je rovněž zatíženo antibiotiky.

Antibiotika, která se dostávají do prostředí činností člověka, mohou mít zásadní dopad na vodní a suchozemské organizmy. Působí na mikrobiální společenstva v odpadních vodách a mohou tak narušit proces biodegradace (Kuemmerer, 2009a, b). Antibiotika ovlivňují celkovou diverzitu mikrobiálních společenstev a biogeochemické funkce ekosystému. Selektují bakterie rezistentní k antibiotikům a podporují výměnu genů a mobilních genetických elementů (MGE) spojených s antibiotickou rezistencí (Gilling, 2013). Subinhibiční koncentrace antibiotik významně působí na bakteriální buňku, aniž by došlo k omezení jejího růstu. Antibiotika v nízkých koncentracích zvyšují bazální frekvenci mutací, ovlivňují transkripci genů vedoucí ke vzniku adaptivních fenotypů (např. tvorba bičků, schopnost kolonizovat biotické/abiotické povrchy; Seshasayee *et al.*, 2006). Vedle antibiotik se na selekci rezistentních bakterií podílí také další kontaminanty v prostředí, jako jsou těžké kovy a dezinfekční látky. Geny kódující rezistenci k těmto látkám se mohou nacházet na stejných MGE jako geny pro rezistenci k antibiotikům, proto selekce bakterií v přítomnosti dezinfekčních látek a těžkých kovů může současně navyšovat abundanci genů rezistence k antibiotikům.

Většina antimikrobiálních látek není plně makroorganizmem metabolizována, je vylučována v aktivní formě močí a trusem do odpadového systému a následně je zachytávána v čistírnách odpadních vod (Kummerer a Henninger, 2003). Odhaduje se, že 30-90 % spotřebovaných antibiotik pro humánní i veterinární účely jsou z těla vylučovány v nezměněné formě (Sarmah *et al.*, 2006). Odstranění antibiotik procesem používaným v čistírnách odpadních vod je pouze částečné a závisí především na charakteru použitého procesu a fyzikálně-chemických vlastnostech dané sloučeniny (Lindberg *et al.*, 2007). Cestou odpadních vod mohou antibiotika kontaminovat povrchové nebo podzemní vody a usazovat se v sedimentech. V nemocničních odpadních vodách je možné nalézt výrazně vyšší koncentrace antibiotik v porovnání s městskými odpady. V aktivovaném kalu v čistírnách odpadních vod byly v účinných koncentracích nalezeny, např. FQ, makrolidy a cefalosporiny (Baquero *et al.*, 2008). V řadě zemí rozvojového světa však účinný sanitační systém zcela chybí a dá se tedy předpokládat zásadnější dopad odpadů na životní prostředí. Velké množství antibiotik se dostává do vodních ekosystémů také při průmyslové výrobě antibiotik (Gillings, 2013).

Významným zdrojem antibiotik pro prostředí jsou také odpady ze zemědělské produkce. Rizikovým procesem je například hnojení půd zvířecími výkaly, které je zdrojem antibiotik a rezistentních bakterií pro půdní ekosystém. Antibiotika mohou v půdě dlouhodobě přetrvávat a kontaminovat

zemědělské plodiny (Boxall *et al.*, 2006). V období dešťů mohou být odnášena z polí do řek nebo mohou prosakovat do vod podzemních (Kuemmerer, 2009a, b). Důležitým zdrojem antibiotik a rezistentních bakterií pro vodní ekosystém představují akvakultury. Intenzivní chov ryb spojený s nedodržením vhodných podmínek a nadužíváním antimikrobiálních látek má významné dopady na životní prostředí (Quesada *et al.*, 2013).

Rizikovou skupinu představují FQ, které jsou z velké části v nezměněné podobě vylučovány močí. Proces čištění v čistírnách odpadních vod (ČOV) odstraní pouze 80 % z jejich celkového množství (Sukul a Spiteller, 2007). FQ se navíc vyznačují schopností silné absorpce na minerální a organické látky ve vodním prostředí, v půdě a sedimentech. Absorpcí se snižuje volná koncentrace antibiotika, zároveň dochází ke zpomalení jeho biologického odbourávání, které může vést k dlouhodobé perzistenci antibiotika v prostředí. Fluorochinolony byly nalezeny v potenciálně účinné koncentraci v aktivovaném kalu z ČOV (Baquero *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 2005). Byla také demonstrována toxicita fluorochinolonů na vodní organizmy (Robinson *et al.*, 2005).



## 4. Antimikrobiální rezistence





Antibiotická rezistence bakterií představuje jeden z nejzávažnějších problémů současné medicíny. Infekce vyvolané multirezistentními bakteriemi vyžadují výrazně vyšší náklady na léčbu a jsou spojeny s vyšší mortalitou pacientů. Antibiotická rezistence je většinou vnímána jako důsledek nesprávného používání a nadužívání antibiotik. Problém je však mnohem komplexnější, zahrnuje dopady celkové spotřeby antibiotik v humánní i veterinární sféře, v zemědělství a mnoho dalších faktorů včetně vlivu prostředí. Nedostatečná hygiena a sanitace v některých zemích vedou ke snadnému šíření patogenních a rezistentních bakterií.

Antibiotická rezistence je široký problém s ohledem na kritéria posuzování, která zahrnují hledisko mikrobiologické, klinické nebo genetické. Obecně můžeme antibiotickou rezistenci definovat jako schopnost bakterie odolávat účinku antibiotika, ke kterému byla dříve citlivá. Kmen je z mikrobiologického hlediska rezistentní, pokud je schopen růstu ve vyšší koncentraci antibiotika v porovnání s fylogeneticky příbuznými kmeny. Z klinického pohledu je mikroorganismus rezistentní, pokud existuje vysoká pravděpodobnost selhání terapie i v případě použití maximální možné dávky antibiotika. Z hlediska genetického je rezistence spojena s přítomností genu rezistence.

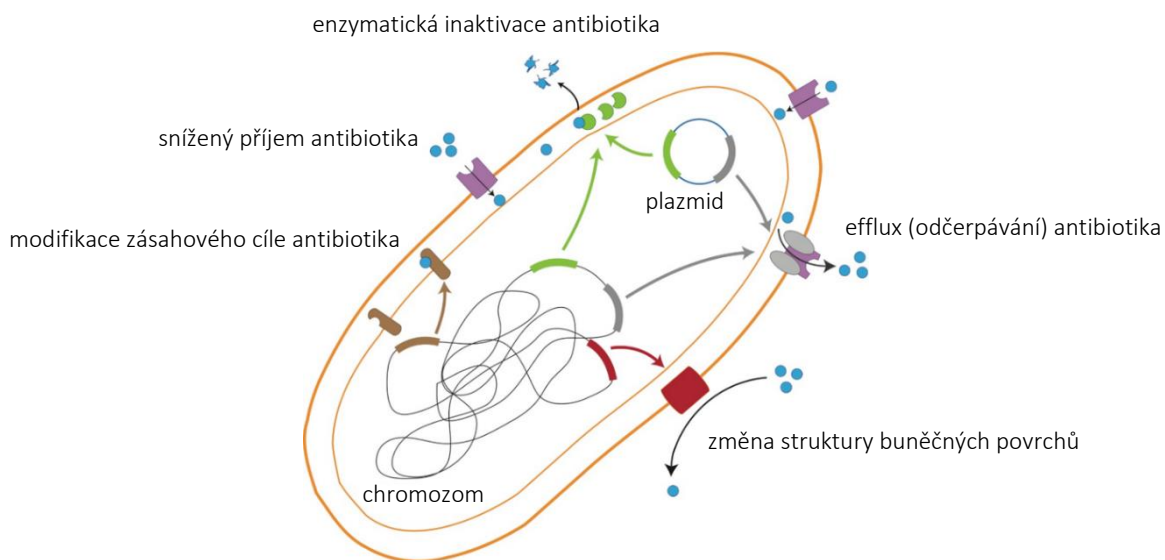
Rezistence mikroorganismů kvíce antimikrobiálními látkám představuje rostoucí klinický problém. Komplikuje empirickou léčbu infekcí a prodlužuje tak čas před zahájením antimikrobiální terapie. Současně limituje možnosti použitelných antibiotik, která by si zachovávaly účinnost. V literatuře se setkáváme z řadou pojmů, které tyto vysoce rezistentní bakterie definují (Magiorakos *et al.*, 2012). Multirezistence (MDR – „multidrug resistance“) je chápána jako odolnost alespoň k jedné látce ze tří a více antibiotických skupin. Multirezistentní bakterie zároveň představují vděčné příjemce různých MGE, jimiž mohou získat další geny, prostřednictvím kterých si rozšiřují svůj rezistentní fenotyp. Bakterie s rozšířenou neboli extenzivní rezistencí (XDR – „extensive drug resistance“) si zachovávají citlivost pouze k jedné nebo maximálně dvěma antibiotickým skupinám. V extrémním případě bakterie nabude panrezistentního profilu (PDR – „pandrug resistance) a je schopná odolávat všem dostupným antimikrobiálními látkám.

#### 4.1 Mechanizmy antibiotické rezistence a jejich genetický základ

Bakterie si vyvinuly různé mechanismy jak neutralizovat účinek antimikrobiální látky. Vedle primární rezistence, která je dána přirozenou necitlivostí bakterie (např. absence zásahových struktur antibiotika), rozlišujeme rezistenci získanou, kdy se původně citlivá bakterie stává rezistentní k danému antibiotiku nebo skupině antibiotik. Další kategorií představuje rezistence adaptivní. Jedná se o přechodnou reverzibilní rezistenci, která vzniká změnou v genové expresi jako důsledek působení vnějších faktorů (stres, nedostatek živin, subinhibičních koncentrací antibiotik atd.). Bakteriální buňka se

může bránit účinku antibiotika enzymatickou inaktivací, sníženým příjmem nebo aktivním vylučováním antibiotika, případně modifikací jeho cílových míst. Méně časté mechanismy zahrnují ochranu cílových struktur antibiotika nebo zvýšení jejich počtu. Mechanismus rezistence může být specifický a jeho primární funkcí je tedy zprostředkování rezistence pouze pro konkrétní toxickou látku nebo nespecifický, při kterém daná struktura odpovědná za rezistenci k antibiotiku plní v bakteriální buňce i jiné funkce (Aarestrup, 2006; Mascaretti, 2003). Přehled základních mechanismů bakteriální rezistence k antibiotikům je shrnut na **Obr. 4**.

Genetický základ získané rezistence k antibiotikům spočívá v mutačních změnách zásahových míst antibiotika nebo získáním cizorodého genetického materiálu, který zajišťuje profil rezistence. Nejvýznamnějšími jsou mechanismy vázané na mobilní genetické elementy (plazmidy, transpozony, integrony), které umožňují předávání determinant rezistence mezi jednotlivými bakteriálními buňkami. Tento proces toku genů je vysoce efektivním nástrojem v šíření antibiotické rezistence v bakteriálních populacích.



**Obr. 4:** Základní mechanismy rezistence rezistence bakterií k antibiotikům

## 4.2 Prostředí v kontextu původu antibiotické rezistence

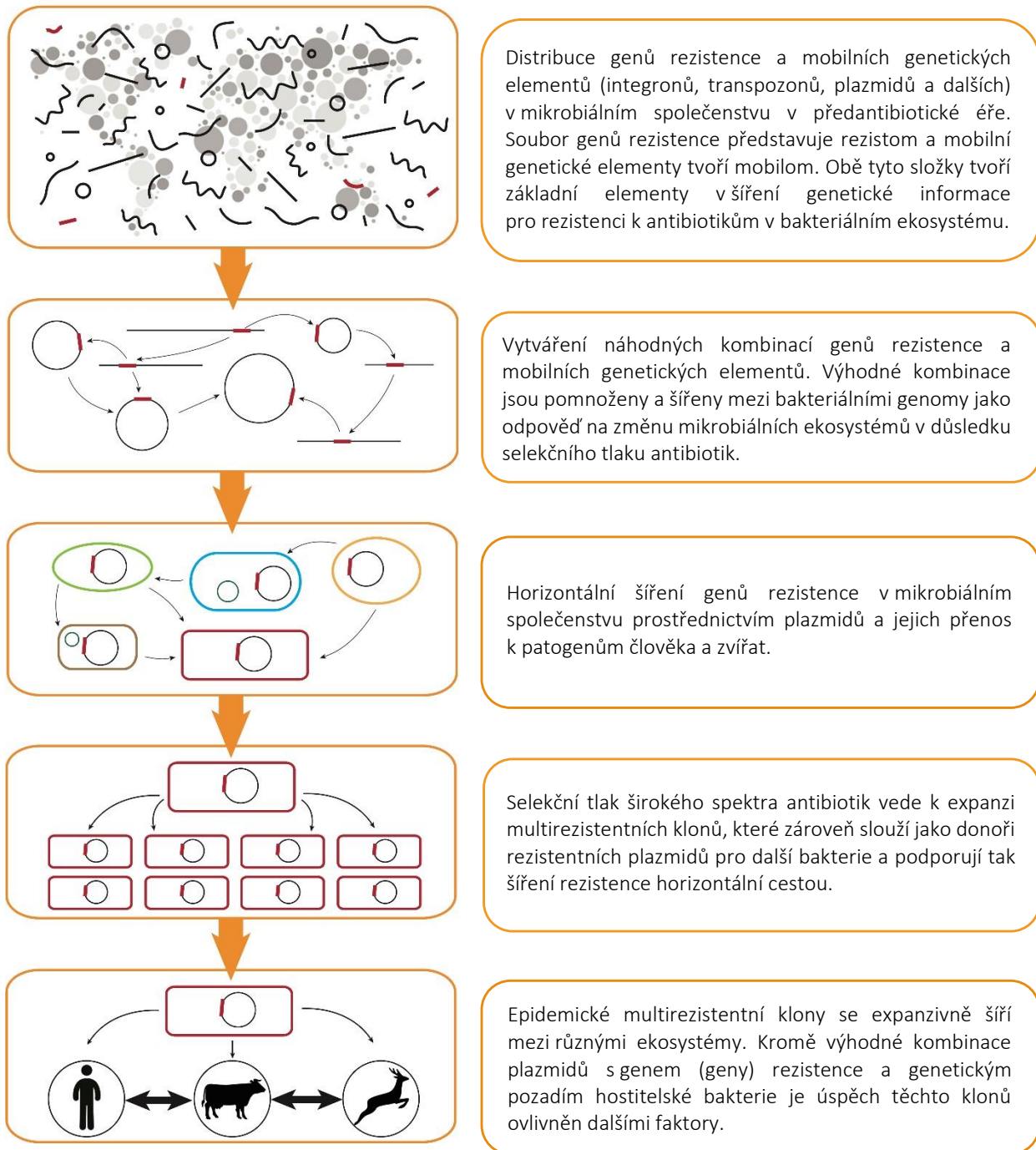
V přirozených ekosystémech plní antibiotika dvojí funkci. V první řadě, podobně jako při jejich klinickém použití, negativně ovlivňují růst mikroorganismů. Antibiotika vznikající v prostředí činností přirozených producentů vykazují určitou míru antimikrobiálního účinku, v porovnání s terapeutickou aplikací je ale velmi zřídka dosaženo hladin nutných pro inhibici růstu. V nízkých koncentracích působí

antibiotika jako signální molekuly, ovlivňují transkripci genů a podílí se na různých typech mezibuněčných interakcí (Linares *et al.* 2006). Více než 80 % antibiotik používaných pro terapii má své analogy v prostředí. Nejvýznamnější producenty nacházíme mezi půdními mikroorganismy, především aktinomycetami (Kieser, 2000). Předpokládá se tedy, že půdní prostředí je rovněž primárním zdrojem genů rezistence pro patogenní i komenzální bakterie zvířat a člověka. Půdní bakterie a plísň obsahují geny rezistence jako přirozené mechanismy sebeobrany před nežádoucím účinkem antibiotika, které produkují. Tyto protektivní geny přirozených producentů vykazují vysokou míru sekvenční podobnosti s geny rezistence klinických izolátů bakterií (Benvenis a Davies, 1973; Marshall *et al.*, 1997). Předpokládá se však, že geny rezistence mohly v původních mikroorganismech plnit i jiné primární funkce (metabolické, strukturní, signální) vedle odolnosti k antibiotikům (Fajardo a Martinez, 2008).

Současný výzkum je zaměřen na hledání původu jednotlivých mechanismů rezistence (D'Costa *et al.*, 2006). Původ rezistence u přirozených rezervoárů v prostředí se podařilo vypátrat i v případě klinicky významné rezistence k cefalosporinům, karbapenemům, aminoglykozidům, fluorochinolonům a vankomycinu (Benvenis a Davies, 1973; Gudeta *et al.*, 2016; Marshall *et al.*, 1997; Poirel *et al.*, 2005). V této oblasti výzkumu nachází uplatnění především funkční metagenomika (Riesenfeld *et al.*, 2004). V metagenomických datech půdních mikrobiomů a mořských sedimentů byly identifikovány neobvyklé geny s beta-laktamásovou aktivitou, nové geny rezistence k aminoglykozidům a tetracyklinům (Allen *et al.*, 2009; Koenig *et al.*, 2008; Michael *et al.*, 2004; Riesenfeld *et al.*, 2004). Je vysoce pravděpodobné, že v přirozených ekosystémech existuje nespočetné množství dosud nepopsaných genů, které tvoří komplexní antibiotický rezistom. Pojem rezistom je chápán jako soubor všech genů v bakteriálním ekosystému, které mohou přispívat k rezistentnímu fenotypu (Gillings, 2013). Do současnosti bylo popsáno okolo dvaceti tisíc různých genů rezistence, které ale nejspíše představují pouhý zlomek skutečné velikosti rezistomu. Rezistom v prostředí představuje zdroj genetických determinant rezistence pro významné humánní patogeny (Nesme a Simonet, 2015).

Geny rezistence k antibiotikům byly u bakterií rozšířeny i v předantibiotické éře, což dokumentuje například recentní výzkum permafrostu a izolovaných jeskynních mikrobiálních společenství (Bhullar *et al.*, 2012; D'Costa *et al.*, 2011). Zásadní význam v jejich přenosu z přirozených rezervoárů v prostředí k bakteriím s klinickým významem měly MGE. Horizontální přenos genetické informace zajištěný MGE je přirozený proces bakteriálních populací, jeho dynamika však byla v antibiotické éře silně narušena. Selekční tlak antibiotik vyvolá pomnožení bakterií s výhodnou kombinací genů rezistence nesených na MGE a zároveň podporuje jejich přenos na další bakterie v mikrobiálním společenstvu. Proces vzniku a šíření rezistence k antibiotikům je přiblížen na **Obr. 5**. Pro soubor všech MGE v bakteriálním ekosystému je používán termín mobilom. Mobilom napomáhá vytvářet vysokou diverzitu prokaryotických genomů

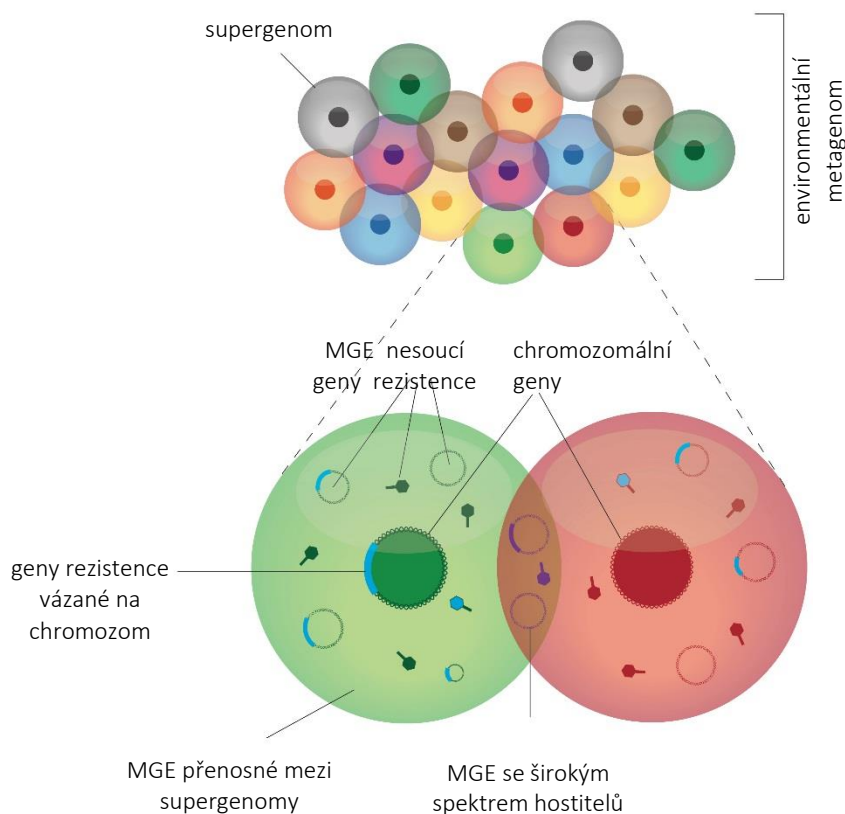
(Gillings, 2013). Koncept uspořádání bakteriálních genomů v mikrobiálním společenství ve vztahu k mobilomu a rezistomu je vysvětlen na **Obr. 6**.



**Obr. 5:** Proces vzniku a šíření rezistentních bakterií s klinickým významem

Volně podle Stokes a Gillings, 2011.





**Obr. 6:** Uspořádání bakteriálních genomů v ekosystému, koncept rezistomu a mobilomu ve vztahu k šíření rezistence k antibiotikům

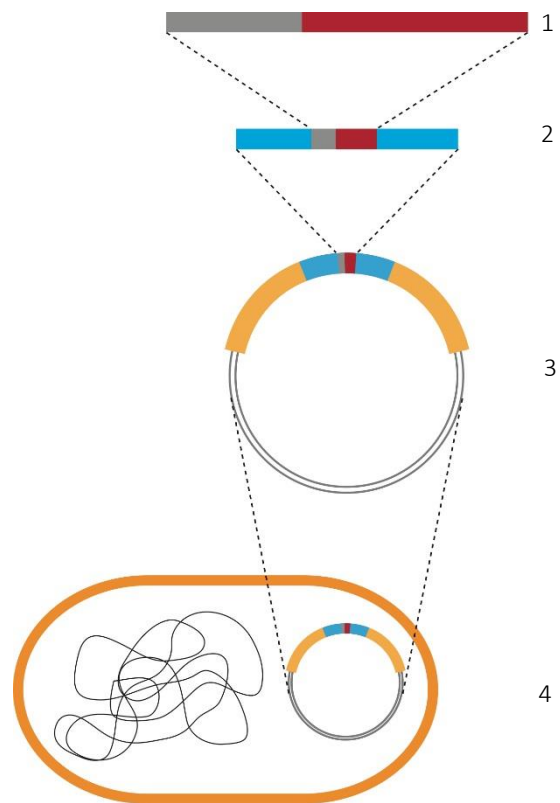
Vytvořeno podle Norman *et al.*, 2009. Geny rezistence nesené MGE (zahrnující inzerční sekvence, transpozony, plazmidy, bakteriofágy atd.) nebo vázané na bakteriální chromozom jsou součástí komplexní genetické informace prokaryotických buněk tvořící dané společenství. Tato souborná genetická informace bakteriálního společenství je označována jako supergenom (na obrázku vyznačen barevným kruhem). Všechny supergenomy daného prostředí pak tvoří environmentální metagenom. Genetická informace ve formě MGE může být přenášena mezi bakteriemi v rámci daného supergenomu. Některé MGE disponují širokým hostitelským spektrem a mohou se šířit mezi různými supergenomy (na obrázku se tento soubor sdílených genů nachází v místě překryvu dvou různých supergenomů).

### 4.3 Jednotky v šíření antibiotické rezistence

Aby se mohl gen rezistence efektivně šířit mezi bakteriemi, musí vytvářet kombinace s mobilní DNA. Výhodná sdružení genů rezistence a MGE (inzerčních sekvencí, transpozonů, konjugativních plazmidů) podporují šíření klinicky významné rezistence v mikrobiálních společenstvech. Úseky DNA nesoucí geny rezistence se vyznačují vysoce mozaikovým charakterem, který podporuje další přestavby a výměny genetické informace mezi genomy a vede tak ke vzniku výhodnějších kombinací. Horizontální přenos genů rezistence nesených plazmidy ke komenzálním i patogenním bakteriím adaptovaným na člověka a zvířata

spolu se selekčním tlakem antibiotik dal vzniku úspěšným bakteriálním liniím (Stokes a Gillings, 2011). V epidemiologii rezistence ke klinicky významným antibiotikům hrají úlohu dvě základní složky – úspěšný bakteriální klon a vysoce přenosný mobilní element, nejčastěji v podobě konjugativního plazmidu. Obě tyto složky utváří současný obraz antibiotické rezistence a významně se podílí na jejím rostoucím charakteru. Tvorba úspěšných kombinací genů rezistence s MGE a asociace s vhodnými bakteriálními kmeny stojí za úspěchem mnoha rezistentních mechanismů včetně beta-laktamáz. Horizontální přenos genů rezistence je považován za hlavní hnací motor narůstající rezistence k antibiotikům. Typická hierarchie těchto tří podjednotek „gen rezistence - mobilní element - bakteriální hostitel“ v šíření antibiotické rezistence je představena na **Obr. 7**.

Pro úspěšné linie bakterií, které se dnes expanzivně šíří v různých ekosystémech po celém světě, je používán termín epidemický klon. Klon je definován jako soubor bakteriálních izolátů, které ačkoliv byly získány z různých zdrojů, odlišných míst a v různém čase vykazují významné fenotypové a genotypové charakteristiky (van Belkum, 2007). Příslušníci daného klonu respektive klonální linie pochází z jednoho společného předka. Významným mezníkem ve studiu genetické variability populace enterobakterií přispěla metoda multilokusové sekvenční analýzy neboli MLST („multilocus sequencing typing“). Tato vysoce diskriminační typizační metoda umožnila identifikovat významné multirezistentní klony neboli sekvenční typy (ST) *E. coli* a *K. pneumoniae*, které byly izolovány z různých zdrojů po celém světě (Diancourt *et al.*, 2005; Wirth *et al.*, 2006; Woodford *et al.*, 2011). Epidemické klony zároveň podporují další šíření genů rezistence v bakteriálních společenstvech. Díky jejich vysoké prevalenci a obecnému rozšíření mají také více příležitostí fungovat jako donoři genetického materiálu a přenášet geny rezistence na jiné bakterie.



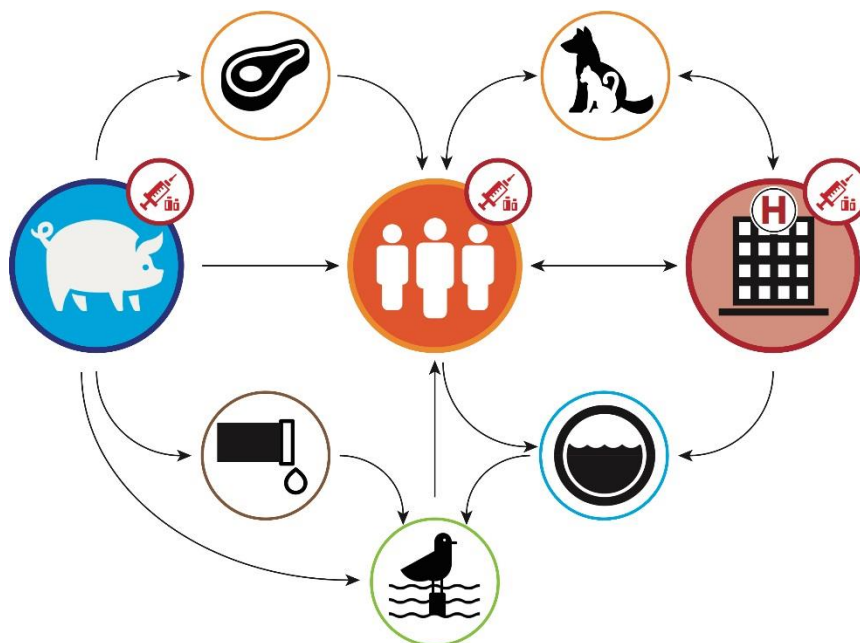
**Obr. 7:** Hierarchické uspořádání jednotek v šíření rezistence k antibiotikům na příkladu širokospektrých beta-laktamáz

Vytvořeno podle Canton *et al.*, 2012b.

- (1) inzerční sekvence sdružená (šedá) s genem rezistence (červená, např. *ISEcp1-bla<sub>CTX-M-15</sub>*)
- (2) transpozon (modrý segment) nesoucí inzerční sekvenci s genem rezistence (např. Tn3)
- (3) konjugativní plazmid s variabilní oblastí (barevně označená) nesoucí geny rezistence k antibiotikům
- (4) epidemický klon (např. *E. coli* ST131)

#### 4.4 Cesty šíření rezistentních bakterií

Rezistentní bakterie a geny rezistence nesené MGE se šíří různými cestami (**Obr. 8**). Jednotlivé složky a směry přenosu utváří komplexní charakter současné epidemiologie antibiotické rezistence. Geny rezistence, MGE a bakteriální buňky jako nositelé této genetické informace jsou sdíleny všemi složkami tohoto systému. V kontextu šíření antibiotické rezistence používáme termín „jedno zdraví“ neboli „One Health“.



**Obr. 8:** Selektce a přenos rezistentních bakterií a genů rezistence mezi člověkem, zvířaty a prostředím

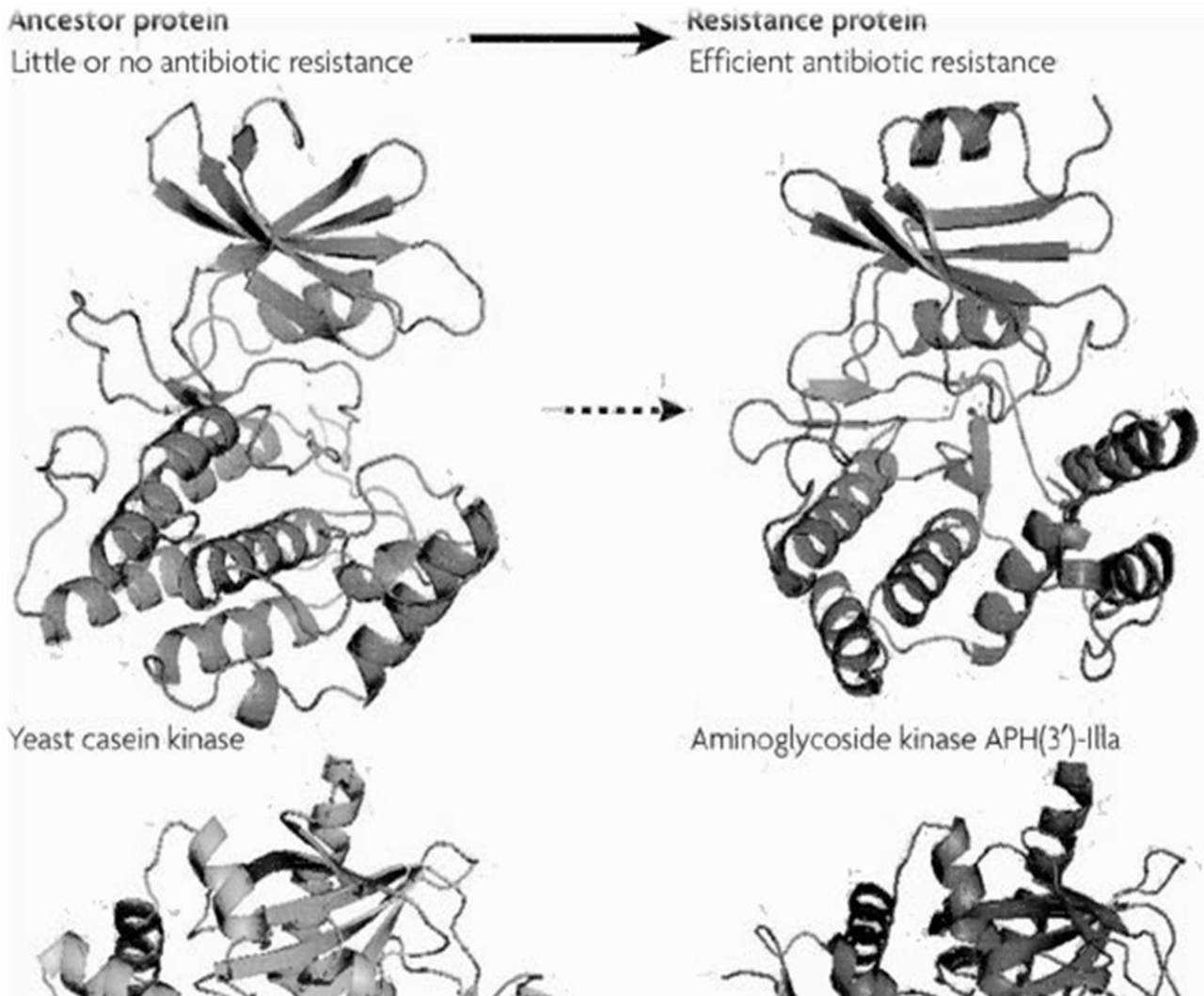
Hlavními místy selektce rezistentních bakterií jsou přirozeně ta, která jsou pod intenzivním selekčním tlakem antibiotik (**Obr. 8**). Široké spektrum antibiotik používané v terapii infekčních onemocnění v nemocnicích podporuje vznik a udržování multirezistentních patogenů. Antibiotika působí jako stresové faktory indukující SOS reakci s rozsáhlými účinky na bakteriální genom. Podporují horizontální přenos genů rezistence a také zvyšují rekombinaci genomu vedoucí například ke vzniku nových kombinací genových kazet integronů (Guerin *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2004). Rezistentní bakterie jsou rovněž selektovány použitím antibiotik v komunitě. Enterobakterie s klinicky významnými mechanismy rezistence komplikují úspěšnost terapie komunitně získaných infekcí (Laupland *et al.*, 2008a).

Ve veterinární oblasti je nejvyšší podíl antibiotik použit v chovech potravinových zvířat při terapii a prevenci bakteriálních infekcí. Veterinární antibiotické přípravky náleží do různých funkčních skupin včetně těch, které patří v humánní medicíně mezi kriticky důležité. Zvířata mohou pro člověka

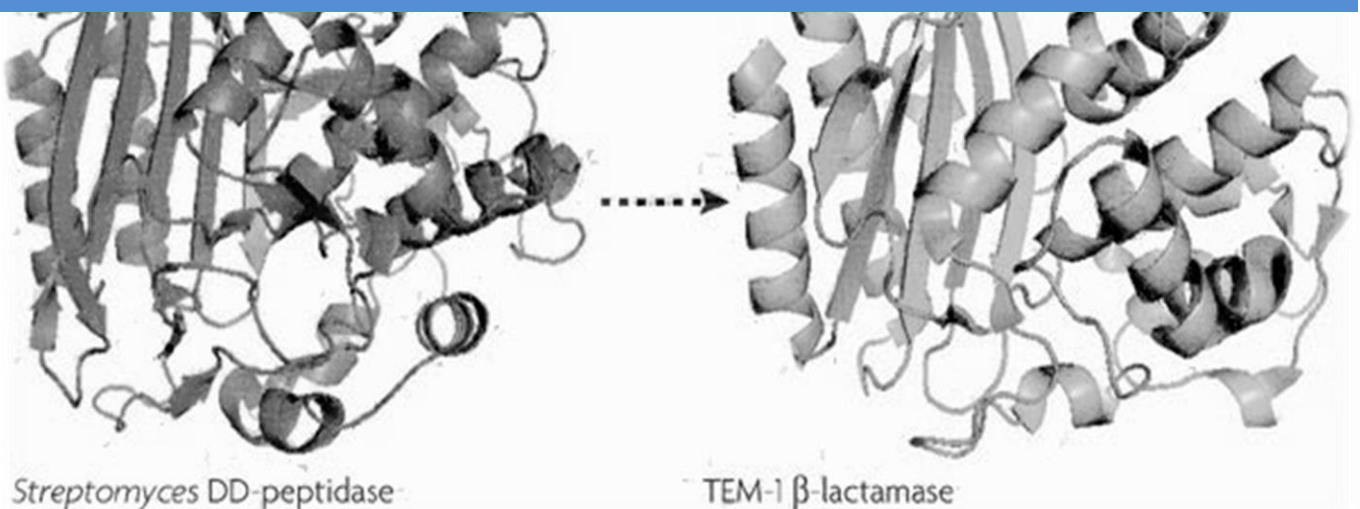
představovat nepřímý zdroj rezistentních bakterií prostřednictvím potravin živočišného původu. Mohou být rovněž zdrojem přímým, při kterém se tyto bakterie případně jejich genetická informace pro rezistenci přenesou ke člověku cestou fyzického kontaktu se zvířetem například v rámci vykonávání profese ošetřovatele nebo veterinárního lékaře (da Costa *et al.*, 2013; de Been *et al.*, 2014; Moodley a Guardabassi, 2009). Multirezistentní bakterie izolované ze zvířat chovaných ze záliby (psů, koček, koní) často náleží mezi významné humánní patogeny. Sdílení identických kmenů rezistentních bakterií mezi člověkem a „domácím mazlíčkem“ je pouhým odrazem jejich blízkého kontaktu (Ewers *et al.*, 2012).

Významnou složkou v cirkulaci antibiotické rezistence představuje také prostředí. Chlévská mrva z farem zavážená na pole jako hnojivo kontaminuje zemědělskou půdu a do půdního mikrobiomu vnáší rezistentní bakterie a geny rezistence. Mnohonásobné zvýšení abundance klinicky významných genů rezistence v zemědělské půdě po aplikaci chlévské mrvy a jejich dlouhodobá perzistence byla zdokumentována (Cheng *et al.*, 2016; Pourcher *et al.* 2014; Ruuskanen *et al.* 2016). Vodní ekosystémy jsou rovněž zatíženy odpadními produkty humánního i veterinárního původu (da Costa *et al.*, 2013; da Costa *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012). Čistírny městských odpadních vod představují pro prostředí hlavní antropogenní zdroje antibiotik a bakterií rezistentních k antibiotikům včetně významných patogenů (Masarikova *et al.*, 2016<sup>31</sup>; Dolejska *et al.*, 2011b<sup>9</sup>). Subinhibiční koncentrace antibiotik přítomné v odpadních vodách se podílí na selekci rezistentních bakterií, které se následně šíří do vodních toků. Prostředí ČOV rovněž disponuje ideálními podmínkami pro výměnu genetické informace mezi bakteriemi, včetně genů rezistence k antibiotikům (Rizzo *et al.*, 2013).

Rezistentní bakteriální kmeny byly izolovány také z různých druhů volně žijících zvířat. Prevalence rezistentních bakterií u volně žijících zvířat je závislá na mnoha faktorech. Mezi ty nejdůležitější patří potravní návyky daného druhu a charakter konkrétní lokality. Druhy, které mají tendenci shlukovat se do měst, do okolí farem, pohybovat se v okolí ČOV a přizívat se na komunálních skládkách, jsou v tomto ohledu vystaveny vyššímu riziku. Výskyt rezistentních bakterií ve volné přírodě je v podstatě odrazem lidské činnosti a představuje další druh znečištění životního prostředí (Guenther *et al.*, 2011). Skutečnost, že rezistentní bakterie byly prokázány také u zvířat žijících v prostředí s minimálním vlivem antropogenních aktivit, podtrhuje komplexnost tohoto problému (Albrechtova *et al.*, 2014<sup>22</sup>; Bonnedahl *et al.*, 2014; Janatova *et al.*, 2014<sup>23</sup>). Problematika rezistentních bakterií u volně žijících zvířat v kontextu šíření širokospektrých beta-laktamáz bude představena v kapitole 7.8.



## 5. Mechanizmy rezistence ke klinicky významným antibiotikům





Narůstající rezistence gramnegativních bakterií k antimikrobiálním látkám představuje jeden z nejvýznamnějších problémů současné medicíny. Z důvodu klinické významnosti pro humánní i veterinární medicínu je dnes pozornost soustředěna na beta-laktamová antibiotika se širokým spektrem účinku (cefalosporiny, karbapenemy) a fluorochinolony. Narůstající rezistence patogenů zvířat a člověka k těmto antibiotikům výrazně komplikuje úspěšnost léčby infekčních onemocnění. Bakterie disponují mnoha nástroji, jak inaktivovat inhibiční účinek těchto skupin antibiotik. Následující odstavce jsou věnovány stručnému přehledu těchto rezistentních mechanismů. Pozornost je soustředěna na mechanismy vázané na mobilní genetické elementy, které zajišťují efektivní šíření genů rezistence mezi bakteriemi a mají tedy vyšší epidemiologickou významnost v porovnání s chromozomálně zakotvenou rezistencí. Text je doplněn o aktuální informace v epidemiologii daných mechanismů rezistence ve světě. Molekulární epidemiologie širokospektrých beta-laktamáz, která je hlavní výzkumnou oblastí autora a stěžejním bodem této práce, je podrobně zpracována v kapitole 7.

## 5.1. Mechanizmy rezistence k cefalosporinům a karbapenemům

Produkce beta-laktamázy je nejvýznamnějším nástrojem odolnosti gramnegativních bakterií k cefalosporinům a karbapenemům. Jedná se o enzymy schopné degradovat beta-laktamová antibiotika vedoucí ke ztrátě jejich inhibičního účinku na bakteriální buňku. Beta-laktamázy byly identifikovány u mnoha bakteriálních druhů a představují závažný problém moderní medicíny. V dnešní epidemiologii antibiotické rezistence jsou nejvýznamnější širokospektré beta-laktamázy, pro které je charakteristické jejich globální a rostoucí rozšíření zejména u zástupců čeledi Enterobacteriaceae. V posledních letech máme možnost být svědkem celosvětové expanze novějších typů beta-laktamáz – karbapenemáz, které degradují prakticky všechna beta-laktamová antibiotika včetně rezervních karbapenemů. Geny pro klinicky významné beta-laktamázy jsou ve většině případů nesené MGE, zejména plazmidy a transpozony, které usnadňují jejich další šíření v bakteriálních populacích a stojí za současným úspěchem některých variant těchto enzymů.

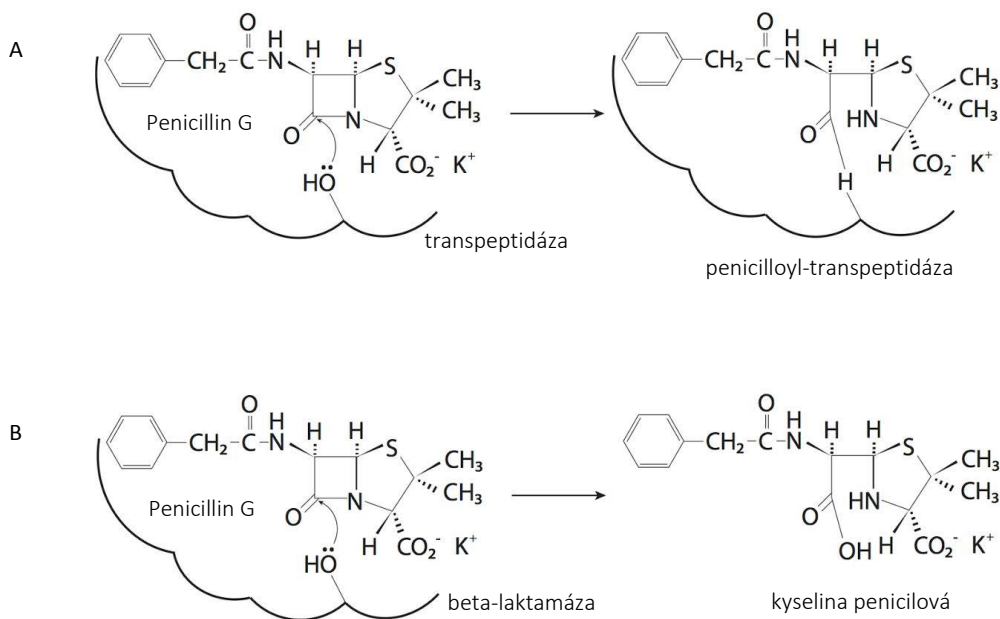
Bylo popsáno několik dalších mechanismů rezistence k beta-laktamovým antibiotikům vedle produkce beta-laktamáz, které zahrnují sníženou propustnost buněčné stěny v důsledku změny exprese porinů (Martinez-Martinez, 2008; Nikaido, 2003) nebo aktivní vylučování antibiotika prostřednictvím efluxních pump. Tyto transportní pumpy mají obvykle charakter multirezistentních (MDR) efluxních pump a jsou schopné vedle beta-laktamů pokrýt poměrně velkou škálu různých skupin antimikrobiálních látek. Nejčastěji je u Enterobacteriaceae nacházena tříšložková MDR pumpa AcrAB-TolC (Nikaido a Takatsuka, 2009). Tyto dva mechanismy rezistence k beta-laktamům jsou obvykle kódovány chromozomálními geny,



v porovnání s geny beta-laktamáz vázanými na plazmidy je jejich epidemiologický význam tudíž omezený. Negativním důsledkem rezistentních mechanismů spojených s bakteriální membránou a transportem látek může být snížený příjem důležitých živin bakteriální buňkou případně jejich zvýšené vylučování, které se může odrazit ve fitness rezistentních kmenů bakterií (Perez *et al.*, 2012).

### 5.1.1 Obecná charakteristika a klasifikace beta-laktamáz

Beta-laktamázy jsou enzymy hydrolyzující beta-laktamový kruh (**Obr. 9**), který je sdílený všemi beta-laktamovými antibiotiky (Bush *et al.*, 1995). Blízká homologie aminokyselinové sekvence beta-laktamáz a chromozomálních PBP různých bakteriálních druhů ukazuje na nejpravděpodobnější původ těchto enzymů (Koch, 2003). V 60. letech byla popsána první plazmidově kódovaná beta-laktamáza TEM-1 (Datta and Kontomichalou, 1965). Nová varianta beta-laktamázy může vzniknout jen jedinou mutací v kódujícího genu vedoucí k záměně aminokyseliny v sekvenci proteinu. Do dneška bylo popsáno přes 2000 sekvenčních typů beta-laktamáz (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/>, ke dni 23. 2. 2016) a jejich počty konstantně narůstají.



**Obr. 9:** Antibiotická aktivita penicilinu G inhibicí transpeptidázy (A) a hydrolýza beta-laktamového kruhu antibiotika účinkem beta-laktamázy (B)

Vytvořeno podle Mascaretti *et al.*, 2003.

- (A) Penicilin G narušuje aktivitu transpeptidázy tvorbou vysoce stabilního penicilloyl-enzymového intermediátu.
- (B) Serinová beta-laktamáza napadá beta-laktamový kruh penicilinu G a dává vznik kyselině penicilové. V této změně podobě je penicilin inaktivní.



Z ohledem na velký počet a variabilitu beta-laktamáz bylo navrženo několik systému jejich třídění do skupin na základě biochemických, molekulárních a mikrobiologických vlastností. Nejuznávanější je klasifikace na základě sekvence aminokyselin dle Amblera (Ambler, 1980) a funkční klasifikace podle substrátové specifity a citlivosti k inhibitorům beta-laktamáz navržená K. Bush a kolegy (Bush *et al.*, 1995). Tyto dva přístupy přehledně shrnuje recentní práce K. Bush (Bush, 2013). Bez ohledu na řazení do klasifikačních skupin můžeme beta-laktamázy rozdělit na základě jejich substrátové specifity na **penicilinázy** neboli úzkospektré beta-laktamázy, **širokospektré beta-laktamázy**, **cefalosporinázy AmpC** a **karbapenemázy** (Bush a Jacoby, 2010), jejichž přehled uvádí **Tab. 4**.

**Tab. 4:** Přehled vybraných beta-laktamáz gramnegativních bakterií

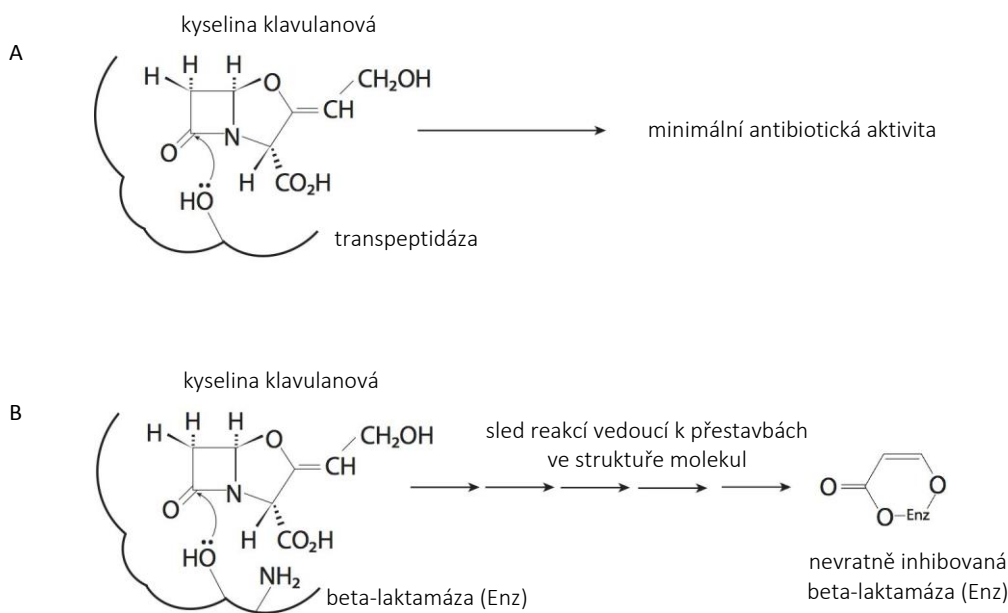
Skupina	Příklad enzymu	Substrátové spektrum	Inhibice kyselinou klavulanovou	Klasifikační třída
Penicilinázy (úzkospektré beta-laktamázy)	TEM-1, SHV-1	penicilin G, aminopeniciliny, karboxypeniciliny, úzkospektré cefalosporiny	ano	A/2b
	skupina OXA	podobně jako TEM-1, navíc kloxacilin, methicilin, oxacilin	variabilní	D/2d
Širokospektré beta-laktamázy	skupina TEM a SHV	jako penicilinázy, navíc oxyimino-cefalosporiny a monobaktamy (aztreonam)	ano	A/2be,2br,2ber
	skupina CTX-M	podobně jako skupina TEM a SHV, u některých i cefepim	ano	A/2be
	skupina OXA	jako CTX-M	variabilní	D/2de
	PER-1, BES-1, VEB-1	jako TEM a SHV skupina	ano	A/2be
AmpC cefalosporinázy	CMY, ACC-1, ACT-1, DHA-2, MIR-1, MOX-1, skupina FOX a LAT	jako ESBL, navíc cefamyciny	ne	C/1
Karbapenemázy	metalo-betalaktamázy VIM, IMP, NDM, SIM, SPN, GIM-1, SPM-1	jako ESBL, navíc cefamyciny a karbapenemy, nehydrolyzují monobaktamy	ne	B/3a
	KPC, IMI, SME, GES	jako ESBL, karbapenemy, cefamyciny	ne	A/2f
	skupina OXA-48, OXA-23	karbapenemy, cloxacilin, oxacilin	variabilní	D/2df

Upraveno podle Bush, 2010; Paterson, 2006.

### 5.1.2 Širokospektré beta-laktamázy (ESBL)

Tato skupina enzymů známá pod zkratkou ESBL („extended-spectrum beta-lactamase“) je produkována různými druhy gramnegativních bakterií. ESBL hydrolyzují peniciliny, oxyimino-cefalosporiny a monobaktamy, zatímco cefamyciny a karbapenemy jsou stabilní jejich působení. Jejich negativní účinek na bakteriální buňku je potlačován inhibitory beta-laktamáz (kyselinou klavulanovou, tazobaktamem a sulbaktamem). Mechanismus interakce inhibitoru s beta-laktamázou je přibližně

na **Obr. 10**. Tato vlastnost je zároveň využívána v diagnostice producentů těchto enzymů. ESBL jsou produkovány především zástupci čeledi Enterobacteriaceae, dále pseudomonádami a acinetobaktery.



**Obr. 10:** Interakce kyseliny klavulanové s transpeptidázou (A) a zjednodušený mechanismus nevratné inhibice beta-laktamázy účinkem inhibitoru (B).

Vytvořeno podle Mascaretti, 2003.

Širokospektré cefalosporiny byly zavedeny do klinické praxe na počátku 80. let minulého století pro léčbu závažných infekcí vyvolaných gramnegativními bakteriemi (Bradford, 2001). Tato antibiotika byla hojně aplikována a bylo jen otázkou času, kdy budou nalezeny bakterie schopné odolávat jejich účinku. První popisované ESBL byly substituční deriváty úzkospektrých beta-laktamáz **TEM** a **SHV**. Vznikly jednou či dvěma mutacemi v definovaných pozicích těchto kódujících genů.

První popsanou ESBL byla SHV-2 u *Klebsiella ozanae* v Německu (Kliebe *et al.*, 1985). Jedná se o derivát penicilinázy SHV-1, která je nejběžnější úzkospektrou beta-laktamázou *K. pneumoniae*, jejíž kódující je lokalizován na plasmidu nebo na bakteriálním chromozomu (Livermore, 1995). Beta-laktamázy typu TEM tvoří početnou skupinu. TEM-1 je nejrozšířenější variantou u gramnegativních bakterií, hydrolyzuje peniciliny a úzkospektré cefalosporiny. První širokospektrá beta-laktamáza typu TEM byla TEM-3 popsána v roce 1988 (Sougakoff *et al.*, 1988). V současné době je známo 189 variant SHV a 220 variant TEM (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/>, ke dni 23. 2. 2016). Je však nutné podotknout, že ne všechny varianty TEM a SHV disponují vlastnostmi ESBL, mnohé z nich náleží mezi beta-laktamázy úzkospektré.

Další skupinou, která obsahuje varianty s charakterem ESBL, jsou beta-laktamázy rodiny **OXA**, které na rozdíl od TEM a SHV náleží do molekulární třídy D/funkční třídy 2d. Od výše uvedených beta-laktamáz se navíc odlišují vysokou aktivitou k oxacilinu a kloxacilinu a slabou inhibicí kyselinou klavulanovou (Bush *et al.*, 1995). Jsou rozšířeny především u *P. aeruginosa* (Bradford, 2001). Kódující geny jednotlivých variant beta-laktamáz OXA se vyznačují nízkou sekvenční homologií.

Nová skupina beta-laktamáz, která díky zvýšené schopnosti hydrolyzovat cefotaxim získala název **CTX-M**, v posledních 15 letech prakticky vytlačila enzymy výše uvedených rodin a stala se dominantní mezi producenty ESBL. Na rozdíl od výše uvedených rodin beta-laktamáz vykazují všechny varianty CTX-M enzymů vlastnosti ESBL. Do současnosti bylo popsáno 161 odlišných sekvenčních variant CTX-M (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/>, ke dni 23. 2. 2016), což dokládá jejich vysokou heterogenitu. Jednotlivé varianty CTX-M mohou vykazovat drobné odlišnosti ve spektru a míře hydrolyzy beta-laktamových antibiotik (Bonnet, 2004; Poirel *et al.*, 2008b). Předpokládá se, že vznik nových variant bodovými mutacemi stávajících enzymů je podporován selekčním tlakem cefalosporinů a může přispívat ke zvýšené hydrolytické aktivitě těchto enzymů. Bližšímu popisu epidemiologii ESBL je věnována kapitola 7. **Tab. 5** dokumentuje sekvenční variabilitu vybraných skupin beta-laktamáz.

**Tab. 5:** Počty dosud popsaných sekvenčních variant vybraných skupin beta-laktamáz

Molekulární třída	Skupina	Typ enzymu na základě substrátové aktivity	Číslo nejvyšší popsané varianty
A	TEM	penicilináza/ESBL	224
	SHV	penicilináza/ESBL	193
	CTX-M	ESBL	179
	KPC	karbapenemáza	24
	GES	karbapenemáza	30
	SME	karbapenemáza	5
B	IMP	karbapenemáza	58
	VIM	karbapenemáza	50
	NDM	karbapenemáza	16
C	CMY	AmpC beta-laktamáza	139
	ACT	AmpC beta-laktamáza	39
	DHA	AmpC beta-laktamáza	24
	MIR	AmpC beta-laktamáza	18
	MOX	AmpC beta-laktamáza	12
	FOX	AmpC beta-laktamáza	13
	ACC	AmpC beta-laktamáza	5
D	OXA	penicilináza/ESBL/karbapenemáza	518

Vytvořeno podle <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/>, ke dni 18. 4. 2016. Celkový počet uznaných sekvenčních variant jednotlivých beta-laktamáz může být nižší než číslo nejvyšší popsané varianty. Některé enzymy, u kterých bylo zjištěno, že byly chybně identifikovány jako nové varianty (chyba v sekvenci, neúplná sekvence, apod.), byly z databáze vyřazeny.

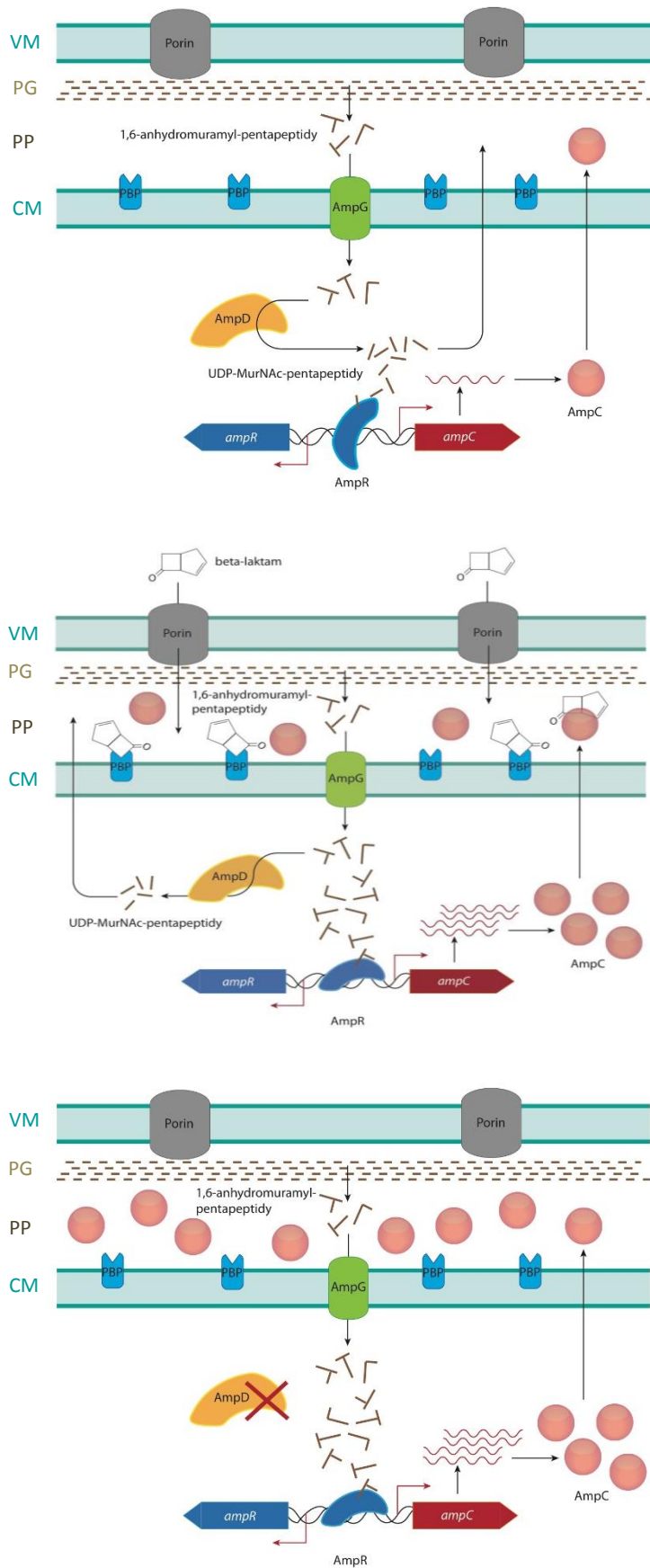
### 5.1.2.1 Metody detekce producentů ESBL

Specifické metody založené na průkazu fenotypu ESBL vychází ze substrátové specifity těchto enzymů a jejich citlivosti k inhibitorům beta-laktamáz. Pro vyhledávání kmenů je možné v první fázi použít výsledky vyšetření citlivosti k beta-laktamovým antibiotikům diskovou difuzní metodou nebo hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC). Následně je produkce ESBL potvrzena testem synergického účinku mezi kyselinou klavulanovou a cefalosporiny třetí nebo čtvrté generace (CLSI, 2013). Komplikací v detekci ESBL je současná přítomnost dalších mechanismů, např. konstitutivní produkce AmpC beta-laktamázy nebo karbapenemázy. V těchto případech je potřeba použít další specifické antibiotické indikátory a inhibitory, které zajistí odlišení jednotlivých mechanismů (Hrabak *et al.*, 2011b). Přehledně se těmto metodám a jejich úskalím věnuje recentní práce J. Hrabáka (Hrabák, 2009). Kmen produkující ESBL bývá obvykle hodnocen jako rezistentní ke všem beta-laktamovým antibiotikům včetně kombinací s inhibitory serinových beta-laktamáz (CLSI, 2013). Molekulárně-genetické metody využívají polymerázovou řetězovou reakci se specifickými primery a DNA mikročipy pro průkaz genů kódujících ESBL. Pro odlišení jednotlivých variant ESBL je následně nutné stanovit primární nukleotidovou sekvenci. Přesné určení varianty ESBL enzymu poskytuje cennou informaci pro znalost epidemiologie antibiotické rezistence na lokální i globální úrovni.

### 5.1.3 AmpC beta-laktamázy

Substrátová specifita AmpC beta-laktamázy zahrnuje peniciliny, cefamyciny, většinu cefalosporinů a monobaktamy. AmpC beta-laktamázy obsahují serin v aktivním místě a jsou inhibovány kyselinou boritou či oxacilinem, nikoli však klasickými inhibitory beta-laktamáz (kyselinou klavulanovou, tazobaktamem, sulbaktamem). AmpC jsou exprimovány inducibilně nebo konstitutivně, přičemž inducibilní produkce je běžnější a podílí se na ní geny *ampD*, *ampG* a *ampR* (Obr. 11). Bez přítomnosti induktoru (např. kyseliny klavulanové, cefoxitinu, imipenemu) dochází pouze k nízké expresi těchto enzymů. Konstitutivní produkce je podmíněna mutací v regulačním systému AmpC, přičemž tato změna je nevratná (Philippon *et al.*, 2002).

Enzymy této skupiny se nachází inherentně na chromozomu celé řady bakterií, např. *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Chromobacterium* spp., *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes* a dalších. Inherentní AmpC disponuje také u *E. coli*, zde však není produkce inducibilní z důvodu absence genu *ampR* (Jacoby, 2009). Role těchto přirozeně se vyskytujících AmpC není zcela objasněna, ale předpokládá se jejich zapojení do procesu recyklace buněčné stěny (Bishop a Weiner, 1992; Johnson *et al.*, 2013b). Později byly AmpC identifikovány na plazmidu u mnoha druhů gramnegativních bakterií a nabyly tak klinického významu.



(A) Bazální exprese *ampC* bez přítomnosti induktoru. Během procesu recyklace buněčné stěny jsou molekuly 1,6-anhydromuramyl-pentapeptidy odstraňovány z buněčné stěny a transportovány do cytoplazmy prostřednictvím permeázy AmpG. Ve vnitrobuněčném prostoru jsou molekuly 1,6-anhydromuramyl-pentapeptidu štěpeny proteinem AmpD za vzniku volných tripeptidů, které jsou následně přeměňovány na UDP-MurNAc-pentapeptidy. Tyto peptapeptidy reagují s molekulou AmpR navázanou v oblasti mezi geny *ampR* a *ampC*, přičemž tato interakce vyvolá snížení transkripce genu *ampC*. Vytváří se pouze malé množství AmpC beta-laktamázy, která je následně transportována do periplazmatického prostoru.

(B) Indukce exprese *ampC* účinkem beta-laktamu. Beta-laktamová antibiotika (např. imipenem, cefoxitin) působí jako induktory AmpC beta-laktamázy. V periplazmatickém prostoru interagují s PBP. Vytváří se zvýšené množství 1,6-anhydromuramyl-pentapeptidu, které AmpD nezvládá převádět na tripeptidy. V důsledku převažujícího množství se přednostně váže k AmpR (namísto UDP-MurNAc-pentapeptidů) a vyvolává jeho konformační změnu na transkripční aktivátor genu *ampC*. Vzniká velké množství AmpC, která je transportována do periplazmatického prostoru buňky. Pokles hladiny beta-laktamu pod hodnotu potřebnou pro indukci vyvolá sníženou tvorbu 1,6-anhydromuramyl-pentapeptidu, který je účinně zpracován prostřednictvím AmpD.

(C) Konstitutivní exprese *ampC* zprostředkovaná AmpD. Snížení exprese *ampD* případně jeho mutace vedoucí k inaktivaci AmpD narušuje proces recyklace buněčné stěny a vede k tvorbě vysokých hladin 1,6-anhydromuramyl-pentapeptidu cytoplazmě buňky. Ten se přednostně váže na AmpR a aktivuje tak transkripci *ampC* přepisovaného do beta-laktamázy AmpC, která je přítomná ve vysokých hladinách.

VM, vnější fosfolipidová membrána  
 PG, peptidoglykan  
 PP, periplazmatický prostor  
 CM, vnitřní cytoplazmatická membrána

Obr. 11: Mechanismus regulace exprese *ampC*

Vytvořeno podle Lister *et al.*, 2009.

### 5.1.3.1 Plazmidové AmpC beta-laktamázy

První AmpC beta-laktamáza kódovaná geny na plazmidu byla izolována z *Proteus mirabilis* a vykazovala vysokou sekvenční homologii s chromozomální AmpC (Bobrowski *et al.*, 1976). Bylo popsáno mnoho typů plazmidových AmpC a mezi nejčastější patří varianty CMY, FOX, ACT, ACC, DHA, MIR a MOX (Tab. 4–5). Jsou identifikovány především u druhů, které postrádají inherentní AmpC (např. *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. a *P. mirabilis*), ale také u *E. coli*. Plazmidové AmpC mají svůj původ právě v inherentních (chromozomálních) beta-laktamázách různých druhů bakterií (Barlow a Hall, 2002; Hanson, 2003; Verdet *et al.*, 2006). Například nejvýznamnější skupina CMY vykazuje vysoký stupeň příbuznosti s chromozomálními AmpC u *Aeromonas* spp. a *C. freundii*. Na rozdíl od inherentních AmpC je však produkce plazmidových variant až na drobné výjimky vždy konstitutivní, jelikož *ampR* kódující represor není přenesen spolu s genem pro vlastní beta-laktamázu. Inducibilní produkce byla popsána v případě AmpC asociovaných s genem *ampR*, např. ACT-1, DHA-1, DHA-2 a některých variant CMY (Jacoby, 2009).

### 5.1.3.2 Metody detekce producentů AmpC beta-laktamáz

Kmeny produkující AmpC jsou obvykle rezistentní k cefamycinům (např. cefoxitinu). Výsledky vyšetření citlivosti k antibiotikům mohou tedy poskytnout informaci, zda se jedná o potenciálního producenta AmpC beta-laktamázy. Jelikož rezistence k cefoxitinu může být způsobena produkcí karbapenemáz nebo mechanismy vázanými na cytoplazmatickou membránu, je zapotřebí pro potvrzení produkce AmpC beta-laktamázy použít specifické testy. K tomu účelu bylo popsáno několik fenotypových metod, které přehledně shrnuje publikace A. Jacobyho (Jacoby, 2009). Mezi nejpoužívanější patří testy využívající inhibitory AmpC beta-laktamáz, např. kyselinu boritou nebo kloxacilin. Test je založen na srovnání inhibičních zón případně stanovení rozdílu MIC u cefalosporinů a jejich kombinací s některým z inhibitorů (Jacoby, 2009; Yagi *et al.*, 2005).

Podobně jako v případě jiných typů beta-laktamáz je i pro detekci AmpC možné použít metody molekulární biologie (Jacoby, 2009). Tyto metody doplňují primární fenotypový průkaz produkce AmpC beta-laktamázy a dále umožňují zařadit beta-laktamázu do konkrétní skupiny (CMY, DHA, FOX atd.). Následná sekvenční analýza poskytne informaci o konkrétní variantě enzymu (CMY-1, CMY-2, DHA-1, DHA-2 atd.). Mezi nejpoužívanější patří metoda multiplex PCR (Perez-Perez a Hanson, 2002). Problematiku AmpC beta-laktamáz včetně přehledného a detailního popisu metod jejich detekce se věnuje publikace J. Hrabáka (Hrabak, 2007).

### 5.1.3.3 Molekulární epidemiologie AmpC

V posledním dvaceti letech došlo k celosvětovému rozšíření těchto enzymů a v současné době představují závažný klinický problém. Většina producentů AmpC navíc nese další úzkospektré nebo širokospektré beta-laktamázy (Alvarez *et al.*, 2004; Sheng *et al.*, 2013) a často také vykazuje rezistenci k jiným skupinám antimikrobiálních látek vedle beta-laktamů. Výskyt a variabilita jednotlivých typů AmpC je však i nadále nižší v porovnání s ESBL. Rizika kolonizace a infekce producenty AmpC jsou ale obdobná jako ty, které platí pro ESBL. Zahrnují hospitalizaci, pobyt na jednotkách intenzivní péče, katetrizaci a předchozí terapii beta-laktamovými antibiotiky. Výskyt AmpC producentů je tedy nejčastější u hospitalizovaných pacientů (Jacoby, 2009; Tagg *et al.*, 2015). Producenti AmpC nejsou pouze doménou humánní medicíny, ale byly izolovány také ze skotu, prasat a drůbeže a zvířat chovaných ze záliby (Rubin a Pitout, 2014; Smet *et al.*, 2010a). V důsledku jejich rostoucí prevalence a obecného rozšíření je upozorňováno na možnou existenci rezervoárů AmpC beta-laktamáz u potravinových zvířat a s tím související význam potravního řetězce v přenosu těchto bakterií ke člověku (EFSA, 2011).

Z širokého spektra dosud popsáných enzymů je CMY-2 nejrozšířenější. Druhou nejčastější AmpC beta-laktamázu, která je často nacházena u izolátů produkujících karbapenamázy, patří DHA-1 (Jacoby, 2009). CMY-2 je identifikována u humánních i veterinárních izolátů *E. coli* a dalších zástupců čeledi Enterobacteriaceae. Byla spojena s nárůstem rezistence k beta-laktamovým antibiotikům včetně cefalosporinů u netyfoidních salmonel (Carattoli *et al.*, 2002; Dunne *et al.*, 2000). Od druhé poloviny 90. let bylo pozorováno její šíření v Severní Americe u různých serotypů *Salmonella* spp. u lidí, potravinových zvířat, psů a koček (Jacoby, 2009). Později byla dokumentována difuze CMY-2 do populací komenzálních izolátů *E. coli*. Frekventovaný výskyt je sledován celosvětově u *E. coli* a *K. pneumoniae* rezistentní k cefoxitinu a to jak u hospitalizovaných pacientů tak v komunitě (Denisuk *et al.*, 2013; Reuland *et al.*, 2015; Sheng *et al.*, 2013; Tagg *et al.*, 2015; Voets *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2007). Beta-laktamáza CMY-2 byla také popsána u *E. coli* z psů a koček v USA, Evropě a Austrálii (Baede *et al.*, 2015; Bogaerts *et al.*, 2015; Bortolaia *et al.*, 2014; Trott, 2013), což poukazuje na význam zvířat chovaných ze záliby v komplexní epidemiologii AmpC beta-laktamáz.

Prevalence CMY-2 v populaci komenzálních izolátů enterobakterií z potravinových zvířat se pohybuje v širokém rozmezí 0,01–88 % (Smet *et al.*, 2010a). Rozdíly jsou dané pravděpodobně charakterem epidemiologie v jednotlivých oblastech případně dalšími faktory včetně selekčního tlaku specifických skupin antibiotik. Vliv antimikrobiální terapie na selekci bakterií nesoucích AmpC dokumentovala studie v USA (Donaldson *et al.*, 2006). Na farmě mléčného skotu s frekventovaným použitím ceftiofuru pro léčbu respiračních onemocnění telat prokázali vysokou prevalenci *E. coli* s produkcí CMY-2 (88 %). Z České republiky je dostupná studie zabývající se výskytem AmpC u *E. coli* z jatečných krůt a kuřat, která uvádí velice nízkou prevalenci ( $\leq 0,01$  %) CMY-2 enzymu (Kolar *et al.* 2010).

Záchyt CMY-2 u bakterií z volně žijících zvířat poukazuje na obecné rozšíření této beta-laktamázy (Jamborova *et al.* 2015<sup>26</sup>; Loncaric *et al.*, 2013; Poirel *et al.*, 2012d; Stalder *et al.*, 2014).

#### 5.1.4 Karbapenemázy

Rezistence ke karbapenemům je považována za jeden z nejzávažnějších mechanismů rezistence, který významně limituje terapeutické možnosti nozokomiálních infekcí vyvolaných multirezistentními bakteriemi (Papp-Wallace *et al.*, 2011). Podobně jako ostatní beta-laktamázy štěpí karbapenemázy beta-laktamový kruh antibiotika a jako donor molekuly vody potřebné pro reakci je využíván serinový zbytek (serinové beta-laktamázy) nebo kationty zinku (metalo-beta-laktamázy). Producenti karbapenemáz hydrolyzují prakticky všechna beta-laktamová antibiotika a obvykle nejsou inhibováni terapeuticky dostupnými inhibitory. Často produkují další typy beta-laktamáz a vykazují rezistenci k několika antibiotickým skupinám. Podobně jako v epidemiologii ESBL je i pro šíření karbapenemáz zásadní jejich vazba na MGE a částečně také sdružení s úspěšnými bakteriálními klony.

##### 5.1.4.1 Charakteristika metalo-beta-laktamáz

Metallo-beta-laktamázy (MBL) náleží do molekulární třídy B. Vykazují hydrolytickou aktivitu vůči všem penicilinům, cefalosporinům a karbapenemům kromě monobaktamů a aztreonamu. Nejsou inhibovány kyselinou klavulanovou, sulbaktamem a tazobaktamem. Tento typ beta-laktamáz se nachází inherentně na chromozomu u některých bakterií, např. *Bacillus* spp. (Lim *et al.*, 1988), *Stenotrophomonas maltophilia* (Saino *et al.*, 1982), *Aeromonas* spp. (Iaconis a Sanders, 1990) a dalších. První získaná MBL, karbapenemáza IMP, byla prokázána u *P. aeruginosa* v Japonsku (Osano *et al.*, 1994). Brzy poté byly MBL detekovány také u Enterobacteriaceae, kdy byl v Japonsku izolován kmen *S. marcescens* s IMP-1 (Ito *et al.*, 1995). MBL byly zpočátku nacházeny především u pseudomonád a acinetobakterů, v posledním desetiletí však dochází k jejich celosvětovému šíření především u zástupců čeledi Enterobacteriaceae (Papagiannitsis *et al.*, 2015c<sup>28</sup>).

Nejvýznamnější získané MBL představují IMP, VIM a NDM (Dortet *et al.*, 2014b; Nordmann *et al.*, 2012a; Walsh *et al.*, 2005), zatímco jiné jako GIM a SIM se vyskytují spíše sporadicky u acinetobakterů a pseudomonád (Castanheira *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2005). Enterobakterie produkující MBL jsou v některých státech velmi rozšířené. Jsou zde odpovědné za menší i rozsáhlejší epidemie ve zdravotnických zařízeních (Nordmann *et al.*, 2012a). Geny pro karbapenemázy IMP a VIM jsou obvykle přítomny v bakteriálním genomu ve formě genové kazety integronů třídy 1 nesené různými typy plazmidů (Papagiannitsis *et al.*, 2015c<sup>28</sup>; Zhao a Hu, 2011a, b), které hrají významnou roli v jejich šíření. Potenciál karbapenemáz je možné dokumentovat na příkladu nové MBL popsané v roce 2008 u pacienta



ve Švédsku (Yong *et al.*, 2009), která byla pojmenována podle předpokládaného (a později potvrzeného) místa původu v hlavním městě Indii jako „New-Delhi Metallo-beta-lactamase“, zkráceně NDM. Jedná se o jednu z klinicky nejvýznamnějších karbapenemáz, která byla za několik let od prvního záchytu dokumentována po celém světě (Berrazeg *et al.*, 2014). Je rozšířena především u nemocničních kmenů *K. pneumoniae* a *E. coli* (Nordmann a Poirel, 2014). Na šíření této karbapenemázy se podílí nejrůznější typy plazmidů (Nordmann a Poirel, 2014; Studentova *et al.*, 2015<sup>27</sup>). Problematika MGE v šíření karbapenemáz bude stručně popsána v kapitole 7.10.

#### 5.1.4.2 Charakteristika karbapenemáz molekulární třídy A

Karbapenámy této skupiny náleží mezi serinové beta-laktamázy. Mají schopnost hydrolyzovat peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy a aztreonam a jsou citlivé k inhibitorům beta-laktamáz. Tato třída zahrnuje karbapenemázy KPC, SME, GES a IMI/NMC. Jednotliví zástupci se liší různou mírou karbapenemázové aktivity. První dokumentovanou karbapenemázou této skupiny byla SME-1 identifikována u *S. marcescens* ve Velké Británii v roce 1982 (Queenan a Bush, 2007). SME, NMC a IMI jsou dokumentovány zřídka, což pravděpodobně souvisí s lokací kódujících genů na chromozomu. Karbapenemáza KPC vykazuje vysokou karbapenemázovou aktivitu a je z této skupiny enzymů nejvýznamnější. Je kódována přenosnými plazmidy a frekventně dokumentována u nemocničních kmenů *K. pneumoniae* a jiných druhů čeledi Enterobacteriaceae, dále u *P. aeruginosa* a *A. baumannii* (Canton *et al.*, 2012a). Karbapenemáza GES byla popsána ve formě genové kazety integronu nesené konjugativními plazmidy *P. aeruginosa* a *K. pneumoniae* (Queenan a Bush, 2007).

#### 5.1.4.3 Charakteristika karbapenemáz molekulární třídy D

Molekulární třída D zahrnuje téměř 500 sekvenčních variant beta-laktamázy OXA, karbapenemázovou aktivitou však disponují pouze některé z nich. Většina karbapenemáz skupiny OXA byla identifikována u acinetobakterů a pseudomonád, u kterých jsou kódující geny lokalizovány na chromozomu nebo nesený mobilními genetickými elementy. U zástupců Enterobacteriaceae (především *E. coli* a *K. pneumoniae*) jsou nejrozšířenějšími karbapenemázami této skupiny enzymy OXA-48 (Nordmann a Poirel, 2014). Byla popsána řada sekvenčních variant odvozených od OXA-48, např. OXA-181, OXA-16 a OXA-204 (Kasap *et al.*, 2013; Potron *et al.*, 2011, 2013). Karbapenemázy skupiny OXA-48 vykazují vysokou hydrolytickou aktivitu vůči penicilinům, zatímco aktivita vůči karbapenemům a širokospektrým cefalosporinům je nízká (Walther-Rasmussen a Hoiby, 2006).

#### 5.1.4.4 Metody detekce producentů karbapenemáz

Přesná a včasná diagnostika producentů karbapenemáz je základním předpokladem úspěšné léčby infekce. Je rovněž nezbytná pro implementaci preventivních opatření pro zabránění jejich dalšího šíření (Temkin *et al.*, 2014). V současnosti existuje řada metod založená na detekci fenotypu a genotypu.

Pro odhalení potenciálních producentů se využívá výsledek kvalitativního nebo kvantitativního stanovení citlivosti ke karbapenemům a srovnání s doporučenými hraničními hodnotami („breakpointy“) uvedenými v metodických listech European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2016) a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). Producenti karbapenemáz vykazují sníženou citlivost alespoň k jednomu z karbapenemů (imipenemu, meropenemu nebo ertapenemu). Hraniční hodnoty pro klinickou rezistenci se výrazně odlišují od hodnot epidemiologických předělů (ECOFF – „epidemiological cut-off“). Hodnota ECOFF vychází ze standardního rozložení MIC v populaci sledované bakterie. Z klinického pohledu jsou kmeny *E. coli* a *K. pneumoniae* citlivé k meropenemu dosahují-li hodnoty MIC  $\leq 2$  mg/l, zatímco ECOFF operuje s hodnotou  $\leq 0,125$  mg/l. Pro vyhledávání producentů karbapenemáz používají komerčně dostupné selektivní půdy, které však selhávají při odhalování variant s nízkou karbapenemázovou aktivitou (např. OXA-48 a IMP). Produkci karbapenemáz u suspektních kmenů je nutné potvrdit specifickými metodami.

Mezi základní metody pro detekci karbapenemázy využívané v diagnostických laboratořích patří metody fenotypové, které jsou založené na schopnosti některých látek, např. EDTA a kyseliny fenylborité, inhibovat tyto enzymy (Giske *et al.*, 2011). Jejich specifita je však nízká a nejsou vhodné pro průkaz některých karbapenemáz (např. OXA-48). Další skupinu tvoří testy založené na detekci hydrolýzy karbapenemu, které jsou považovány za vysoce citlivé a specifické. Zahrnují např. Test CarbaNP, který využívá kolorimetrické vizualizace hydrolýzy imipenemu (Dortet *et al.*, 2012; Nordmann *et al.*, 2012b). Jeho výhodou je možnost detekce producentů karbapenemáz přímo v klinickém materiálu (Dortet *et al.*, 2014a). Další metoda vykazující vysokou specifitu a citlivost je založena na průkazu degradačních produktů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie, která je schopná odlišit od sebe základní klinicky významné karbapenemázy (Hrabak *et al.*, 2011a). Molekulárně-genetické metody využívají PCR detekci kódujících genů (Cole *et al.*, 2009; Monteiro *et al.*, 2012) nebo DNA mikročipy (Bogaerts *et al.*, 2011).

#### 5.1.4.5 Molekulární epidemiologie producentů karbapenemáz

Problematika karbapenemáz je dnes sledována především u enterobakterií. Z evropských zemí jsou nejvyšší prevalence producentů karbapenemáz dokumentovány v Řecku a Itálii. Další státy, ve kterých jsou karbapenemázy rozšířené, zahrnují Francii, Polsko, Německo a Velkou Británii. Producenti karbapenemáz jsou odpovědní za menší i rozsáhlé nemocniční „outbreaky“ (Canton *et al.* 2014). Byli

sporadicky izolováni také u hospitalizovaných pacientů v České republice, nicméně jejich celkový výskyt je i nadále nízký (Canton *et al.*, 2012a; Hrabak *et al.*, 2015). Nejčastější celosvětově rozšířené skupiny karbapenemáz u humánních izolátů představují metalo-beta-laktamázy IMP, NDM a VIM a karbapenemázy KPC a OXA-48.

NDM je nejvýznamnější karbapenemázou vůbec. V současné době dochází k jejímu celosvětovému šíření z endemických oblastí na indickém subkontinentu, kde je prevalence nosičství producentů NDM odhadována na 5–15 %. Producenti NDM zde byli izolováni také z půdy a vody (Walsh *et al.*, 2011). Prostředí je tedy považováno za významný faktor v epidemiologii NDM v Indii. Sekundární rezervoáry představují Balkán, Arabský poloostrov a severní Afrika (Nordmann a Poirel, 2014). Za úspěch NDM je mimo jiné zodpovědná vazba na různé typy vysoce konjugativních plazmidů a asociace s geny rezistence k různým skupinám antibiotik, které podporují selekci producentů této karbapenemázy (Nordmann *et al.*, 2012a).

Celosvětově je popisována také karbapenemáza KPC-2, jejíž šíření je spojeno především s vazbou na epidemicky úspěšný rizikový klon *K. pneumoniae* ST258 (Temkin *et al.*, 2014). Endemické oblasti KPC-2 představují Řecko a Itálie (Nordmann a Poirel, 2014). Producenti OXA-48 byli spojeni s řadou nemocničních „outbreaků“ například v Polsku a Turecku (Arana *et al.*, 2015; Cuzon *et al.*, 2011; Dautzenberg *et al.*, 2014; Kola *et al.*, 2015; Voulgari *et al.*, 2013). Za pravděpodobný zdroj jsou považovány státy severní Afriky, Turecko a Indie (Nordmann a Poirel, 2014; Poirel *et al.*, 2012e). Menší „outbreaky“ byly popsány i v českých nemocnicích (J. Hrabák, LF UK v Plzni, osobní sdělení).

Varianta VIM-2 se endemicky šíří v jižní Evropě a jihovýchodní Asii, dále také v Africe a v některých evropských zemích. VIM-1 je frekventovaná především u izolátů *K. pneumoniae* v řeckých nemocnicích (Papagiannitsis *et al.*, 2016<sup>32</sup>; Papagiannitsis *et al.*, 2015a; Zhao a Hu, 2011a). Karbapenemáza IMP se vyskytuje endemicky na asijském kontinentu, zejména v Japonsku, Číně a na Taiwanu, z Evropských zemí je nejčastěji dokumentována v Řecku. Předpokládá se, že k primární selekci izolátů s IMP došlo před jejich celosvětovým rozšířením v Japonsku jako důsledek vysoké spotřeby karbapenemů (Nordmann a Poirel, 2014; Zhao a Hu, 2011b).

#### 5.1.4.6 Producenti karbapenemáz u zvířat a v prostředí

Šíření enterobakterií s produkcí karbapenemáz mimo nemocnice do zdravé lidské populace, ke zvířatům a do prostředí se stalo v posledních letech aktuálním tématem (EFSA, 2013). Role vodního prostředí v šíření karbapenemáz byla zdokumentována v zemích s celkově špatnými hygienickými podmínkami a nedostatečnou sanitací (Walsh *et al.*, 2011). Ojedinelé záchyty enterobakterií produkujících karbapenemázy v odpadních vodách nebo ve vodních tocích byly hlášeny také v Evropě

(Galler *et al.*, 2014; Poirel *et al.*, 2012a). Byly popsány i případy izolace *E. coli* a *K. pneumoniae* s NDM-1 nebo OXA-48 u psů a koček v Německu a USA (Shaheen *et al.*, 2013; Stolle *et al.*, 2013). Izoláty *E. coli* a *Salmonella* spp. s VIM-1 byly sporadicky nalezeny v rámci aktivní surveillace u drůbeže a prasat v Německu (Fischer *et al.*, 2012, 2013a). Ve všech případech se s nejvyšší pravděpodobností jedná o kmeny humánního původu. Rizika šíření producentů karbapenemáz mimo nemocnice by nemělo být podceňováno. Nicméně ve vědecké komunitě převažuje názor, že k jejich masivní šíření ke zvířatům, jak bylo sledováno v případě CTX-M beta-laktamáz, v budoucnu nedojde (EFSA, 2013; Poirel *et al.*, 2014). Vzhledem ke klinické závažnosti tohoto rezistentního mechanismu zahájila EU monitoring producentů karbapenemáz v chovech potravinových zvířat. V rámci tohoto programu nebyli doposud žádní producenti karbapenemáz dokumentováni (EFSA, 2016).

První případ izolace producentů karbapenemáz u volně žijících zvířat byl popsán v Německu. Jednalo se o izolát *Salmonella* Corvalis s NDM-1 z dravého ptáka luňáka obecného (Fischer *et al.*, 2013b). Monitoringu šíření karbapenemáz do prostředí a k volně žijícím zvířatům se věnujeme na našem pracovišti od roku 2013. Testování obsáhlého souboru 3 000 izolátů gramnegativních bakterií ze vzorků trusu různých druhů volně žijících zvířat přineslo pozitivní výsledky. V jedné z největších hnízdních kolonií racků australských (*Chroicocephalus novaehollandiae*) v Novém Jižním Walesu v Austrálii byly prokázány izoláty *E. coli* s produkcí metalo-betalaktamázy IMP-4 (Dolejska *et al.*, 2016<sup>30</sup>). Tato studie dokumentuje masivní šíření karbapenemáz do prostředí v této oblasti. Další záchyty různých druhů enterobakterií nesoucí geny karbapenemáz KPC a IMP byly pozorovány u vrány americké v USA a Kanadě (M. Dolejská *et al.*, nepublikovaná data).

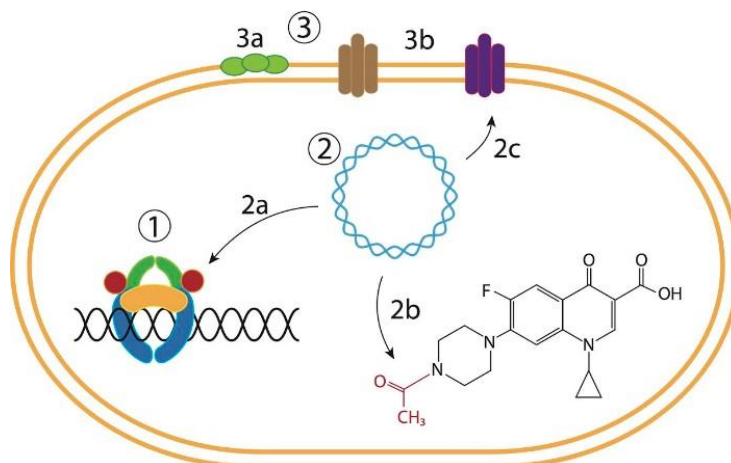
## 5.2 Mechanizmy rezistence k fluorochinolonům

Fluorochinolony jsou důležitými antibiotiky pro léčbu infekcí člověka i zvířat. V humánní medicíně jsou lékem volby při shigelóze a těžkých formách salmonelových infekcí. Nárůst spotřeby fluorochinolonů byl následován rychlým vzestupem a šířením rezistentních mikrobů. Z pohledu antimikrobiální rezistence patří flurochinolony k nejrizikovějším skupinám antibiotik, jelikož rezistence k nim vzniká velice rychle (Hooper a Rubinstein, 2003). V Evropě je v rámci mezinárodních programů sledována rezistence k FQ u vybraných zástupců Enterobacteriaceae humánního i veterinárního původu (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enterica*), která je obecně vysoká a vykazuje rostoucí charakter (EARS-Net; EFSA, 2016).

Při zavedení chinolonů do klinické praxe se předpokládalo, že riziko rozvoje rezistence bude malé. Tyto domněnky vycházely ze dvou faktů. K náhodným mutacím dochází ve frekvencích  $< 10^{-7}$ , tudíž pravděpodobnost vzniku mnohonásobných mutací ( $10^{-14}$ – $10^{-16}$ ), které by vedly k rezistentnímu fenotypu, se zdála být velmi nízkou (Zhao *et al.*, 1997). Zároveň jsou chinolony plně syntetickými preparáty, a proto se existence genů rezistence k této skupině antimikrobiálních látek u rezervoárů v prostředí rovněž nepředpokládala (Robicsek *et al.*, 2006). Opak je ale pravdou a rezistence k fluorochinolonům se stala velice běžnou, celosvětově rozšířenou a často také sdruženou s rezistencí ke klinicky významným beta-laktamům. U gramnegativních bakterií byly později identifikovány také horizontálně přenosné mechanismy rezistence k fluorochinolonům. Rezistence k této skupině antimikrobiálních látek dnes představuje tíživý a rostoucí medicínský problém.

Byla popsána řada funkčně vzdálených mechanismů rezistence k chinolonům (**Obr. 12**). Jedná se o mechanismy kódované bakteriálních chromozomem, případně jsou geny pro rezistenci nesené plazmidy. Bakterie mohou měnit podobu cílových struktur chinolonů, tvořit proteiny chránící zásahová místa antibiotika, omezit propustnost povrchových struktur buňky nebo antibiotikum z buňky aktivně odčerpávat prostřednictvím efluxních pump. Mohou rovněž disponovat mechanismem enzymatické inaktivace antibiotika. Častá je také současná přítomnost několika mechanismů u jedné bakteriální buňky, což se může výrazně odrazit ve výsledném fenotypu rezistence. Pro rezistenci k chinolonům je také typické, že vzniká poměrně rychle po krátkodobém působení antibiotika, ke kterému může dojít i během antibiotické léčby zejména při podávání nízkých dávek (Hooper a Rubinstein, 2003).

V následujících odstavcích budou jednotlivé mechanismy rezistence k fluorochinolonům stručně představeny. Bude popsán jejich genetický základ a objasněn pravděpodobný původ. Důraz bude kladen na rezistenci kódovanou plazmidy z důvodu jejího potenciálu šíření horizontální cestou. Kapitola bude doplněna o stručnou informaci k současnému rozšíření plazmidy kódované rezistence k fluorochinolonům u humánních i veterinárních izolátů včetně několika původních prací autora.



**Obr. 12: Mechanizmy rezistence k chinolonům**

Vytvořeno podle Aldred *et al.*, 2014.

- (1) Chromozomální rezistence podmíněná mutací v genech pro gyrázy/topoizomerázy IV (charakteristická struktura enzymu je označena barevně – červená-modrá-zelená). Cílová struktura je v takto změněné podobě necitlivá k chinolonu.
- (2) Plazmidy determinovaná rezistence. (2a) Tvorba Qnr proteinů (označen žlutě), které chrání cílová místa DNA před účinkem chinolonů. (2b) Enzymatická inaktivace chinolonu acetyltransferázou AAC(6′)-Ib-cr. (2c) Tvorba efluxních pump, které snižují koncentraci antibiotika v buňce.
- (3) Chromozomálně podmíněná rezistence. (3a) Snižovaná exprese porinů vedoucí k poklesu příjmu antibiotika. (3b) Zvýšená exprese efluxních pump kódovaných chromozomálními geny.

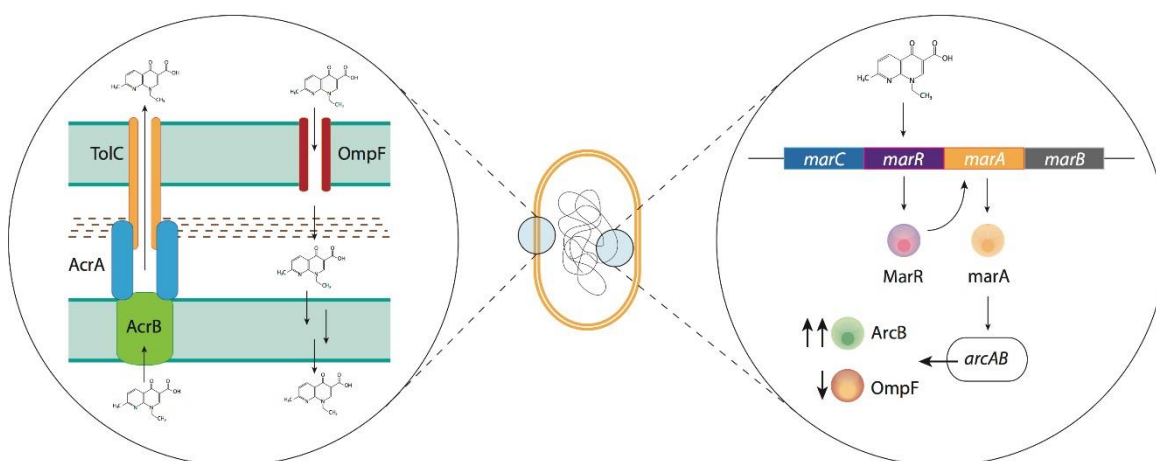
## 5.2.1 Chromozomální mechanizmy rezistence k fluorochinolonům

### 5.2.1.1 Změny na úrovni buněčných membrán a aktivní eflux

Chinolony musí při svém vstupu do buňky překonat buněčné povrchy bakteriální buňky, tj. buněčnou stěnu, plazmatickou membránu a v případě gramnegativních bakterií navíc i vnější membránu. Vnější membrána je tvořena z fosfolipidové vrstvy a z lipopolysacharidů. Hydrofobní chinolony vstupují do bakteriální buňky obvykle prostou difuzí, zatímco hydrofilní chinolony využívají nescifických proteinových kanálků porinů. Bylo prokázáno, že bakterie s přirozenou rezistencí k chinolonům disponují modifikovanou lipopolysacharidovou vrstvou vnější membrány, která znemožňuje difuzi hydrofobních látek včetně chinolonů (Hooper a Rubinstein, 2003). Získané mechanizmy rezistence na úrovni plazmatické membrány zahrnují snížení počtů porinů, změnu jejich konformace, náhradu primární struktury porinů nebo nadprodukcí efluxních pump (Ruiz, 2003).

Mechanizmy rezistence spojené s poriny jsou dané regulací exprese kódujících genů nebo přímo změnou primární struktury porinu. V případě *E. coli* byly popsány poriny OmpF a OmpC, které představují nescifické difuzní proteiny vnější membrány. Mutace v genu *ompF* vedou ke snížení počtu porinů OmpF, a tím ke ztrátě schopnosti akumulace chinolonů uvnitř bakteriální buňky (Bryskier, 2005). Rezistence může být také spojena s negativní regulací exprese genu *ompF* prostřednictvím malé nekódující MicF RNA (Schmidt *et al.*, 1995).

Efluxní pumpy jsou struktury, které z bakteriální buňky aktivně odčerpávají různé molekuly bez nutnosti jejich chemické modifikace. Bylo popsáno několik typů efluxních pump, z nichž nejdůležitější zahrnují ABC, RND, MSF, SMR a MATE (vysvětlení zkratk a bližší popis viz Nikaido, 1996). Nejčastějším a nejvíce prostudovaným transportérem u *E. coli* je tříložkový systém AcrAB-TolC z rodiny RND, který na rozdíl od ostatních systémů zajišťuje transport z vnitra buňky až do extracelulárního prostoru (Kumar a Schweizer, 2005). Změna exprese složek této pumpy je zároveň spojena s bakteriální rezistencí k fluorochinolonům (**Obr. 13**).



**Obr. 13:** Mechanismus rezistence k fluorochinolonům na úrovni buněčných membrán zprostředkovaný efluxními pumpami a poriny

Vytvořeno podle Lindgren *et al.*, 2003; Piddock, 2002. AcrAB-TolC pumpa je tvořena třemi složkami zahrnujícími efluxní protein AcrB, protein AcrA, který zajišťuje spojení s vnější membránou, ve které se nachází třetí složka TolC. Exprese genu *acrAB* je regulována represorem AcrR a pozitivním regulátorem MarA. Gen kódující tento pozitivní regulátor je součástí *marRAB* operonu. Byl popsán mechanismus, při kterém mutace regulačního genu snižuje expresi poriny a zároveň zvyšuje aktivitu efluxní pumpy. Konkrétně se jedná o mutace v genu *marR* vedoucí ke zvýšené expresi operonu a nadprodukcí aktivátoru MarA. Zvýšené množství aktivátoru má za následek zvýšení exprese *acrAB* (a tím nárůst efluxního proteinu AcrB) a současný pokles syntézy OmpF. Tento mechanismus vede jednak ke sníženému příjmu antibiotika a dále k jeho aktivnímu vylučování z buňky efluxní pumpou.

U gramnegativních bakterií bylo popsáno několik dalších efluxních systémů odpovědných za rezistenci k chinolonům, několik systémů byla nalezena také u bakterií grampozitivních. Z hlediska rezistence k fluorochinolonům mají efluxní systémy význam pouze v kombinaci s dalšími mechanismy, např. mutacemi v cílových enzymech a změnou v propustnosti plazmatické membrány (Hooper a Rubinstein, 2003). Efluxní pumpy kódované geny na plasmidech byly rovněž dokumentovány a budou blíže představeny v kapitole 5.2.2.

### 5.2.1.2 Mutace cílových struktur chinolonů

Chromozomálně zakotvená rezistence k chinolonům může u gramnegativních bakterií vznikat v důsledku bodových mutací v genech kódujících topoizomerázu II; mutace v topoizomeráze IV spojené s rezistencí jsou méně časté. Mutace vedou ke změně primární struktury enzymu, což má za následek snížení specifity cílového místa pro navázání antibiotika. K těmto mutačním změnám dochází v tzv. oblastech určujících rezistenci k chinolonům (QRDR – „quinolone resistance-determining region”), které se vyskytují v blízkosti aktivního centra enzymu (Tyr122) interagujícího s DNA. Stupeň rezistence je závislý na místě mutace a substituované aminokyselině. U kmenů gramnegativních bakterií rezistentních k chinolonům jsou dokumentovány změny především v podjednotce GyrA, změny v GyrB jsou méně časté a jsou obvykle spojeny pouze s nízkou hladinou rezistence. Oblast QRDR GyrA se nachází mezi kodony 67 a 106. Nejčastější mutace spojené s vysokým stupněm rezistence probíhají v pozicích 83 a 87 (Hooper a Rubinstein, 2003; Saenz *et al.*, 2003). V souvislosti s rezistencí k fluorochinolonům byly dokumentovány i mutace v genu *parC*. Ty se u izolátů gramnegativních bakterií s vysokou hladinou rezistence nachází především v kombinaci s mutacemi *gyrA*. Cílovými místy substitucí v ParC spojených s rezistencí k fluorochinolonům jsou u *E. coli* nejčastěji Ser80 a Glu84. Mutace *parE* se u gramnegativních bakterií vyskytuje velice zřídka a není obvykle spojena s klinickou rezistencí (Hooper a Rubinstein, 2003). Přehled nejčastěji popisovaných mutací QRDR u *E. coli* a jejich vztah k hladině rezistence k chinolonům je uveden v **Tab. 6**.

**Tab. 6:** Příklady substitucí v QRDR topoizomeráz u izolátů *E. coli* v kontextu rezistence k chinolonům

MIC (mg/l)		GyrA		ParC	
CIP	NAL	Ser83	Asp87	Ser80	Glu84
0,007	2	-	-	-	-
0,06–1	nt	-	Gly	-	-
0,03–8	64– > 512	Leu	-	-	-
1	nt	Leu	Gly	-	-
1	nt	Leu	Asn	-	-
2	nt	Leu	Tyr	Ile	-
2– > 128	nt	Leu	Asn	Ile	-
4	nt	Leu	-	Arg	-
8–64	> 512	Leu	Asn	-	-
8–128	> 512	Leu	Tyr	-	-
8	nt	Leu	Gly	Ile	-
16–32	nt	Leu	Asn	Ile	Ala/Lys
32– > 128	nt	Leu	Asn	Ile	Gly
64	nt	Leu	Asn	Arg	-

Data převzata z Minarini a Darini, 2012; Vila *et al.*, 1994. Nejčastěji popisované mutace u *E. coli* rezistentní k fluorochinolonům jsou šedě podbarveny. Klinická rezistence podle EUCASTu nebo CLSI k ciprofloxacinu je > 1–2 mg/l a kyselina nalidixová ≥ 32 mg/l. CIP, ciprofloxacin; NAL, kyselina nalidixová; nt, nebylo testováno.



### 5.2.2 Plazmidy determinovaná rezistence k fluorochinolonům (PMQR)

Pro rezistenci kódovanou geny na plazmidech je v odborné literatuře používán zkrácený název PMQR („plasmid-mediated quinolone resistance“). Existence mechanismů rezistence k chinolonům vázaná na MGE byla v minulosti považována za velice nepravděpodobnou. Rychlost s jakou se rezistence k fluorochinolonům mezi bakteriemi ve světě rozšiřovala však neodpovídala matematickým modelům předpokládané četnosti mutací v *gyrA* a *parC*. Tato zjištění vedla k hlubším úvahám o existenci plazmidy determinovaných mechanismů. V 70. letech byla vyšetřena rozsáhlá sbírka plazmidů, ale žádný mechanismus rezistence k chinolonům vázaný na plazmidy nebyl popsán (Burman, 1977). Studie z roku 1987 sice popisuje PMQR u *Shigella dysenteriae* (Munshi *et al.*, 1987), později se však zjistilo, že rezistence k chinolonům je u tohoto kmene spojena s chromozomálními mutacemi (Rahman *et al.*, 1994). Původně se předpokládalo, že plazmidy by mohly nést mutované geny *gyrA* podobné těm, které byly dříve identifikovány na bakteriálním chromozomu. Takovéto plazmidy byly připraveny experimentálně v laboratoři, bylo ale pojeny pouze s drobným nárůstem MIC k chinolonům (Gomez-Gomez *et al.*, 1997). Jejich přirozený výskyt u bakterií nebyl prokázán.

Fenomén rezistence k chinolonům byl objasněn až v roce 1998 s průkazem plazmidem neseného genu *qnrA* (Martinez-Martinez *et al.*, 1998). Tento první popis byl následován objevem mnoha dalších genů se schopností se přenášet horizontální cestou. Dosud popsané PMQR mechanismy zahrnují Qnr proteiny, enzymatickou inaktivaci antibiotika acetyltransferázou AAC(6′)-Ib-cr a efluxní pumpu QepA a OqxAB.

#### 5.2.2.1 Qnr proteiny

Qnr proteiny náleží do rodiny proteinů s pentapeptidovým repetitivním motivem, přičemž počet těchto motivů se v rámci jednotlivých rodin Qnr proteinů liší (Vetting *et al.*, 2006). Do současnosti bylo popsáno 6 rodin Qnr proteinů (QnrA, QnrB, QnrC, QnrD, QnrS, QnrVC), dá se ale předpokládat existence dalších dosud neobjevených typů. Rezistence k fluorochinolonům zprostředkovaná Qnr proteiny spočívá v ochraně cílových molekul chinolonů. Qnr proteiny se vážou k DNA gyráze a snižují tak počet zásahových struktur chinolonů (Robicsek *et al.*, 2006). Přesný mechanismus protektivního účinku Qnr proteinů však nebyl zcela objasněn. Předpokládá se, že dochází ke změně struktury vazebného místa chinolonů, proto není antibiotikem rozpoznáno nebo se mění vazebná schopnost DNA gyrázy k DNA (Poirel *et al.*, 2012c).

#### Nomenklatura Qnr proteinů

Z důvodu narůstajícího počtu popisovaných *qnr* genů byla stanovena pravidla jejich klasifikace a pojmenování nových sekvenčních variant. Třídění do rodin je založeno na odlišnostech

v aminokyselinové sekvenci proteinu Qnr. Hranice pro zařazení proteinu do stejné Qnr rodiny je minimálně 70 % podobnost. Rozdíly v aminokyselinové sekvenci v rámci rodiny dávají za vznik novým variantám, např. QnrA1, QnrA2 atd. (Jacoby *et al.*, 2008). Byla vytvořena databáze (<http://www.lahey.org/qnrStudies/>), jejíž správci zajišťují přidělování názvů nově popsaným *qnr* genům a zároveň evidují aktuální seznamy popsaných variant. V současné době tato databáze čítá 105 variant genu *qnr* (ke dni 23. 2. 2016).

### Proteiny skupiny QnrA

QnrA byl prvním popsaným PMQR nalezeným u klinického izolátu *K. pneumoniae*. Kódující gen *qnrA1* byl nesen na plazmidu pMG252 (Martinez-Martinez *et al.*, 1998). QnrA je tvořen 218 aminokyselinovými zbytky. Původně se předpokládalo, že gen *qnrA* je vysoce konzervativní. Později však byla u izolátu *Klebsiella oxytoca* z Číny popsána další varianta *qnrA2*, která se liší od *qnrA1* ve 4 aminokyselinách (Nordmann a Poirel, 2005). Další tři variaty *qnrA3-5* byly nalezeny na chromozomu *Shewanella algae* (Poirel *et al.*, 2005), následoval popis *qnrA6* u *Proteus mirabilis* (Cambau *et al.*, 2006) a poslední varianta *qnrA7* byla identifikovaná u *S. algae* v Číně (viz databáze <http://www.lahey.org/qnrStudies/>).

### Proteiny skupiny QnrB

QnrB jsou vysoce heterogenní skupinou, která k dnešnímu dni (23. 2. 2016) čítá 80 sekvenčních variant (<http://www.lahey.org/qnrStudies/>). První gen *qnrB* byl popsán skupinou G. Jacobyho (Jacoby *et al.*, 2006). Při studiu sbírky *K. pneumoniae* z Indie pozorovali horizontální přenos nízké hladiny rezistence k chinolonům na recipientní kmeny. V té době jediný známý PMQR gen *qnrA* však neprokázali (Strahilevitz *et al.*, 2009). Zjistili přítomnost nového genu, který byl pojmenován *qnrB1*. Geny *qnrB* obvykle obsahují dva iniciační kodony ATG, u některých variant však první kodon chybí. Z tohoto důvodu se popsané proteiny QnrB liší v délce, která čítá 214 nebo 226 aminokyselinových zbytků. Pro popis nových variant je zohledňována pouze oblast proteinu ohraničená druhým iniciačním kodonem (Jacoby *et al.*, 2008). S QnrA a QnrS sdílí QnrB přibližně 40 % podobnost sekvence aminokyselin.

### Proteiny skupiny QnrS

Gen *qnrS* byl poprvé identifikován na konjugativním plazmidu u kmene *Shigella flexneri* izolovaného v roce 2003 v Japonsku (Hata *et al.*, 2005). Je přepisován do proteinu QnrS o délce 218 aminokyselinových zbytků (Robicsek *et al.*, 2006). S první identifikovanou variantou QnrA sdílí 59 % podobnost proteinové sekvence. Doposud bylo popsáno jeho 9 variant

(<http://www.lahey.org/qnrStudies/>, ke dni 20. 2. 2016), přičemž kosmopolitní rozšíření vykazují pouze QnrS1 a QnrS2. Gen *qnrS1* je typický spíše pro zástupce čeledi Enterobacteriaceae (převážně *E. coli* a *Salmonella*), zatímco *qnrS2* se zdá být vázán na aeromonády (Dobiasova *et al.*, 2014<sup>33</sup>; Dobiasova *et al.*, 2015<sup>29</sup>; Jamborova *et al.*, 2015<sup>26</sup>; Literak *et al.*, 2012<sup>13</sup>; Tausova *et al.* 2012<sup>10</sup>; Wasyl *et al.*, 2014). Současná epidemiologie naznačuje šíření těchto genů u zvířat a v prostředí.

### Ostatní Qnr proteiny

Další varianty Qnr proteinů jsou v bakteriálních populacích méně časté v porovnání s výše popsanými variantami. QnrC je tvořen 221 aminokyselinami a byl poprvé identifikován u klinického izolátu *P. mirabilis* v Číně. Kódující gen byl nesen konjugativním plazmidem pHS9 (Wang *et al.*, 2009a). Geny *qnrC* se vyskytují v nízké prevalenci a zdají se být vysoce konzervativní. Prozatím byla nalezena pouze jediná varianta genu (<http://www.lahey.org/qnrStudies/>, ke dni 23. 2. 2016).

QnrD byl identifikován u humánních izolátů *Salmonella* Kentucky a *S. Bovismorbificans*. Protein je tvořen 214 aminokyselinovými zbytky. Gen *qnrD* (dnes přejmenován na *qnrD1*) byl lokalizován na malém nekonjugativním plazmidu (Cavaco *et al.*, 2009). Nedávno byla popsána nová sekvenční varianta *qnrD2* u humánního izolátu *S. Hadar* ve Švýcarsku (Abgottspon *et al.*, 2014).

Kódující geny proteinu QnrVC byly zjištěny na chromozomu izolátu *Vibrio cholerae* z roku 1998. Tyto PMQR determinant řadíme mezi atypické členy Qnr rodiny (Fonseca *et al.*, 2008). Proti ostatním *qnr* genům se *qnrVC* vyskytují ve formě genové kazety integronů. Nefunkční varianta tohoto genu byla nalezena také na plazmidu (Fonseca *et al.* 2008). Kromě vibrií byly identifikovány u jiných skupin gramnegativních bakterií vázaných na vodní prostředí, jako jsou aeromonády a pseudomonády (Fonseca a Vicente, 2013; Pons *et al.*, 2013). Sporadicky byly také zjištěny u enterobakterií (Tacao *et al.*, 2014). V současné době je známo 6 sekvenčních variant (<http://www.lahey.org/qnrStudies/>, ke dni 23. 2. 2016).

#### 5.2.2.2 Aminoglykozidová N-acetyltransferáza AAC(6')-Ib-cr

AAC(6')-Ib-cr je prvním popsaným bifunkčním enzymem, který je schopný modifikovat strukturně odlišná antibiotika – aminoglykozidy a fluorochinolony. Gen *aac(6')-Ib-cr* byl popsán v roce 2006 jako sekvenční varianta genu *aac(6')-Ib* kódující aminoglykozidovou N-acetyltransferázu. Tento enzym katalyzuje acetylaci aminoglykozidů tobramycinu, amikacinu a kanamycinu vedoucí ke ztrátě jejich antimikrobiální aktivity. Acetylace probíhá na aminoskupině piperazylinového substituentu ciprofloxacinu a norfloxacinu. Chinolony bez N-piperazylinového substituentu tedy nejsou k účinku tohoto enzymu citlivé. Bylo popsáno přes 30 variant genu *aac(6')-Ib*, rezistence k chinolonům je však spojena s typickou záměnou ve dvou kodonech. Sekvenční analýza genu *aac(6')-Ib-cr* prokázala mutace vedoucí k substituci

aminokyselin Trp102Arg a Asp179Tyr. Substituce Asp179Tyr zvyšuje afinitu k substrátu a má tedy zásadní význam při vazbě chinolonu, zatímco záměna Trp102Arg slouží spíše ke stabilizaci. AAC(6′)-Ib-cr zajišťuje nižší hladinu rezistence k fluorochinolonům v porovnání s proteiny Qnr (Robicsek *et al.*, 2006). Gen *aac(6′)-Ib-cr* se vyskytuje ve formě kazety integronů třídy 1 a v současné době je rozšířen především díky asociaci s geny pro ESBL na společných plazmidech (Dolejska *et al.*, 2012<sup>12</sup>; Jacoby *et al.*, 2014).

### 5.2.2.3 Efluxní pumpy QepA a OqxAB

Efluxní pumpy QepA a OqxAB zajišťují rezistenci aktivním odčerpáváním antibiotika z buňky. Kódující geny OqxAB byly poprvé popsány na konjugativním plazmidu pOLA52 u izolátu *E. coli* z prostředí prasečí farmy (Sorensen *et al.*, 2003). Později byl gen *oqxAB* nalezen na plazmidu u humánního klinického izolátu *E. coli* v Jižní Koreji a také na chromozomu *K. pneumoniae* (Kim *et al.*, 2009). Náleží do rodiny RND („*r*esistance-*n*odulation-*c*ell *d*ivision“) a zajišťuje odčerpávání chinoxacilinového derivátu olaquinoxu, který byl dlouhodobě používán jako antibiotický růstový stimulátor v chovech prasat. Jedná se o multifunkční pumpu, která přenáší další molekuly včetně chloramfenikolu (Hansen *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2004).

Efluxní pumpa QepA náleží do rodiny MFS („*m*ajor *f*acilitator *s*uperfamily“) a je posledním popsaným genem PMQR. Je tvořena 551 aminokyselinovými zbytky a podmiňuje rezistenci k hydrofilním fluorochinolonům. Gen *qepA1* byl identifikován na plazmidu pHA u klinického izolátu *E. coli* v Japonsku (Yamane *et al.*, 2007). Sekvenční analýza plazmidu prokázala, že se v blízkosti genu *qepA1* nachází gen *rmtB* kódující 16S rRNA metylázu, která podmiňuje rezistenci k aminoglykozidům, tyto dva typy rezistence jsou tedy často přítomné společně. Druhá později popsaná varianta QepA2 obsahuje záměnu dvou aminokyselin, substrátová specifita pumpy je však identická s QepA1 (Cattoir *et al.*, 2008c). Gen *qepA* se vyskytuje v nízké prevalenci (Jacoby *et al.*, 2014).

### 5.2.3 Původ genů PMQR a jejich biologická role

Narůstající prevalence a výskyt nových variant genů *qnr* iniciovalo hledání jejich původu. Podobně jako u jiných mechanismů rezistence se předpokládala existence rezervoárů v prostředí. Pátrání vyústilo v první nález genu *qnrA3* u *S. algae*, která obývá sladkovodní a mořské prostředí. Gen *qnrA3* byl lokalizován na chromozomu, nebyl obklopen žádnými MGE a zároveň vykazoval obsah bazí G+C charakteristický pro rod *Shewanella*, což podpořilo domněnku, že se u této bakterie vyskytuje přirozeně (Poirel *et al.*, 2005). Byl také popsán v genomu dalších bakteriálních druhů jako *Vibrio parahaemolyticus* a *Photobacterium profundum* (Saga *et al.*, 2005). Výsledky analýz blízkého okolí genu *qnrA3* u *S. algae*,

keré se shodovalo s klinickými izoláty, ukazuje na původ tohoto genu u *Schewanella* spp. a příbuzných bakterií (Lascols *et al.*, 2008).

Další důkazy o původu PMQR přinesla *in silico* analýza genomu *Vibrio splendidus*, u kterého byl prokázán úsek kódující protein s vysokou podobností sekvence aminokyselin s proteiny QnrS1 a QnrS2 (Cattoir *et al.*, 2007). Nízké hladiny chinolonů nalezené v povrchových vodách pravděpodobně přispívají k udržování rezervoárů PMQR genů u vodních mikroorganismů, které tak mohou v prostředí kontaminovaném antibiotikem získat určitou selekční výhodu (Al-Ahmad *et al.*, 1999; Batt *et al.*, 2006; Strahilevitz *et al.*, 2009; Tamtam *et al.*, 2008). Varianty genu *qnrS* jsou často nalézány na plasmidech vodních bakterií jako *Aeromonas* spp. (Cattoir *et al.*, 2008b; Dobiasova *et al.*, 2014<sup>33</sup>), které mohou ve vodním prostředí představovat zdroj genů pro významné patogeny člověka.

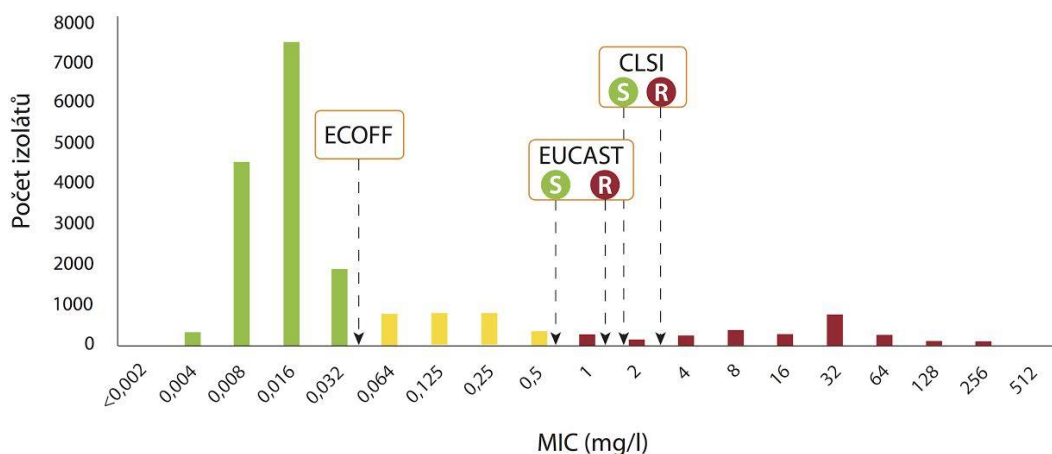
Geny vykazující vysokou sekvenční homologii s genem *qnrB* byly nalezeny u mořských bakterií (Sanchez *et al.*, 2008; Venter *et al.*, 2004). Za rezervoár *qnrB* genů pro humánní klinické izoláty je považován *Citrobacter* spp., v jehož genomu byly identifikovány různé varianty tohoto genu. Tento bakteriální druh je rozšířen ve vodním prostředí a zároveň patří mezi významné oportunní patogeny člověka (Jacoby *et al.*, 2011). Zdroj PMQR genů kódujících efluxní pumpy nebyl zcela objasněn. Za původce se předpokládají zástupci Actinomycetales, jelikož membránové transportéry této skupiny bakterií vykazují významnou sekvenční homologii s pumpou QepA a zároveň obsah G+C bazí kódujícího genu *qepA* je blízký aktinomycetám (Poirel *et al.*, 2012c).

Předpokládá se, že předci *qnr* genů u bakterií v prostředí plní vlastní biologickou úlohu než čistě ochranu před inhibičním účinkem chinolonů. Jedna z hypotéz tvrdí, že Qnr by mohly sloužit jako antitoxin chránící DNA gyrázu a topoizomerázu IV před účinkem přirozeně se vyskytujících toxinů těchto enzymů (Ellington a Woodford, 2006). V sekvenci genu *qnrB* bylo nalezeno vazebné místo pro protein LexA, který se účastní SOS odpovědi (Wang *et al.*, 2009b). Qnr proteiny by tak mohly hrát úlohu v ochraně DNA.

#### 5.2.4 Klinický význam PMQR

Samotná přítomnost genu *qnr* je spojena pouze s mírným navýšením MIC k chinolonům, která nepřesahuje hraniční hodnoty definované pro klinickou rezistenci (**Obr. 14**). Míra navýšení MIC je závislá na mnoha faktorech, které zahrnují typ PMQR genu, počet kopií a transkripční aktivita genu, typ chinolonu a další. Přítomnost Qnr proteinů je obecně spojena s vyšším nárůstem hodnoty MIC vůči ciprofloxacinu (nárůst MIC 8–32krát) v porovnání s kyselinou nalidixovou (2–4krát). Míra navýšení MIC spojená s AAC(6′)-Ib-cr nebo QepA je nižší v porovnání s proteiny Qnr (Strahilevitz *et al.*, 2009). Příklady hodnot MIC ciprofloxacinu popsanych u kmenů *E. coli* a *Salmonella enterica* nesoucích různé skupiny PMQR determinant jsou uvedeny v **Tab. 7**.

Výše uvedené charakteristiky spojené s PMQR tedy přináší otázku jejich vlastního klinického významu tohoto mechanismu rezistence. Přítomnost PMQR genu usnadňuje tvorbu spontánních mutací v chromozomálních genech pro topoisomérázu II, což vede ke vzniku klinické rezistence k FQ (Martinez-Martinez *et al.*, 1998). To je možné vysvětlit tím, že izoláty nesoucí PMQR již disponují jistou mírou odolnosti vůči fluorochinolonom a snadněji tak podléhají *in vivo* selekci přídatných chromozomálních mechanismů rezistence během antimikrobiální léčby (Nordmann a Poirel, 2005). Tento fenomén je blíže vysvětlen v následující kapitole. Význam PMQR také souvisí s jejich schopností se efektivně šířit horizontální cestou mezi bakteriemi. Z klinického hlediska je také důležité, že většina plazmidů nesoucích PMQR geny je zároveň sdružena s geny rezistence k dalším antibiotikům včetně cefalosporinů nebo karbapenemů. Získáním genu PMQR tak může recipientní bakterie nabýt profilu multirezistence (Jacoby *et al.*, 2014).



**Obr. 14:** Distribuce MIC ciprofloxacinu v populaci *E. coli*

Upraveno podle Canton a Morosini, 2011. S, citlivý; R, rezistentní. Izoláty (červené), které přesahují hodnotu MIC > 1 mg/l (na základě hraničních hodnot EUCAST) nebo > 2 mg/l (podle CLSI) jsou z klinického hlediska hodnoceny jako rezistentní k ciprofloxacinu. Populace s klinickou citlivostí k ciprofloxacinu však zahrnuje také izoláty se sníženou citlivostí (MIC v rozmezí 0,05–1 nebo 0,05–2 mg/l). Izoláty (žluté) s hodnotou MIC nad ECOFF (> 0,05 mg/l) jsou tedy považovány za rezistentní z mikrobiologického hlediska. Takovéto izoláty obvykle nesou jednobodové mutace v *gyrA* nebo plazmidově determinovanou rezistenci, která není spojena s rezistencí z klinického pohledu. Klinická rezistence je naopak spojena s minimálně dvěma mutacemi v *gyrA* nebo kombinací mutací *gyrA* a *parC*. Zcela citlivá populace (zelená) má hodnoty MIC pod hladinou ECOFF.

**Tab. 7:** Vliv PMQR genů a jejich kombinací s chromozomálními mutacemi *gyrA* nebo *parC* na hodnoty MIC a MPC ciprofloxacinu

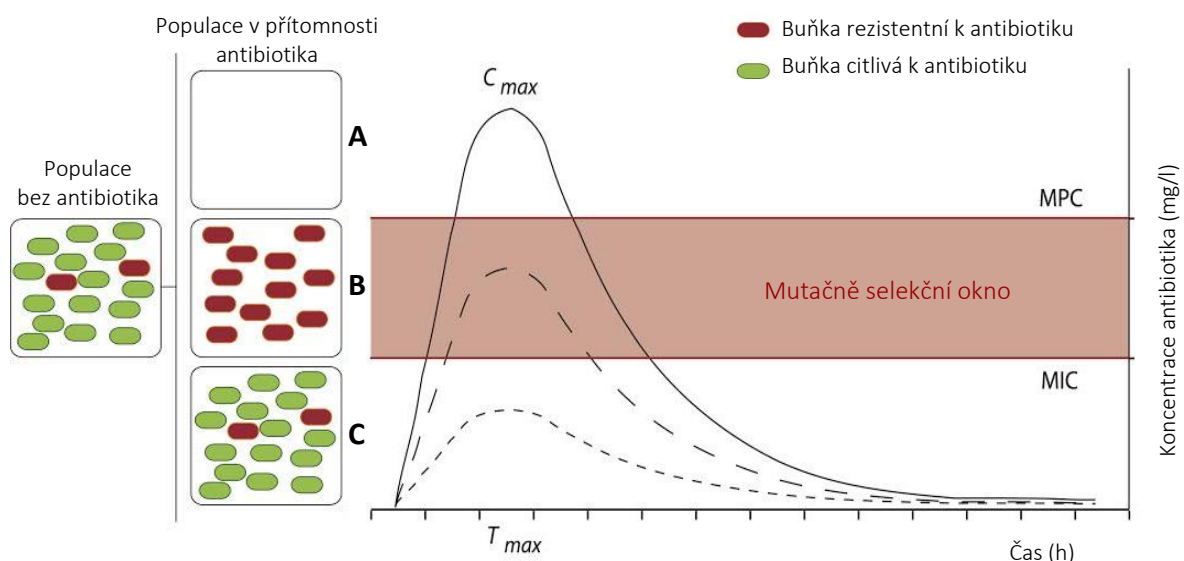
Bakteriální druh	Mechanismus rezistence		Ciprofloxacin (mg/l)	
	PMQR	Mutace <i>gyrA/parC</i>	MIC	MPC
<i>E. coli</i>	-	-	0,002	1
	-	<i>gyrA</i>	0,125	4
	<i>qnrA</i>	-	0,125	8
	<i>qnrA</i>	<i>gyrA</i>	0,5	16
	<i>qnrB</i>	-	0,125	2
	<i>qnrB</i>	<i>gyrA</i>	0,5	8
	<i>qnrS1</i>	-	0,125	4
	<i>qnrS1</i>	<i>gyrA</i>	1	8
<i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium	-	-	0,015	0,125
	-	<i>parC</i>	0,015	0,125
	-	<i>gyrA</i>	0,25	2–4
	-	<i>parC+gyrA</i>	4	64
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	-	0,06	1
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>parC</i>	0,06	1
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>gyrA</i>	1	8–16
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>parC+gyrA</i>	16	128
	<i>qepA</i>	-	0,125	2
	<i>qepA</i>	<i>parC</i>	0,125	2
	<i>qepA</i>	<i>gyrA</i>	2	32
	<i>qepA</i>	<i>parC+gyrA</i>	16	128
	<i>qnrB4</i>	-	0,5	4
	<i>qnrB4</i>	<i>parC</i>	0,5	4
	<i>qnrB4</i>	<i>gyrA</i>	1–2	16–32
	<i>qnrB4</i>	<i>parC+gyrA</i>	8	64
	<i>qnrS1</i>	-	0,5	2
	<i>qnrS1</i>	<i>parC</i>	0,5	2
<i>qnrS1</i>	<i>gyrA</i>	1	8–16	
<i>qnrS1</i>	<i>parC+gyrA</i>	8	64	

Upraveno podle Canton a Morosini, 2011. PMQR, plazmidy determinovaná rezistence k chinolonům; MIC, minimální inhibiční koncentrace; MPC, mutačně preventivní koncentrace. Problematika MPC je vysvětlena v kapitole 5.2.5.

### 5.2.5 PMQR a mutačně selekční koncentrace

Ke stanovení *in vitro* citlivosti k antimikrobiální látce se začal využívat parametr tzv. mutačně preventivní koncentrace MPC („mutation prevention concentration“). MPC je definována jako nejnižší koncentrace antibiotika potřebná k inhibici růstu nejméně citlivé buňky ve vysoce denzních bakteriálních populacích (populace s koncentrací buněk okolo  $10^{10}$ ). V praxi pak hodnota MPC umožňuje stanovit pravděpodobnost selekce rezistentních bakterií v průběhu terapie antibiotiky (Blondeau, 2009). V případě, že koncentrace chinolonu přesahuje MPC, je nízké riziko vzniku buněk s jednobodovými mutacemi (**Obr. 15**). Experimentálně bylo však prokázáno, že přítomnost *qnr* genu významně zvyšuje hodnotu MPC. Například přítomnost *qnrA* je odpovědná za více než desetinásobné navýšení této hodnoty. Nízká hladina rezistence spojená s přítomností *qnr* genu pravděpodobně neumožní bakteriální

populaci přežít inhibiční účinek chinolonu, ale významně navýší počet mutantů s vysokou hladinou rezistence. Přítomnost genu *qnr* tedy hraje pro buňku významnou úlohu pro vznik klinické rezistence k chinolonům v důsledku tvorby bodových mutací v genech pro gyrázu a topoizomerázu. Závěrem je tedy možné konstatovat, že klinický důsledek přítomnosti PMQR genů spočívá v navýšení MIC chinolonů a rozšíření mutačně selekčního okna, společně vedoucí ke sníženého terapeutického účinku chinolonů (Jacoby *et al.*, 2014; Poirel *et al.*, 2008a; Poirel *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2005).



**Obr. 15:** Vliv koncentrace antibiotika na selekci rezistentních mutant

Upraveno podle Canton a Morosini, 2011. MPC, mutačně-preventivní koncentrace; MIC, minimální inhibiční koncentrace; c, koncentrace antibiotika v mg/l; T, čas v hodinách. Křivky A–C reprezentují kinetiku antibiotika v makroorganizmu v čase během antimikrobiální léčby. Složení bakteriální populace při dané terapeutické dávce je znázorněno ve čtvercích. Křivka C - koncentrace antibiotika je pod hodnotou MIC a složení mikrobiální populace se nemění. Křivka B - koncentrace antibiotika nedosahuje hodnoty MPC a nachází se v oblasti mutačně-selekčního okna. Při této koncentraci antibiotika v makroorganizmu tedy dochází k selekci rezistentních mutant. Křivka A - koncentrace antibiotika převyšuje hodnotu MPC, růst citlivých bakterií je inhibován a riziko selekce rezistentních mutant je nízké.

### 5.2.6 Metody detekce bakterií s PMQR

Jelikož je přítomnost PMQR genů u bakterií spojena pouze s mírným navýšením MIC k chinolonům, unikají naší pozornosti při laboratorní diagnostice. Klinická rezistence k ciprofloxacinu je definována hodnotou > 1 mg/l nebo 2 mg/l. Expres genů PMQR mírně navyšuje MIC ciprofloxacinu na 0,06–0,2 mg/l, tedy na hodnotu výrazně pod hraničními hodnotami pro klinickou rezistenci. Bakteriální izoláty s MIC nad hodnotou ECOFF (> 0,05 mg/l) je nutné považovat za potenciální nositele plazmidy



determinované rezistence k chinolonům. Vyšetřením antimikrobiální citlivosti diskovým difuzním testem nebo mikrodiluční metodou neumožňuje tyto izoláty odhalit a ty jsou pak chybně interpretovány jako citlivé k fluorochinolonům. Další komplikací v detekci jsou časté kombinace různých mechanismů rezistence k fluorochinolonům, kterými je například současná přítomnost genu PMQR a mutace genů v QRDR oblasti kódující gyrázu. Chromozomální mutace výrazně navyšují MIC a mohou tak maskovat přítomnost PMQR genu. V detekci PMQR mechanismů nachází uplatnění především metody molekulární biologie jako multiplex PCR doplněné stanovením primární sekvence genu (Ciesielczuk *et al.*, 2013). V běžných klinických laboratořích se z důvodu časové a technické náročnosti a diskutabilního klinického významu nepoužívají. Detekce PMQR genů se provádí spíše pro epidemiologické účely.

### 5.2.7 Charakteristické vlastnosti izolátů s PMQR

Epidemiologie genů PMQR je v určitém ohledu podobná té, která je dnes popisována pro širokospektré beta-laktamázy. Podobně jako kmeny produkující ESBL i izoláty enterobakterií nesoucí geny PMQR jsou obvykle multirezistentní. Kromě fluorochinolonů často odolávají beta-laktámům, aminoglykozidům, chloramfenikolu, tetracyklinu, sulfonamidům, trimetoprimu a rifampicinu. Plazmidově kódovaná rezistence k fluorochinolonům je také sdružena s klinicky významnými přenosnými mechanismy rezistence zahrnující ESBL, AmpC nebo karbapenamázy. Obecně tedy platí, že u multirezistentních izolátů jsou geny PMQR častější a zároveň izoláty nesoucí PMQR obvykle disponují dalšími mechanismy rezistence k chinolonům, zejména mutacemi v genech kódujících gyrázu. Šíření PMQR není až na drobné výjimky spojeno se specifickými epidemickými klony, jak je tomu v případě ESBL. Mezi nejčastěji dokumentované PMQR s kosmopolitním rozšířením patří *qnrB1*, *qnrB19*, *qnrS1* a *aac(6′)-Ib-cr*. Ostatní PMQR geny se vyskytují sporadicky nebo jsou spojeny s určitými oblastmi, především s asijským kontinentem (Jacoby *et al.*, 2014; Manuel Rodriguez-Martinez *et al.*, 2011).

Geny PMQR byly identifikovány u různých zástupců čeledi Enterobacteriaceae v různých geografických oblastech a zdrojích. Výskyt genů PMQR u enterobakterií celosvětově narůstá (Strahilevitz *et al.*, 2009), nicméně stanovení hodnoty přesné prevalence není možné hned z několika důvodů. Jak bylo výše diskutováno, v klinických laboratořích jsou využívány pro stanovení citlivosti k antibiotikům převážně metody fenotypové, které od sebe nemohou jednotlivé mechanismy rezistence k chinolonům odlišit. Použití různých kritérií při výběru izolátů pro screening genů PMQR, která zúžují výchozí soubor vzorků, také znesnadňuje činit závěry o jejich prevalenci (Jacoby *et al.*, 2014).

PMQR geny jsou asociovány s nejrůznějšími typy mobilních genetických elementů zahrnujících zejména integrony, inzerční sekvence a plazmidy. Plazmidy nesoucí geny PMQR dosahují variabilní velikosti 7-320 kb a náleží do různých tříd (Dobiasova *et al.*, 2015<sup>29</sup>, 2016<sup>34</sup>; Dolejska *et al.*, 2013a,b<sup>14,17</sup>).

Varianty *qnrA* a *qnrB* se typicky vyskytují na velkých multirezistentních konjugativních plazmidech v okolí inzerční sekvence *ISCR1*. Tyto plazmidy zároveň nesou některé z beta-laktamáz SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-14, FOX-5, DHA-1, IMP-4 nebo KPC-3. Naopak geny *qnrD* byly popsány pouze na malých mobilizovatelných plazmidech, které nenesou žádnou přídatnou rezistenci (Carattoli, 2013; Dolejska *et al.* 2013a<sup>17</sup>; Jacoby *et al.*, 2014; Strahilevitz *et al.*, 2009).

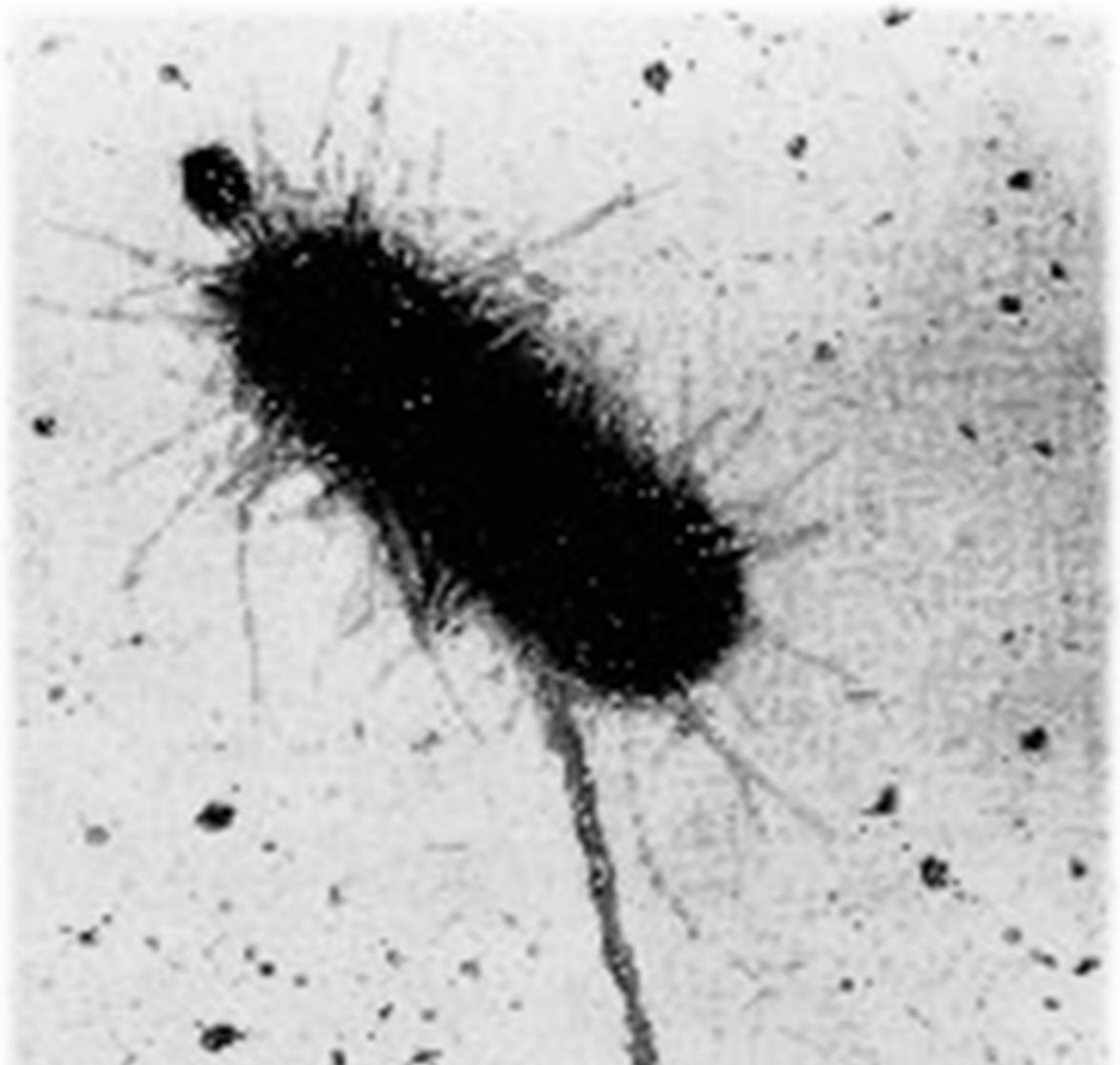
### 5.2.8 Výskyt PMQR u člověka, zvířat a v prostředí

Prevalence genů PMQR je u humánních klinických izolátů odhadována na přibližně 10 %. Mezi různými enterobakteriálními druhy z nozokomiálních i komunitních infekcí dominují varianty *qnrB* a *aac(6′)-Ib-cr*. Hlavními nositeli jsou *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *E. coli* a *Salmonella enterica* (Jacoby *et al.*, 2014). Klinické izoláty nesoucí PMQR obvykle disponují multirezistentním fenotypem, produkují ESBL nebo náleží k významné epidemické linii (např. *E. coli* ST131 sdružená s *aac(6′)-Ib-cr*). Častá je zejména asociace *aac(6′)-Ib-cr* s genem *bla<sub>CTX-M-15</sub>* u klinických izolátů *E. coli* z důvodu jejich společné lokace na multirezistentních plazmidech (Dolejska *et al.*, 2011b<sup>9</sup>; Jacoby *et al.*, 2014). Výskytu PMQR genů v běžné střevní mikroflóře 530 zdravých dětí různých věkových skupin se věnovala naše recentní práce. Selektivní izolací na médiu s ciprofloxacinem (0,05 mg/l) byl identifikován pouze jediný izolát *E. coli* s genem *qnrS1* (Literak *et al.*, 2011<sup>7</sup>). Dominantní výskyt PMQR u nozokomiálních kmenů potvrdila naše studie zaměřená na pediatrické onkologické pacienty ve Fakultní nemocnici Brno. Dvě třetiny multirezistentních kmenů Enterobacteriaceae produkujících ESBL zároveň nesly PMQR gen. Častá byla kombinace dvou genů zároveň, konkrétně variant *qnrB1* a *aac(6′)-Ib-cr* (Dolejska *et al.*, 2012<sup>12</sup>).

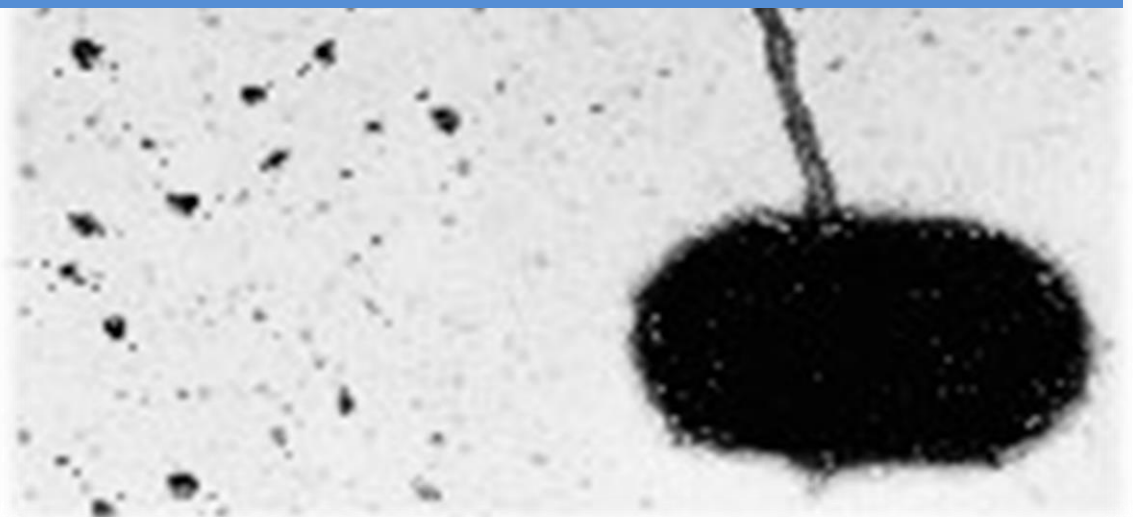
Geny PMQR jsou dokumentovány také u potravinových zvířat zejména u drůbeže (Jones-Dias *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Szmolka *et al.*, 2011; Veldman *et al.*, 2011). Nejvýznamnější práci v této oblasti představuje recentní panevropská studie (Veldman *et al.*, 2011). Rozsáhlý soubor izolátů *Salmonella enterica* a *E. coli* pocházející z člověka, potravinových zvířat, potravin a prostředí z 13 evropských zemí byl v této studii vyšetřen na přítomnost genů PMQR. Frekventovaný výskyt genů *qnrB* a *qnrS* byl pozorován zejména u různých serovarů *Salmonella enterica* z krůt. V České republice byly PMQR geny dokumentovány u izolátů *E. coli* z jateční drůbeže (Literak *et al.*, 2013<sup>16</sup>) a z prostředí krůtích farem (M. Röderová *et al.*, LF UP v Olomouci, nepublikovaná data). Soubor kmenů z jateční drůbeže navíc obsahoval multirezistentní kmeny ExPEC (Literak *et al.*, 2013<sup>16</sup>). V chovech drůbeže představují fluorochinolony antibiotika s nejvyšší spotřebou a jejich terapeutické či profylaktické použití vede k selekci rezistentních kmenů. Drůbež je považována za pravděpodobný rezervoár kmenů s vysokou hladinou rezistence k fluorochinolonom spojenou jak s mutacemi v gyrázách a topoizomerázách tak s geny PMQR. Potravní řetězec může tedy do jisté míry přispívat k přenosu těchto kmenů ke člověku.

Enterobakterie nesoucí geny PMQR byly izolovány i v běžné střevní mikroflóře volně žijících zvířat. Ve 37 % vzorků trusu synantropních havranů polních odebraných v devíti hnízdnicích lokalitách v rámci Evropy byly nalezeny enterobakterie s geny PMQR (Literak *et al.*, 2012<sup>13</sup>). V rámci lokalit byly zaznamenány velké rozdíly v prevalenci těchto genů, nejvyšší byla sledována v České republice (60 %), naopak žádný PMQR gen nebyl zachycen na hnízdišti ve Švýcarsku. Rozdílné výsledky byly ovlivněny spíše charakterem dané lokality (přítomnost významných zdrojů v prostředí) než jejich obecným rozšířením v dané zemi. Nejfrekventovanější byla varianta *qnrS1*. Podobná studie byla realizována u příbuzného druhu vrány americké v USA dokumentující vyšší prevalenci v porovnání s Evropou, která v jednotlivých lokalitách dosahovala 33-81 % (Halova *et al.*, 2014). Rovněž spektrum jednotlivých PMQR genů se lišilo a významně dominoval gen *qnrB* různých alelových variant. PMQR izoláty byly v minulosti také identifikovány z volně žijících druhů vodních ptáků (Literak *et al.*, 2010a<sup>4</sup>; Tausova *et al.*, 2012<sup>10</sup>; Veldman *et al.*, 2013). Kontaminované vodní prostředí je tedy nutné považovat za možný zdroj těchto determinantů rezistence. Výše uvedené práce dokumentují významné šíření plazmidově nesené rezistence k chinolonům do životního prostředí.





## 6. Mobilní genetické elementy v šíření rezistence





Horizontální přenos genů (HGT) je proces, při kterém dochází k fyzickému přesunu DNA z jedné buňky do druhé bez nutnosti buněčného dělení. Přenos je následován začleněním této genetické informace do genomu recipientní buňky. V literatuře se rovněž setkáváme s pojmem laterální přenos (LGT – „lateral gene transfer“), který vyjadřuje prakticky totéž. HGT představuje odlišný proces v porovnání s přenosem vertikální cestou, při kterém je genetická informace předávána z rodičů na potomky. HGT překonává nejrůznější bariéry přenosu související například s časovou, geografickou a fylogenetickou vzdáleností. Tok genů může probíhat i mezi nepříbuznými prokaryotickými buňkami a také napříč taxonomickými doménami (z bakteriálních do eukaryotických buněk a obráceně). Přenos genů je zprostředkován vektory – mobilními genetickými elementy. Jedná se o elementy různého typu disponující rozmanitou strukturou a způsoby přenosu. MGE mají obrovský dopad na složení a velikost bakteriálního genomu a významně přispívají k adaptaci bakterií.

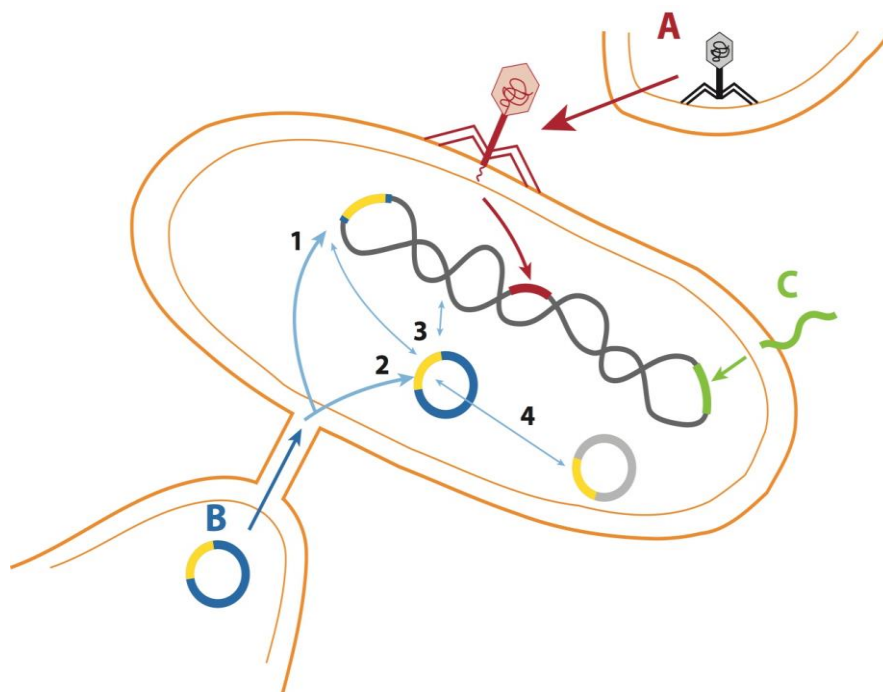
Mikroorganismy disponují schopností přizpůsobit se životu v nejrůznějších ekologických nikách, mimo jiné díky rychlé a efektivní výměně genetické informace. Přenos genů horizontální cestou do určité míry kompenzuje jinak vysoce klonální charakter života prokaryotických organismů a má významné dopady na jejich adaptaci a evoluci (Ochman a Wilson, 1987). Bylo prokázáno, že 17 % genomu *E. coli* a *Salmonella* bylo za posledních 100 miliónů let získáno v důsledku HGT (Lawrence a Ochman, 1998). HGT má za důsledek tzv. mozaikový charakter bakteriálních genomů. Tyto genomy jsou tvořeny variabilními úseky DNA, které byly získány od různých předků v různých časových bodech během evoluce. Tento proces umožňuje bakteriím získat řadu vysoce výhodných vlastností. Přenos a začlenění fragmentu DNA kódujícího virulenci může změnit komenzální kmen *E. coli* na patogenní v jednom jediném kroku. V případě získání genů rezistence k antibiotikům se jedná o přesmyk z kmene původně citlivého k antibiotikům na kmen rezistentní.

Horizontální přenos genů zprostředkovaný mobilními genetickými elementy má dnes významnou úlohu zejména v procesu vzniku, evoluce a šíření antimikrobiální rezistence se závažnými dopady na zdraví člověka a zvířat. Následující kapitoly jsou věnovány toku genů v bakteriálních populacích s důrazem na geny rezistence k antibiotikům, jeho zákonitostem a mechanismům, kterými probíhá. Budou představeny jednotlivé typy MGE gramnegativních bakterií, bude popsána jejich struktura a mechanismus přenosu mezi genomy. Největší pozornost bude věnována plazmidům, které představují nejefektivnější elementy v šíření antibiotické rezistence.

## 6.1 Horizontální přenos genů u bakterií

Přenos genetické informace z jednoho genomu na druhý probíhá v několika dílčích krocích. V první řadě musí být připravena nukleová kyselina (DNA nebo RNA) k vlastnímu přenosu. Tento krok může být spojen s nejrůznějšími mechanizmy s ohledem na typ přenosu a charakter přenášené molekuly. Zahrnuje například sbalení nukleové kyseliny do fágové hlavičky v případě přenosu pomocí bakteriofága, replikaci plazmidu při přenosu plazmidové DNA konjugací nebo pasivní uvolnění DNA do okolního prostředí v důsledku buněčné lýze. Přípravný krok je následován vlastním přenosem, který může, jako tomu je v případě bakteriální konjugace, vyžadovat fyzický kontakt buněk dárce a příjemce. Aby se tato přenesená nukleová kyselina stala součástí recipientní bakterie a mohla být předávána do další generace, musí v dalším kroku dojít k její stabilizaci v recipientní buňce. To je umožněno jejím začleněním do cílového genomu homologní rekombinací nebo transpozicí. Získaná genetická informace se může v buňce udržovat také v podobě samostatně se replikujícího elementu (Thomas a Nielsen, 2005).

Mechanismy přenosu DNA mezi bakteriemi horizontální cestou zahrnují **transformaci**, **transdukcii** a **konjugaci** a jsou graficky znázorněny na **Obr. 16**.



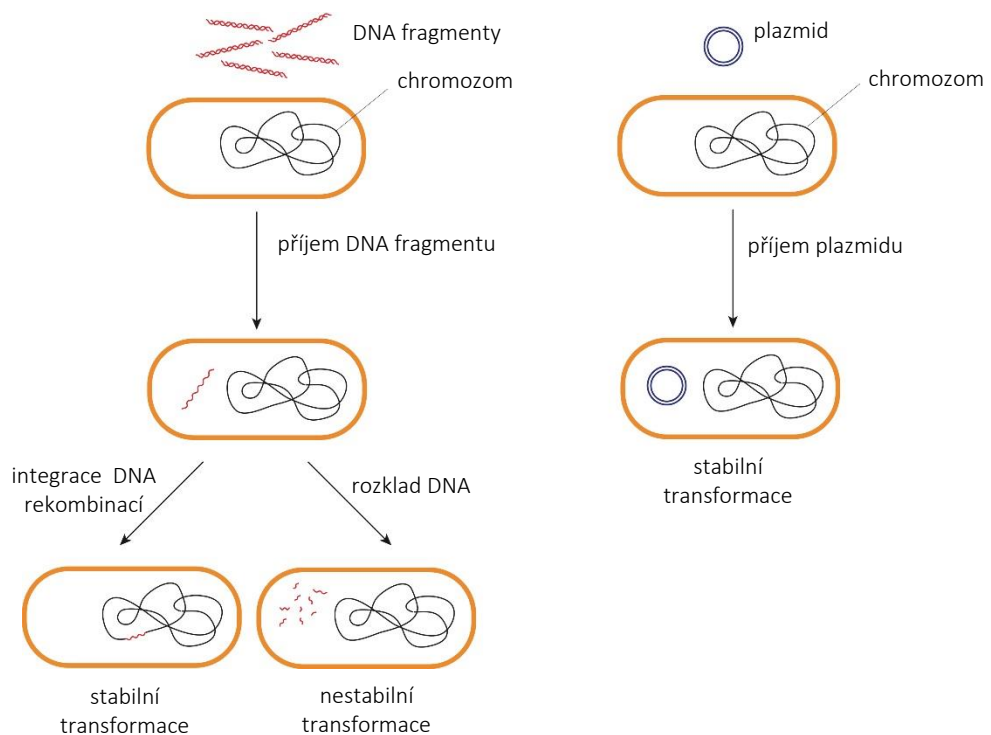
**Obr. 16:** Horizontální přenos genetické informace transdukcí (A), konjugací (B) a transformací (C)

Upraveno podle Gyles a Boerlin, 2014. (A) Transdukcce vyžaduje přenos DNA zprostředkovaný bakteriofágem. Po kontaktu fága s recipientní buňkou dochází k injekci DNA do recipientní buňky. (B) MGE v podobě plazmidu je přenášen z jedné buňky do druhé konjugací, která vyžaduje fyzický kontakt buněk zprostředkovaný pily. Gen přenášený konjugací v podobě plazmidu se může začlenit do chromozomu recipientní bakterie (1) nebo zůstane volně v cytoplasmě v podobě samostatně se replikující jednotky (2). Může také dojít k výměně dílčích genů/inzerčních sekvencí a transpozonů s bakteriálním chromozomem (3) nebo jiným plazmidem přítomným v buňce (4). (C) Transformace je zprostředkována přijmem volné DNA (v lineární nebo kružnicové podobě) z okolního prostředí.



### 6.1.1 Transformace

Jedná se o příjem volné molekuly (případně fragmentu DNA) z okolního prostředí následovaný jejím stabilním začleněním do genomu recipientní buňky. DNA se do prostředí dostává obvykle jako důsledek lýze bakteriální buňky při buněčné smrti. Transformace byla popsána v roce 1928 F. Griffithem (Griffith, 1928) jako přirozený proces (**přirozená transformace**) některých druhů bakterií. Transformace je rovněž jedním ze základních nástrojů molekulární genetiky. Je využívána jako technika v oblasti genového inženýrství pro přenos genetického materiálu do prokaryotických i eukaryotických buněk. V takovém případě mluvíme o **transformaci umělé**. Bez ohledu na typ transformace je recipientní bakterie, která přijala volnou DNA, označována jako **transformant** (Mascaretti, 2003; Snyder a Champness, 2007). Proces transformace je schematicky znázorněn na **Obr. 17**.



**Obr. 17:** Přesun fragmentu DNA (A) nebo plazmidu (B) do recipientní bakteriální buňky transformací

Vytvořeno podle Snyder a Champness, 2007.

Pro příjem cizorodé DNA musí být buňka **kompetentní**, tj. ve stavu, kdy jsou přítomné receptory DNA na buněčném povrchu a proteiny specifické pro transformaci. Stav kompetence může být pro řadu mikroorganismů přirozený (přirozená kompetence) nebo může být navozen uměle v laboratorních podmínkách (umělá kompetence). Byla popsána řada klinicky významných grampozitivních (např. *Bacillus*

*subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. faecalis*) a gramnegativních bakterií (např. *Neisseria* spp., *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli*) schopných přirozené transformace (Baur *et al.*, 1996; Mascaretti, 2003; Snyder a Champness, 2007).

Přijatá DNA může sloužit jako zdroj uhlíku a dusíku, k opravě vlastní poškozené DNA nebo může být začleněna do genomu buňky rekombinací jako alternativa pohlavního rozmnožování eukaryot vedoucí ke zvýšení diverzity a zrychlení evoluce (Mascaretti, 2003; Snyder a Champness, 2007). Toto téma přehledně shrnuje recentní publikace Seitze a Blokescheho (Seitz a Blokesch, 2013).

#### 6.1.1.1 Úloha transformace v šíření rezistence k antibiotikům

Transformované geny mohou být zdrojem výhodných vlastností včetně rezistence k antibiotikům. Byl prokázán přenos úseku chromozomální DNA spojené s rezistencí k meticilinu (SCCmecII) do buněk *S. aureus* (Morikawa *et al.*, 2012) nebo získání mobilního genetického elementu a genů udílející profil multirezistence u *Acinetobacter baylyi* procesem transformace (Domingues *et al.*, 2012b; Perron *et al.*, 2012). Transformace je rovněž významným mechanismem v přenosu rezistence k penicilinu u důležitých humánních patogenů *Neisseria meningitidis* a *N. gonorrhoeae* (Spratt *et al.*, 1992).

Transformace má význam především ve vodním prostředí s vysokou koncentrací bakterií a volné DNA lyzovaných buněk jakým je například odpadní voda (Dodd, 2012). Schopnost přirozené transformace v podmínkách přirozených vodních ekosystémů byla experimentálně prokázána také u *E. coli* (Baur *et al.*, 1996).

#### 6.1.2 Transdukce

Přenos genetického materiálu z jedné bakteriální buňky do druhé zprostředkovaný bakteriofágem se nazývá transdukce. **Bakteriofágy**, neboli viry bakterií, byly první zkoumané organizmy pro jejich využití v molekulární biologii. Genom bakteriofágů se skládá z jednovláknové nebo dvouvláknové DNA nebo RNA a dosahuje velikosti jednotek až stovek kilobází. **Virulentní bakteriofágy** po pomnožení v bakteriální buňce vyvolávají její lýzi, zatímco životní cyklus **temperovaného bakteriofága** zahrnuje nelytickou fázi zvanou lyzogenie. Při tomto procesu dochází k začlenění genetické informace fága do bakteriálního chromozomu ve formě **profága** (Mascaretti, 2003; Snyder a Champness, 2007).

Transdukce byla popsána v roce 1952 Zinderem a Lederbergem (Zinder, 1955). Tvorba virových partikul při lytickém cyklu bakteriofága, který mimo jiné zahrnuje balení virové DNA do fágové hlavičky, je vysoce specializovaný proces. V některých případech však může dojít k chybnému sbalení části bakteriální DNA chromozomální či plazmidové. Při infekci další bakteriální buňky tímto fágem se uvolněná bakteriální DNA může začlenit do chromozomu bakterie rekombinací nebo transpozicí. Pokud se do

fágové hlavičky sbalil plazmid, tak se po uvolnění v recipientní bakteriální buňce může samostatně replikovat. Buňka, která přijala DNA transdukcí, se nazývá **transduktant** (Mascaretti, 2003; Snyder a Champness, 2007).

#### 6.1.2.1 Úloha transdukce v šíření rezistence k antibiotikům

Význam bakteriofágů v přenosu nejrůznějších genů *S. aureus* byl zdokumentován už v 60. letech (Dowell a Rosenblum, 1962). Transdukce je u této patogenní bakterie nejvýznamnějším mechanismem horizontálního přenosu genů rezistence k různým skupinám antibiotik včetně meticilinu (Cohen a Sweeney, 1970; Maslanova *et al.*, 2013). Hraje také důležitou roli v šíření virulentního potenciálu (Suzuki *et al.*, 2012).

Fágy jsou považovány za nejpočetnější mikroorganismy v prostředí zahrnující oceány, jezera, půdu a rovněž místa ovlivněná člověkem jako například čistírny odpadních vod (Brown-Jaque *et al.*, 2015; Calero-Caceres *et al.*, 2014; Parsley *et al.*, 2010). V těchto ekosystémech dosahují několikanásobně vyšší koncentrace v porovnání s bakteriemi a jsou zde schopné dlouhodobě přežívat a odolávat nepříznivým faktorům vnějšího prostředí (Muniesa *et al.*, 2013). Geny rezistence k chinolonům (*qnrA*, *qnrS*) a beta-laktamovým antibiotikům (*bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*) byly nalezeny ve vzorcích fágové DNA izolované z městských odpadních vod, v říční vodě a odpadní vodě z hospodářské produkce (Colomer-Lluch *et al.*, 2011a; Colomer-Lluch *et al.*, 2011b, 2014; Marti *et al.*, 2014; Parsley *et al.*, 2010). Tyto práce svědčí o významu transdukce v přenosu klinicky významné rezistence k antibiotikům.

Fágové partikule nesoucí geny rezistence byly také nalezeny ve střevním mikrobiomu člověka (Minot *et al.*, 2011; Modi *et al.*, 2013; Quiros *et al.*, 2014) a v plicích (Fancello *et al.*, 2011). Možný význam transdukce v přenosu rezistence k antibiotikům v potravním řetězci dokumentuje recentní studie, která prokázala přítomnost bakteriofágů s geny rezistence ke kanamycinu, chloramfenikolu a ampicilinu v kuřecím mase (Shousha *et al.*, 2015).

#### 6.1.3 Konjugace

Přenos genetické informace konjugací je proces pohybu DNA z jedné buňky do druhé. Na rozdíl od transformace a transdukce tedy vyžaduje přímý kontakt těchto dvou buněk. Buňka, která je dárce DNA ve formě plazmidu, se označuje jako **donorová**, zatímco buňka, do které se tato DNA přenáší, se nazývá **recipientní**. Pro recipientní buňku, která přijala DNA procesem konjugace, se používá termín **transkonjugant** (Snyder a Champness, 2007).

Proces bakteriální konjugace byl popsán v roce 1947 (Lederberg a Tatum, 1953). Bylo pozorováno, že smíchání dvou různých kmenů *E. coli* vedlo ke vzniku kmenů s odlišným genetickým

profilem než měly buňky původní. V té době se však o existenci plazmidů nevědělo a přesný mechanismus konjugace byl proto objasněn až později. Plazmidy schopné přenosu konjugací se označují jako konjugativní. Konjugativní plazmidy byly identifikovány u mnoha druhů bakterií i archeí a rovněž u některých eukaryotických buněk. Z gramnegativních bakterií jsou nejlépe prostudovány u *E. coli* a *Pseudomonas* spp., z grampozitivů potom u *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp. a *Streptomyces* spp. (Dale a Park, 2004).

Většina konjugativních plazmidů se přenáší pouze mezi úzce příbuznými druhy bakterií. Byla zdokumentována existence různých plazmidů schopných pohybu mezi prokaryotickou a eukaryotickou buňkou. Příkladem je Ti plazmid bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, který se přenáší do rostlinných buněk (Snyder a Champness, 2007). Dále byly popsány IncP plazmidy schopné konjugativní výměny mezi *E. coli* a *Saccharomyces cerevisiae* (Bates *et al.*, 1998).

Bakteriální konjugace je zdrojem genetické variability bakterií a je také nejdůležitějším nástrojem šíření genů rezistence k antibiotikům v bakteriálních populacích. Mechanismu konjugativního přenosu plazmidů a úloze těchto plazmidů v šíření rezistence k antibiotikům bude podrobně věnována kapitola 6.5.8.

## 6.2 Mobilní genetické elementy

Chromozom představuje hlavní zásobárnu genetického materiálu bakteriální buňky. Nese veškeré esenciální geny pro zajištění základních životních funkcí. Většina bakterií navíc disponuje přídatnou genetickou informací ve formě mobilních genetických elementů. Tyto elementy představují extrachromozomální úseky DNA, které poskytují buňce další výhodné vlastnosti. Některé typy MGE mají schopnost se začlenit do bakteriálního chromozomu, proto výše uvedená definice není zcela přesná. Mobilní genetické elementy jsou lépe charakterizovány jako úseky DNA, které zajišťují pohyb genetické informace v rámci genomů jedné buňky (intracelulární přenos) nebo mezi buňkami (intercelulární přenos). Byly nalezeny prakticky ve všech dosud popsaných prokaryotických genomech. Intercelulární pohyb zajišťují výše popsané procesy transformace, transdukce a konjugace. Přesuny v rámci buňky pak zprostředkovávají transponázy a místně specifické rekombinázy kódované těmito elementy spolu se systémem homologní rekombinace hostitelské buňky. Tyto procesy pak vedou k delecím, inzercím a jiným typům přesmyku genetického materiálu.

Mobilní genetické elementy mají zásadní úlohu v evoluci bakterií. Mohou nést geny kódující faktory virulence, rezistenci k antibiotikům, dezinfekčním látkám, vysoké teplotě, geny pro produkci toxinů, enzymů degradujících různé polutanty v prostředí a další funkce.

Následující kapitoly představují výčet MGE, které hrají důležitou roli v šíření rezistence k antibiotikům. Soustředí se především na charakteristiku jednotlivých typů těchto elementů, na popis jejich struktury a mechanismů jejich šíření mezi genomy. Podrobnější informace k mobilním genetickým elementům důležitým v epidemiologii ESBL se pak věnuje kapitola 7.

### 6.2.1 Inzerční sekvence

Inzerční sekvence (IS) jsou nejjednodušší a nejpočetnější mobilní genetické elementy s významnou úlohou na utváření genomu hostitelské buňky. Mají schopnost se začleňovat do různých míst genomu mechanismem, který nevyžaduje sekvenční homologii s cílovou oblastí. Dosahují velikosti 750-2000 bp a obsahují jeden nebo dva čtecí rámce. Obvykle se vyskytují v genomu ve vysokém počtu kopií. Kódují pouze enzym transponázu pro vlastní přenos, čímž se odlišují od složitějších transpozonů nesoucích další přídavné geny (Siguier *et al.*, 2006a).

Struktura IS je schematicky znázorněna na **Obr. 18A**. Až na drobné výjimky je na obou koncích ohraničena dvěma terminálními obrácenými repeticemi (IR) o délce 10 až 40 bp, repeticí levou (IRL – „inverted repeat left“) a pravou (IRR – „inverted repeat right“). Obě obrácené repetice obsahují dvě domény rozpoznávané transponázou. Doména I představuje štěpné místo, zatímco doména II místo vazebné. IRL navíc obsahuje promotor genu transponázy. Celá výše popsaná struktura IS je obvykle ohraničena přímými repeticemi (DR – „direct repeat“) o délce 2–14 bp, které tvoří součást IS, ale jsou generovány při jejím začlenění do cílové sekvence DNA. Délka DR je obvykle charakteristická pro různé rodiny IS. Absence přímých repetic v okolí IS obvykle vznikají v důsledku následných rekombinačních a delečních změn po začlenění IS do cílové sekvence (Mahillon a Chandler, 1998; Mahillon *et al.*, 1999).

IS jsou klasifikovány do rodin na základě několika kritérií zahrnujících: (a) sekvenci a délku IR, (b) sekvenci a délku DR, (c) organizaci otevřeného čtecího rámce a (d) cílové sekvence DNA, do kterých se začleňují. Primárním ukazatelem příslušnosti do stejné rodiny je vysoká sekvenční homologie genů kódujících transponázu (Siguier *et al.*, 2014). Klasifikační systém člení bakteriální IS do 26 základních rodin (Siguier *et al.*, 2006b). Souborná databáze s názvem IS Finder obsahující dosud popsané sekvence je dostupná na adrese <https://www-is.biotoul.fr/>. Do roku 2014 bylo zdokumentováno více než 4000 různých IS (Siguier *et al.*, 2015), je však možné předpokládat, že s přibývajícím daty celogenomových sekvencí bude číslo rychle narůstat.

Nomenklatura IS se řídí určitými pravidly. Původně byla zkratka IS následována přímo číslem (Campbell *et al.*, 1979), např. IS26. Pro přehlednost se později přistoupilo k jinému systému, který zohledňuje původ sekvence (Chandler a Mahillon, 2000). Název se skládá z počátečního písmene

bakteriálního rodu, u kterého byla IS popsána a je následováno prvními dvěma písmeny jeho druhového jména a dále pořadovým číslem (např. *ISBce1* popsána u *Bacillus cereus*).

Pohyb IS je zajištěn dvěma způsoby, a to jejím vyštěpením z místa donorového na místo cílové nebo se do cílového místa začleňuje kopie elementu. Mechanismus transpozice je blíže popsán v kapitole 6.2.4. Začlenění IS do cílového genomu je obvykle spojeno s přerušením čtecího rámce a delecemi celých genů. IS mají rovněž schopnost přemísťovat různé geny ve svém okolí nebo aktivovat jejich expresi. Bylo například pozorováno, že začlenění *IS1* nebo *IS10* u *Salmonella enterica* ovlivňuje expresi efluxní pumpy AcrAB-TolC, což vede ke zvýšení rezistence k fluorochinolonům (Olliver *et al.*, 2005).

Jednou z nejvýznamnějších IS v šíření rezistence k různým skupinám antibiotik je *IS26*. Je typická především pro oblasti multirezistence, ve kterých může být přítomná až v deseti kopiích a ohraničuje geny rezistence k různým skupinám antibiotik. V epidemiologii rezistence k cefalosporinům a v menší míře také k fluorochinolonům se uplatňuje *ISEcp1*, která nejen mobilizuje přilehlé geny rezistence, ale také zvyšuje jejich expresi (Partridge, 2011). Je spojena především s genem *bla<sub>CTX-M</sub>* kódujícím nejvýznamnější širokospektrou beta-laktamázu CTX-M. Pozornost jí bude blíže věnována v kapitole 7.10.1.

### 6.2.2 Transpozony

Transpozony se podobají svou strukturou inzerčním sekvencím. Nesou gen pro transponázu, jsou ohraničeny IR rozpoznávanými při transpozici a jejich začlenění do cílové sekvence je obvykle spojeno s tvorbou přímých repetit (**Obr. 18B**). Na rozdíl od IS obvykle nesou také gen pro vlastní regulaci a další geny, které nejsou potřebné pro přenos elementu (Roberts *et al.*, 2008). Transpozony jsou významné struktury v šíření rezistence k mnoha skupinám antimikrobiálních látek.

Transpozony s výše popsanou strukturou se označují jako **transpozony jednoduché**. Složitější strukturu mají **kompozitní transpozony**, které jsou ohraničeny dvěma kopiemi stejného typu inzerční sekvence ve shodné nebo opačné orientaci (**Obr. 18C**). Příkladem je kompozitní transpozon Tn9 nesoucí gen rezistence k chloramfenikolu a ohraničený *IS1* ve stejné orientaci nebo transpozon Tn10 ohraničený *IS10* v opačné orientaci a spojený s rezistencí k tetracyklinu. Inzerční sekvence ohraničující strukturu transpozonu nejsou zcela autonomní. V důsledku bodových mutací vytváří aktivní transponázu pouze jedna ze sekvencí. Při transpozici kompozitního transpozonu jsou obvykle rozpoznávány IR ohraničující transpozon na obou koncích (OE – „outside end“) a úsek je přenášen jako celek. V případě rozpoznání vnitřních obrácených repetit (IE – „inside end“) může být transponován vnitřní úsek kompozitního transpozonu. Transpozice vnitřních úseků vedou k delecím nebo ke vzniku nového typu kompozitního transpozonu. Některé transpozony disponují schopností potlačovat tento nežádoucí pohyb vnitřních úseků (Snyder a Champness, 2007).

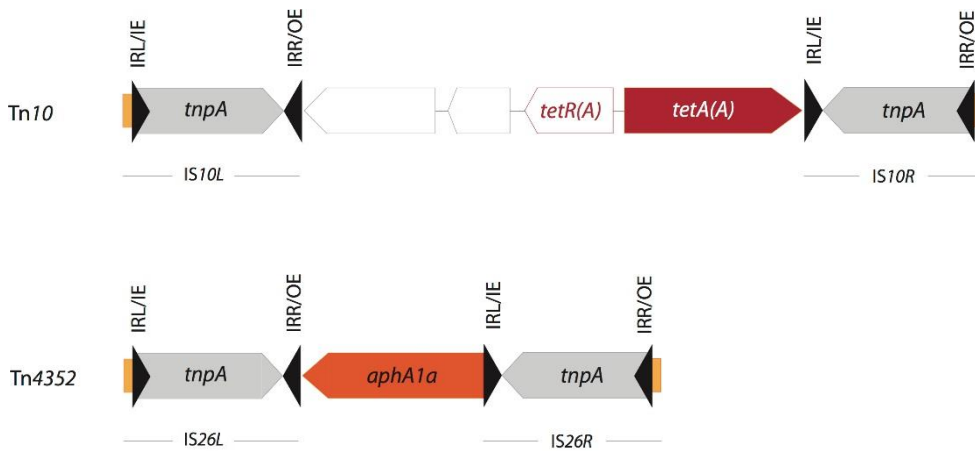
A. Inzerční sekvence s jedním nebo dvěma otevřenými čtecími rámci



B. Jednoduchý transpozon



C. Kompozitní transpozon



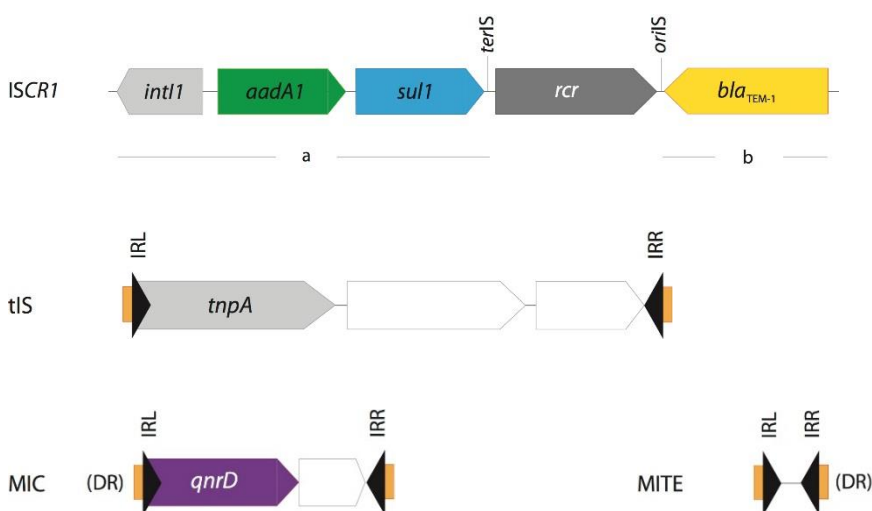
**Obr. 18:** Struktura inzerčních sekvencí a transpozonů

Levá a pravá obrácené repetice (IRL a IRR) jsou označeny černým trojúhelníkem; oranžové obdélníky ohraničující strukturu představují přímé repetice (DR) cílové sekvence, do které se MGE začleňuje; geny účastníci se transpozice jsou označeny šedě; ostatní geny jsou barevně odlišeny podle následujícího klíče: zelená – operon *mer* tvořený skupinou genů pro rezistenci ke rtuti; oranžová – *aphA1* pro rezistenci k aminoglykozidům; červená - *tetA(A)* včetně regulačního genu *tetR(A)* pro rezistenci k tetracyklinu; žlutá – *bla<sub>TEM-1</sub>* pro rezistenci k beta-laktámům. IE a OE značí vnitřní a vnější konce elementu rozpoznávané transponázou.

V genomu gramnegativních bakterií jsou nejrozšířenější **transpozony rodiny Tn3**. Hrají významnou úlohu v současné epidemiologii antibiotické rezistence. Nesou gen pro transponázu (*tnpA*) a gen *tnpR* kódující bifunkční protein, který působí jako resolváza napomáhající transpozici a zároveň jako represor bránící přenosu dalších kopií transpononu do cílových oblastí. Dále obsahují přídatné geny, které nejsou spojeny s procesem transpozice. Obvykle se jedná o geny rezistence k různým antibiotikům. Transpozony Tn3 rodiny zahrnují dvě velké podskupiny, Tn2 a Tn21, které se liší svou organizací a přenášenými geny. Skupina Tn2 obsahuje *tnpA* a *tnpR* v opačné orientaci a nese gen rezistence k beta-laktamovým antibiotikům *bla<sub>TEM-1</sub>* (Partridge a Hall, 2005). U transpozonů podskupiny Tn21 jsou geny pro transpozici orientovány stejným směrem. Tn21 je typický svojí kompozitní strukturou zahrnující geny rezistence k aminoglykozidům (*aadA1*) a sulfonamidům (*sul1*) ve formě integronu a operon *mer* tvořeným sadou genů podmiňujících rezistenci ke rtuti (Liebert *et al.*, 1999). Tn3 rodina zahrnuje také rozšířený kompozitní transpozon Tn1721 spojený s rezistencí k tetracyklinu (Allmeier *et al.*, 1992) a Tn4401 kódující karbapenemázu KPC (Naas *et al.*, 2008).

### 6.2.3 Struktury příbuzné inzerčním sekvencím

Byly popsány elementy, které se různou mírou odlišují od klasických IS a tvoří jakési pomezí mezi IS a transpozony (Obr. 19).



**Obr. 19:** Deriváty inzerčních sekvencí a transpozonů

Vlastní ISCR1 je tvořena pouze genem *rcr*. Úseky "a" a "b" značí přilehlé sekvence, které mohou být prostřednictvím ISCR1 procesem RC transpozice mobilizovány. Levé a pravé obrácené repetice IRL a IRR jsou označeny černým trojúhelníkem; oranžové obdélníky ohraničující strukturu představují přímé repetice (DR) cílové sekvence, do které se MGE začleňuje; Oblasti *oriIS* a *terIS* představují počátek a konec RC transpozice; geny účastníci se pohybu elementu jsou označeny šedě; ostatní geny jsou barevně odlišeny podle následujícího klíče: tmavě zelená – genová kazeta *aadA1* pro rezistenci k aminoglykozidům; modrá - *sul1* pro rezistenci k sulfonamidům; žlutá – *bla<sub>TEM-1</sub>* pro rezistenci k beta-laktamům; fialová – *qnrD* pro rezistenci k fluorochinolonům.



**ISCR** (CR – „common region“) náleží do rodiny IS91. Tyto elementy obsahují pouze jediný gen kódující replikázu *rcr*. Od klasických IS se dále liší absencí terminálních invertovaných repetit a přímých repetit cílových sekvencí (Partridge, 2011). Jsou ohraničeny oblastí *oriIS* a terminální sekvencí *terIS*. K pohybu v rámci genomu využívají mechanismus RC transpozice (RC – „rolling circle“) zahrnující replikaci na otáčející se kružnici, při které není terminální oblast *terIS* elementu vždy rozpoznána, replikace pokračuje a tímto způsobem se mohou přenášet i přilehlé DNA sekvence (Siguier *et al.*, 2015). V okolí ISCR se často nachází integrony a geny rezistence k antibiotikům, které mohou být tímto mechanismem mobilizovány. Jedná se o geny rezistence k trimetoprimu a sulfonamidům ve formě genových kazet integronů, geny rezistence k chinolonům, aminoglykozidům a beta-laktamovým antibiotikům (Partridge, 2011; Partridge *et al.*, 2009). V jediném kroku mohou ISCR přenášet extrémně dlouhé úseky DNA dosahující až 28 kb (Tavakoli *et al.*, 2000).

**Transportérové IS (tIS)** vykazují vlastnosti IS i transpozonů současně. Přenáší geny pro regulaci transkripce, metyltransferázy a geny rezistence k antibiotikům. Jsou obvykle mnohem delší než klasické IS a vyskytují se v genomu jen v jedné kopii (Siguier *et al.*, 2009). Některé deriváty Tn3 transpozonů (např. IS1071, ISVsa19 a další) disponují vlastnostmi IS. Nemají systémem místně specifické rekombinace, která je pro transpozony typická, a také nenesou další přídavné geny (Siguier *et al.*, 2015).

Další skupinu odvozených elementů tvoří deriváty, které nejsou schopné autonomního přenosu. **MITE** („miniature inverted repeat transposable element“) jsou malé struktury o velikosti <300 bp, které pravděpodobně vznikly z inzerčních sekvencí v důsledku interních delecí. Podobně jako IS jsou ohraničeny dvěma obrácenými repeticemi. **Mobilní inzerční kazety (MIC** – „mobile insertion cassette“) obsahují ve své struktuře přenášené geny, nekódují však transponázu. MIC nesoucí gen *qnrS2* udílející rezistenci k fluorochinolonům byla dokumentována u aeromonád (Dobiasova *et al.*, 2015<sup>29</sup>). U enterobakterií byl identifikován gen *qnrD* rovněž ve formě mobilní inzerční kazety (Guillard *et al.*, 2014).

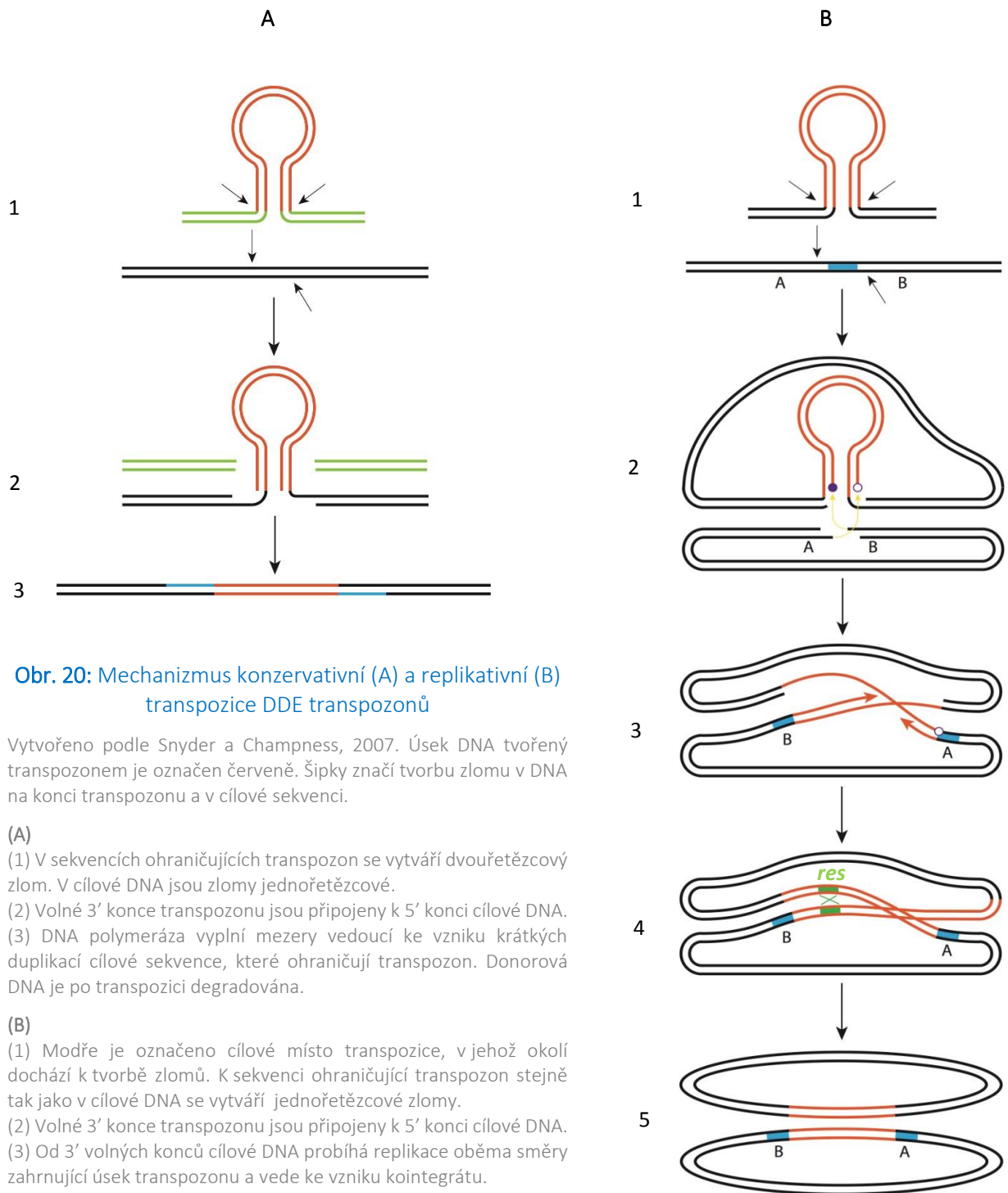
#### 6.2.4 Mechanismus transpozice

Pohyb transpozonu nebo inzerční sekvence z místa donorového do cílového je obvykle zajištěn dvěma základními procesy. Transpozice může být buď konzervativní, kdy dochází k vyštěpení elementu z donorového místa a jeho vložení na místo cílové nebo replikativní, kdy se do cílového místa dostává jeho kopie. Při konzervativní transpozici zajišťuje transponáza excizi elementu z hostitelské molekuly a naštěpení cílového úseku, do kterého je následně element přenesen. Specifita cílového místa na molekule DNA je různá v závislosti na typu transponázy (Snyder a Champness, 2007). Transpozice probíhá v bakteriální buňce zřídka (v rozmezí  $10^{-3}$  až  $10^{-8}$ ) a je zároveň přísně regulována. Vysoká

frekvence transpozice je pro hostitelskou buňku nežádoucí, zejména z důvodu rizika vzniku inzerčních mutací (Nagy a Chandler, 2004).

První skupinu tvoří tzv. DDE transpozony, pro které je charakteristická tvorba duplikací v cílové DNA sekvenci a přítomnost dvou molekul aspartátu (D) a jedné molekuly glutamátu (E) nezbytných pro transponázovou aktivitu. DDE transpozony zahrnují rozšířené typy Tn3, Tn5, Tn7 nebo Tn10 sdružené s rezistencí k antibiotikům. Transpozice Tn5 a Tn7 se děje konzervativním “cut and paste” mechanismem (**Obr. 20A**). Transponáza vytváří zlomy v obou DNA řetězcích v okolí transpozonu a v cílové molekule. Výštěpený transpozon se přemísťuje na cílové místo a donorová molekula je následně degradována (Dale a Park, 2004; Snyder a Champness, 2007). Naopak Tn3 se pohybuje mechanismem replikativní transpozice a s cílovou molekulou fúzuje za tvorby přechodných kointegrátů (**Obr. 20B**). Kointegrát je v konečném kroku rozložen místně specifickou rekombinací pomocí resolvázy TnpR kódované transpozonem. Jiné skupiny transpozonů, které gen pro resolvázu nenesou, využívají rekombinační aparát hostitelské buňky (RecA).

Zvláštní typ transpozonů představují RC (neboli Y2) transpozony, které byly popsány výše v souvislosti s ISCR elementy. Přemísťují se mechanismem replikace na otáčející se kružnici a jejich transpozice není spojena s duplikací cílového místa. Další méně početnou skupinou jsou Y a S transpozony, jejichž název je odvozen od aminokyseliny přítomné v aktivním centru transponázy (tyrosin u Y transpozonů, serin u S transpozonů). Během transpozice se tvoří kružnicové intermediáty přenášeného transpozonu, čímž se velice podobají přenosu genových kazet integronů, který je zprostředkován integrázou (Snyder a Champness, 2007). Základní mechanismy transpozice bakterií popisuje **Obr. 21**.



**Obr. 20: Mechanismus konzervativní (A) a replikativní (B) transpozice DDE transpozonů**

Vytvořeno podle Snyder a Champness, 2007. Úsek DNA tvořený transpozonem je označen červeně. Šipky značí tvorbu zlomu v DNA na konci transpozonu a v cílové sekvenci.

**(A)**

(1) V sekvencích ohraničujících transpozon se vytváří dvouřetězcový zlom. V cílové DNA jsou zlomy jednořetězcové.

(2) Volné 3' konce transpozonu jsou připojeny k 5' konci cílové DNA.

(3) DNA polymeráza vyplní mezery vedoucí ke vzniku krátkých duplikací cílové sekvence, které ohraničují transpozon. Donorová DNA je po transpozici degradována.

**(B)**

(1) Modře je označeno cílové místo transpozice, v jehož okolí dochází k tvorbě zlomů. K sekvenci ohraničující transpozon stejně tak jako v cílové DNA se vytváří jednořetězcové zlomy.

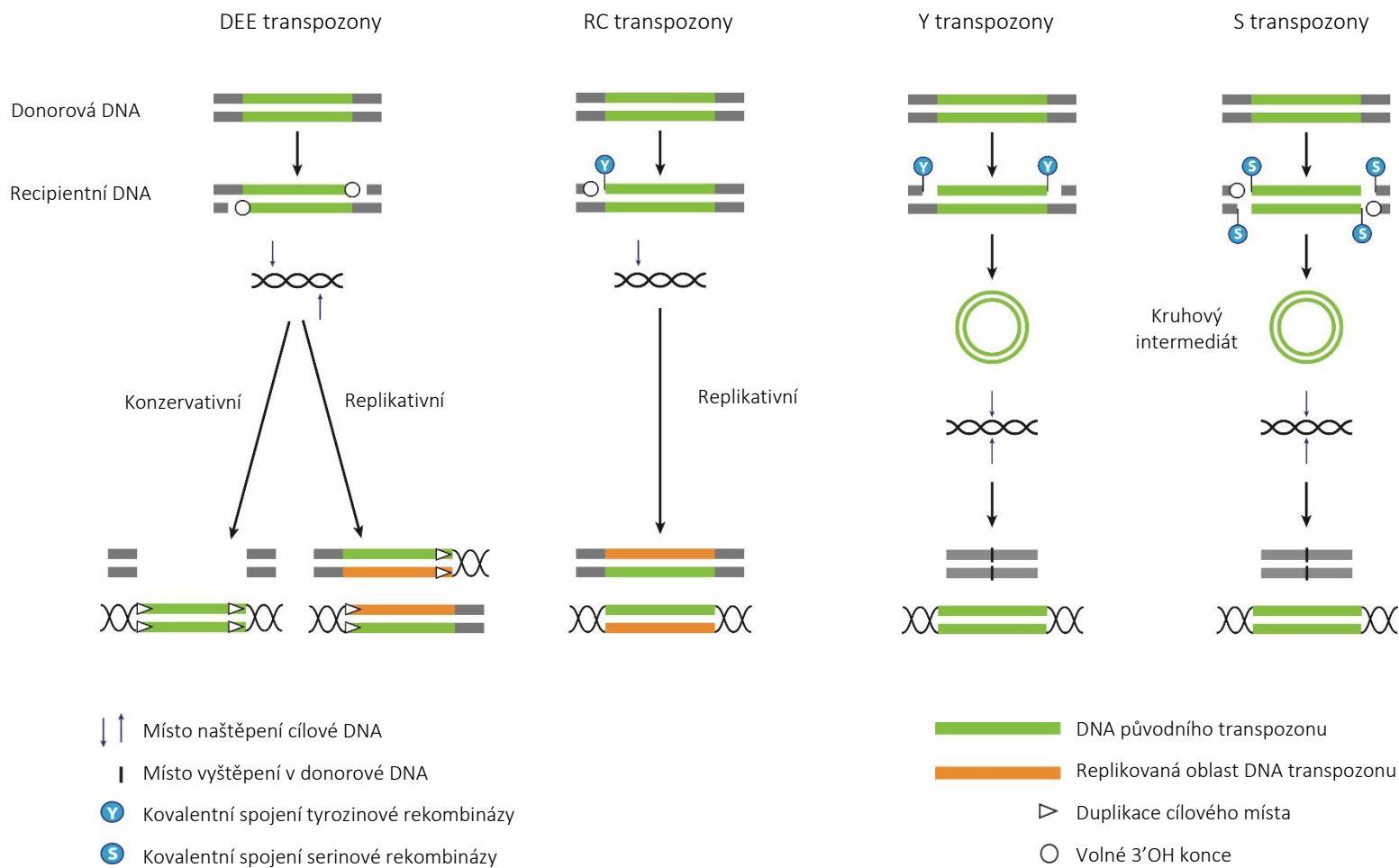
(2) Volné 3' konce transpozonu jsou připojeny k 5' konci cílové DNA.

(3) Od 3' volných konců cílové DNA probíhá replikace oběma směry zahrnující úsek transpozonu a vede ke vzniku kointegrátu.

(4-5) Vzniklý kointegrát je rozrušen rekombinací katalyzovanou resolvázou TnpR v místě *res*.

**Obr. 21:** Srovnání základních mechanismů transpozice u bakterií

Vytvořeno podle Snyder a Champness, 2007.



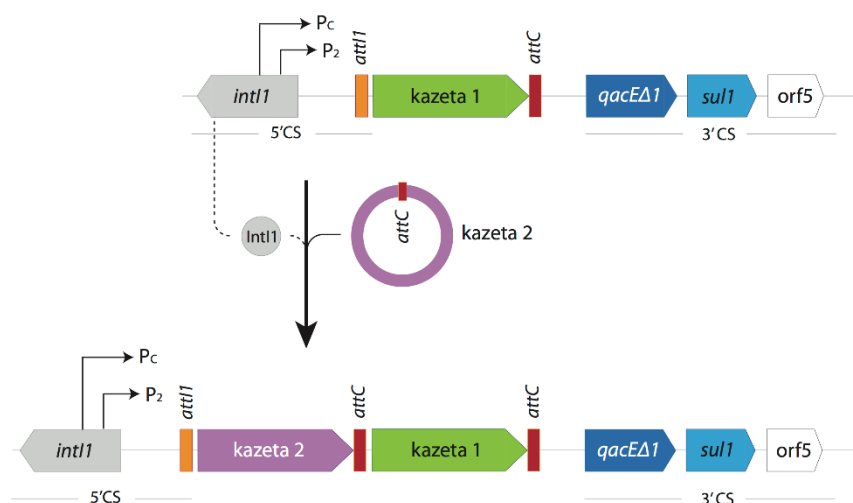
## 6.2.5 Integrony

Integrony představují expresní systémy, které začleňují otevřené čtecí rámce a převádí je do funkčních genů (Carattoli, 2001). Jsou významnými elementy v šíření genů rezistence k antibiotikům a dezinfekčním látkám. Tento typ integronů je v literatuře často označován jako mobilní rezistentní integron (MRI – „mobile resistance integron“) a je blíže představen v následujících odstavcích. Zvláštní skupinu potom tvoří tzv. superintegrony vyskytující se na chromozomu vibrií, jejichž význam v přenosu rezistence k antibiotikům je omezený.

Integrony byly popsány v 80. letech minulého století (Stokes a Hall, 1989). Bioinformatické analýzy celogenomových dat ukazují, že se jedná o rozšířené typy MGE, které tvoří 10–17 % bakteriálního genomu. Byly identifikovány převážně v genomu klinicky významných bakterií, ale předpokládá se jejich prevalentní rozšíření také u komenzálních bakterií přirozeně se vyskytujících ve vodním prostředí a v půdě (Nield *et al.*, 2001).

### 6.2.5.1 Obecná struktura MRI integronů

Pro integrony jsou typické tři složky nezbytné pro vlastní funkci. Zahrnují gen pro enzym integrázu (*intI*), vazebné místo (*attI*) a promotor zajišťující expresi genů začleněných ve formě genových kazet. Základní struktura integronu na příkladu integronů třídy 1 je představena na **Obr. 22**.



**Obr. 22:** Složení integronů třídy 1 a proces mobilizace genových kazet

Vytvořeno podle Carattoli, 2001. 5'CS je konzervativní oblast integronu na 5' konci tvořená genem *intI1* kódujícím integrázu a rekombinačním místem *attI1*. 3'CS je konzervativní oblast integronu na 3' konci tvořená geny *qacΔE1* (rezistence ke kvartérním amoniovým sloučeninám), *sul1* (rezistence k sulfonamidům) a *orf5* s neznámou funkcí. *attC* představuje aktivní místo rekombinace rozpoznávané integrázou. Integráza IntI1 katalyzuje integraci genových kazet ve volné kruhové formě do integronu místně specifickou rekombinací. Genové kazety integronu jsou přepisovány ze společných promotorů *Pc* a *P2*.

**Genové kazety** představují otevřené čtecí rámce obvykle o velikosti 500–1000 bp. Vyskytují se ve dvou formách, a to volně v cytoplazmě v podobě kruhových molekul DNA, které nemají schopnost vlastní replikace, nebo ve formě lineární začleněné do integronu (Collis a Hall, 1992; Hall a Collis, 1998). Na 3' konci obsahují sekvenci *attC*, která bývá díky své charakteristické délce označována jako 59-be (be – „base element“). Byly popsány i *attC* odlišné délky pohybující se v rozmezí 57 až 141 bp (Hall *et al.*, 1991). Oblast *attC* představuje aktivní místo rekombinace rozpoznávané integrázou. Genové kazety obvykle postrádají vlastní promotor a pro expresi využívají společný promotor integronu. Bylo identifikováno několik genových kazet nesoucích vlastní promotor, např. *cmlA* kódující rezistenci k chloramfenikolu (Bissonnette *et al.*, 1991) nebo *qnrVC* pro rezistenci k chinolonům (da Fonseca a Vicente, 2012).

**Integráza** katalyzuje integraci genových kazet do integronu procesem místně specifické rekombinace. K té dochází mezi místem *attC* volné kruhové formy genové kazety a *attI* oblastí integronu. Pokud integron již obsahuje jednu či více genových kazet, nová kazeta se začleňuje vždy do *attI* oblasti, v tomto případě tedy před první genovou kazetu integronu. Integráza také zajišťuje vyčlenění kazety z integronu. Jedná se o opačný proces v porovnání s integrací, při kterém přechází kazeta zpět do volné kruhové formy (Hall a Collis, 1998). Ve velmi nízké frekvenci může docházet také k rekombinaci *attC* oblasti genové kazety s nesespecifickým (sekundárním) místem v genomu. Tento jev byl popsán u kazety *aadB* spojené s rezistencí k aminoglykozidům, která byla nalezena na malém plazmidu RSF1010 postrádající integron (Recchia a Hall, 1995).

#### 6.2.5.2 Klasifikace MRI integronů

Integrony jsou klasifikovány do tříd na základě sekvenční homologie integrázy Intl. Databáze INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt/>) eviduje dosud popsané integrony. Poskytuje informaci o třídě integronu, jeho struktuře a bakteriálním druhu, u kterého byl integron nalezen. V současné době čítá devět tříd integronů.

Integrony třídy 1 (**Obr. 22**) jsou tvořeny dvěma konzervativními oblastmi ohraničující integron z obou stran, mezi něž jsou začleněny genové kazety. 5' konec integronu nese oblast 5'-CS (CS – „conserved segment“) tvořenou genem *intI1*, místem *attI* a dvěma promotory. Promotor  $P_C$  (označovaný také  $P_{ANT}$ ) je hlavní promotor zajišťující expresi genových kazet, zatímco druhý promotor  $P_2$  je inaktivní. Konzervovaná oblast integronu na 3' konci (3'-CS) obsahuje deletovaný gen *qac $\Delta$ E1* pro rezistenci ke kvartérním amoniovým sloučeninám, následovaný genem *sul1* kódující rezistenci k sulfonamidům a případně také *orf5* (a *orf6*) s neznámou funkcí (Carattoli, 2001). Integrony této skupiny se u klinických rezistentních izolátů vyskytují nejčastěji a zároveň je pro ně typická vysoká variabilita genových kazet (<http://integrall.bio.ua.pt/>).

Podobně jako integrony třídy 1 většina integronů třídy 2 obsahuje rekombinační oblast *attI2*, promotor *Pc* a *intI2* pro integrázu. Gen *intI2* nese v kódující oblasti vnitřní terminální kodon, jehož důsledkem je tvorba kratšího a inaktivního proteinu IntI2, který nemá schopnost rozpoznávat *attC* místo genových kazet a katalyzovat jejich začlenění do integronu. Tato vlastnost může být vysvětlením jejich nízké variability v porovnání s integrony třídy 1 (Deng *et al.*, 2015).

Integrony třídy 3 kódují funkční integrázu, která však v porovnání s integrázou IntI1 vykazuje výrazně nižší aktivitu (Collis *et al.*, 2002). Byly prokázány ve spojitosti s beta-laktamázi GES (Correia *et al.*, 2003) a IMP-1 (Arakawa *et al.*, 1995). Méně časté integrony tříd 4-9 byly nalezeny u různých druhů rodu *Vibrio* nebo u nekultivovatelných bakterií (<http://integrall.bio.ua.pt/>) a nejsou obvykle spojeny s rezistencí k antibiotikům. Integrony třídy 4 náleží mezi superintegrony a budou blíže popsány níže.

### 6.2.5.3 Mobilizace integronů

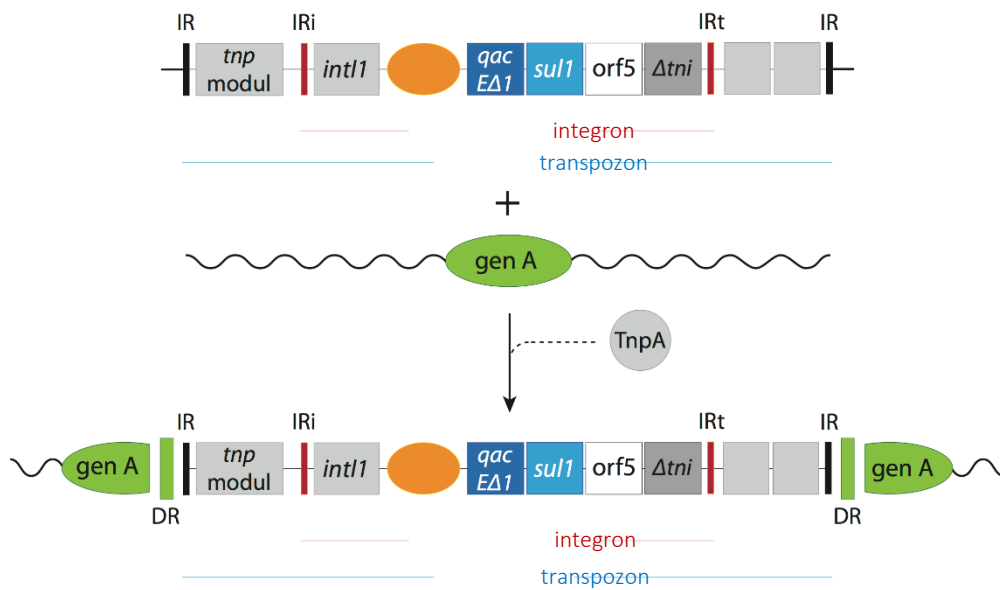
Integrony představují elementy, které nejsou schopny vlastního přenosu. Vyskytují se však jako součást jiných MGE (IS, transpozonů, MITE, genomových ostrovů), které zajišťují jejich intracelulární pohyb. Horizontální přenos integronů mezi buňkami je umožněn především konjugativními plazmidy. Nejběžnější mechanismy intracelulárního pohybu integronů shrnuje **Obr. 23**. Integron se přenáší do cílové molekuly DNA jako součást transpozonu (**Obr. 23A**). Integron ohraničený obrácenými repeticemi (IRi a IRt), který není vnořen do transpozonu, se může taktéž přenášet do cílového místa transpozicí. V tomto případě je přenos zajištěn transponázami poskytovanými *in trans* (**Obr. 23B**). Další možností je výměna integronu rekombinací mezi dvěma homologními oblastmi prostřednictvím proteinů RecA s funkcí resolvázy (**Obr. 23C**).

Integrony třídy 1 se obvykle vyskytují jako součást transpozonu Tn402. Transponáza kódovaná *tni* geny rozpoznává obrácené repetice ohraničující transpozon - IRi na 5' konci a IRt na 3' konci integronu. U většiny v současné době popisovaných integronů je *tni* oblast deletována a pohyb je zajištěn vnořením celé struktury do plazmidu nebo dalšího transpozonu, nejčastěji Tn21 (Partridge, 2011; Partridge *et al.*, 2009).

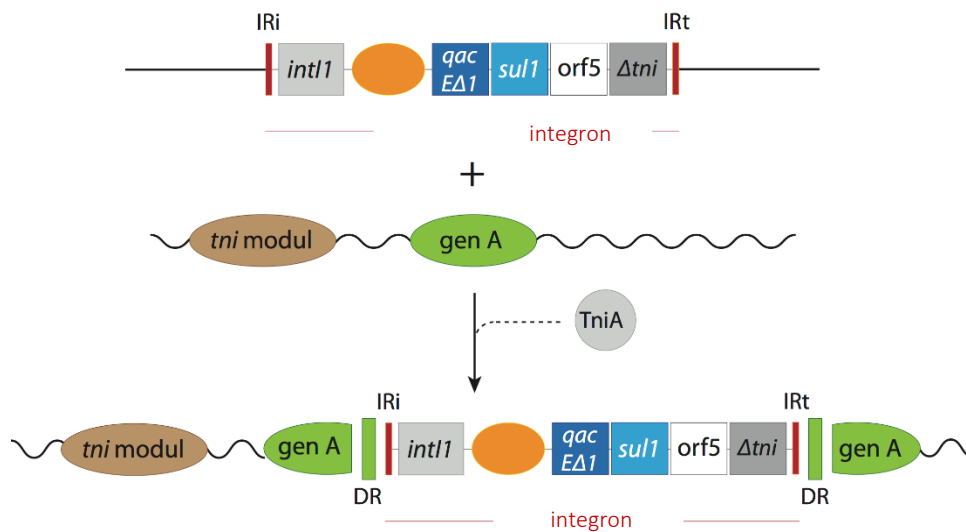
### Obr. 23: Způsoby mobilizace integronů třídy 1

Vytvořeno podle Domingues *et al.*, 2012a. Genové kazety integronu jsou vyjádřeny oranžovým kruhem. Gen A značí cílové místo, do kterého se integron přenáší jedním ze tří uvedených mechanismů. Moduly *tniA* a *tnp* obsahují kódující geny pro tvorbu transponázy TnpA nebo TniA. IR značí obrácené repetice a ohraničují (Obr. 23A) transpozon na obou stranách. V případě transpozice do genu A (Obr. 23A a B) dochází k tvorbě přímých repetic (DR) cílové sekvence. RecA je protein s funkcí resolvázy účastnící se procesu homologní rekombinace (Obr. 23C). IRI je obrácená repetice u genu integrázy, IRT je obrácená repetice u genu *tni* a společně ohraničují sekvenci integronu.

#### A. Pohyb integronu transpozicí zprostředkovaný jeho vložením do transpozonu

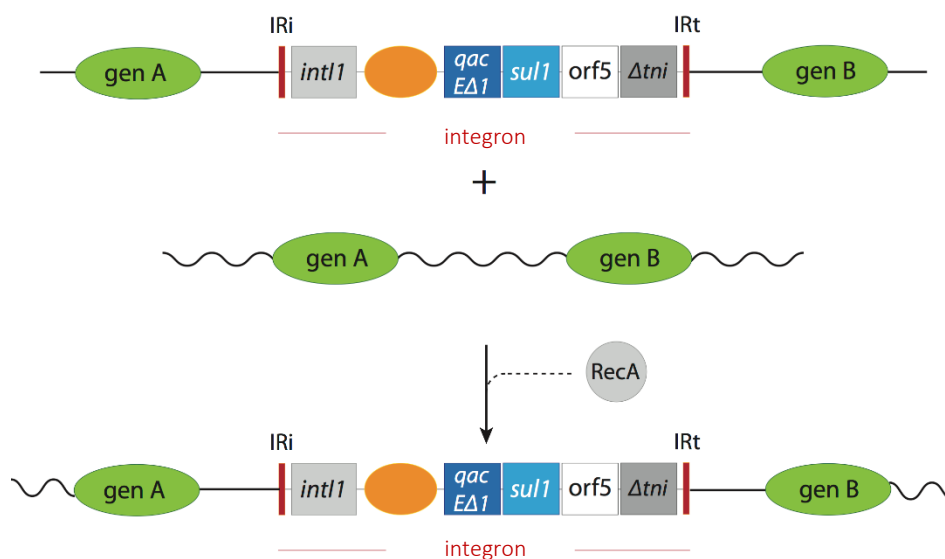


#### B. Pohyb integronu transpozicí zajištěný transponázou kódovanou *in trans*





### C. Pohyb integronu zprostředkovaný homologní rekombinací



#### 6.2.5.4 Rezistence sdružená s integrony

Organizace integronu zajišťuje současnou expresi všech genových kazet z jediného promotoru. Hladina exprese jednotlivých kazet je závislá na řadě faktorů (např. síle promotoru nebo pozici kazety). Přítomnost genové kazety v integronu nemusí být vždy spojena s rezistencí k antibiotiku. Genové kazety lokalizované ve variabilní oblasti integronu v prvním případně druhém pořadí (tedy blíže promotoru) vykazují vyšší expresi v porovnání s kazetami od promotoru vzdálenými (Collis a Hall, 1995). Tato vlastnost integronů je pravděpodobným vysvětlením limitovaného počtu genových kazet u klinicky významných integronů.

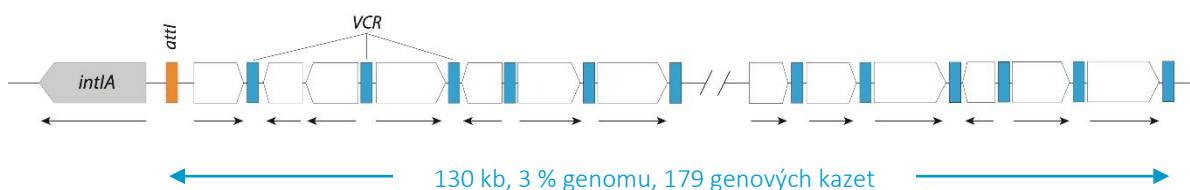
V integronech nalézáme různé kombinace genových kazet. Některé z nich jsou sdíleny napříč různými třídami integronů (Partridge *et al.*, 2009). Integrony obvykle nesou 1–3 kazety, byly však popsány integrony až s 8 genovými kazetami (Naas *et al.*, 2001). Kazety kódují rezistenci k beta–laktamům, aminoglykozidům, chloramfenikolu, trimetoprimu, rifampicinu, erytromycinu, chinolonům, fosfomycinu a linkomycinu (Partridge *et al.*, 2009). Mezi nejrozšířenější patří kazety kódující různé sekvenční varianty acetyltransferáz (geny *aacA*) a adenyltransferáz (*aadA*) podmiňujících rezistenci k aminoglykozidům a dihydrofolát reduktáz (*dfrA*) spojených s rezistencí k trimetoprimu (Deng *et al.*, 2015; Partridge *et al.*, 2009). Integrony hrají také významnou roli v epidemiologii karbapenemáz IMP a VIM (Partridge *et al.*, 2009; Papagianitsis *et al.*, 2015<sup>c28</sup>). Geny pro tyto beta-laktamázy jsou v integronech běžně sdruženy s výše zmíněnými kazetami pro rezistenci k aminoglykozidům a trimetoprimu (<http://integrall.bio.ua.pt/>).

V epidemiologii antibiotické rezistence jsou z integronů nejdůležitější zástupci třídy 1. Nachází se u různých druhů gramnegativních bakterií (zejména enterobakterií, pseudomonád, acinetobakterů a vibrií), které kromě klinických izolátů zahrnují i izoláty ze zvířat, potravin, půdy a vody. V menším měřítku se vyskytují také u klinických izolátů grampozitivních bakterií (Domingues *et al.*, 2012a).

### 6.2.5.5 Superintegrony

Tyto neobvyklé integrony byly popsány u *V. cholerae* (Mazel *et al.*, 1998). Svoji strukturou se podobají MRI integronům (Obr. 24). Na 5' konci nesou gen pro integrázu, která katalyzuje začlenění nových genových kazet do cílového místa integronu *attI*. Vazebná místa *attC* rozpoznávaná integrázou jsou označována jako sekvence VCR („*v*ibrio *c*holerae *r*epeated“) a na rozdíl od MRI integronů vykazují vysokou sekvenční homologii a podobnou délku (Rowe-Magnus a Mazel, 1999). Dosud identifikované superintegrony nesou 36–219 genových kazet a představují tak 0,7–3,1 % celkové velikosti genomu (Boucher *et al.*, 2006). Obsahují geny kódující virulenční faktory (Ogawa a Takeda, 1993; Rowe-Magnus *et al.*, 2003), rezistenci k antibiotikům (Melano *et al.*, 2002) a proteiny účastnící se metabolismu bakteriální buňky (Barker a Manning, 1997). Některé genové kazety superintegronů nesou vlastní promotor a jsou přepisovány v opačném směru (Rowe-Magnus a Mazel, 1999).

Předpokládá se, že superintegrony představují předchůdce MRI integronů. Superintegrony byly identifikovány na chromozomu *V. cholerae* ve sbírce z předantibiotické éry. Proces evoluce MRI integronů a jejich další šíření bylo nejspíše spojeno se selekčním tlakem antibiotik (Mazel *et al.*, 1998; Rowe-Magnus a Mazel, 1999). Úspěšný experimentální přenos genových kazet ze superintegronů do MRI integronů podpořil teorie původu MRI v superintegronech (Rowe-Magnus *et al.*, 2002).



**Obr. 24:** Chromozomální superintegron *V. cholerae*

Vytvořeno podle Snyder a Champness, 2007. VCR – repetitivní oblasti představující rekombinační *attC* místo. Šipky indikují směr transkripce genových kazet.

## 6.2.6 Integrativní konjugativní elementy

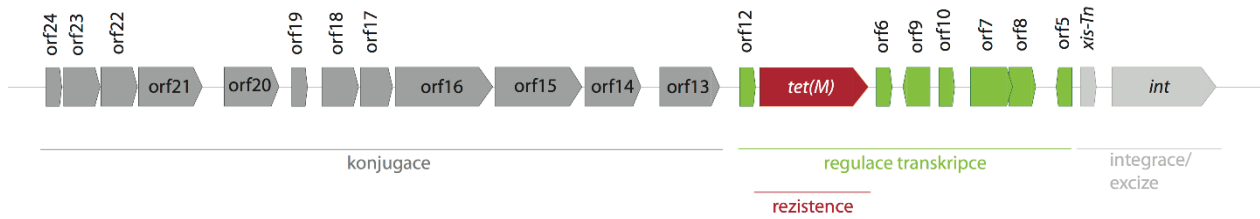
Další skupinu tvoří integrativní konjugativní elementy neboli ICE („integrative conjugative elements“), které sdílí vlastnosti plazmidů a bakteriofágů. Podobně jako plazmidy zajišťují vlastní přenos konjugací, ale nejsou schopny autonomní replikace. Začleňují se do bakteriálního chromozomu obvykle místně specifickou rekombinací a využívají tak replikační systém hostitelské buňky, což je vlastnost typická pro bakteriofágy (Wozniak a Waldor, 2010). Cílovým místem je nejčastěji 3' konec genů pro tRNA. Různé elementy se liší mírou specifity cílového místa začlenění (Bellanger *et al.*, 2014). ICE byly dokumentovány u různých druhů gram pozitivních i gram negativních bakterií (Franke a Clewell, 1981; Toleman a Walsh, 2011; Zakharova a Viktorov, 2015). Podílí se na horizontálním přenosu genů rezistence k antibiotikům a těžkým kovům nebo faktorů patogenity (Zakharova a Viktorov, 2015).

ICE jsou velice heterogenními mobilními elementy, které byly jako skupina vytvořeny až v roce 2002 (Burrus *et al.*, 2002; Pembroke *et al.*, 2002). Řada z nich byla dříve řazena mezi transpozony (např. Tn916) nebo plazmidy (např. pSAM2). Jejich současná klasifikace je založena na stupni sekvenční homologie genů pro integrázu a typu řazení kódujících genů. Velikost ICE je variabilní a pohybuje se v rozmezí desítek až stovek tisíc párů bazí. Obvykle se vyskytují pouze v jedné kopii v daném genomu. Vyznačují se modulárním charakterem, kdy se geny zajišťující danou funkci nachází společně ve formě klasterů. Integráza, kterou kódují, zajišťuje excizi ICE z donorového místa a jeho inzerci do místa cílového mechanismem typickým pro bakteriofágy  $\lambda$  (Zakharova a Viktorov, 2015).

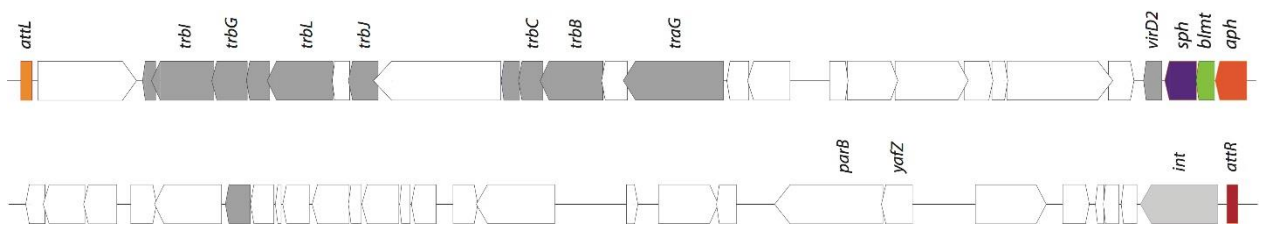
Prvním popsáním elementem této skupiny byl Tn916 u *E. faecalis* přenášející rezistenci k tetracyklinu (Franke a Clewell, 1981). Dalším dobře prostudovaným ICE je SXT/R391 *V. cholerae* (Waldor *et al.*, 1996). Dosahuje velikosti 100 kb a nese geny rezistence k sulfonamidům, trimetoprimu, streptomycinu a chloramfenikolu. Příklady ICE jsou uvedeny na **Obr. 25**.

Nové ICE rychle přibývají především díky rostoucímu množství dat z celogenomového sekvenování. V roce 2012 byla vytvořena databáze těchto elementů ICEberg (Bi *et al.*, 2012), kterou je možné nalézt na odkazu <http://db-mml.sjtu.edu.cn/ICEberg/>.

## Tn916 u *E. faecalis*



## Tn4371 u *Pseudomonas aeruginosa* PA7



**Obr. 25:** Příklady integrativních konjugativních elementů

Vytvořeno volně podle Boyd a Mulvey, 2013. Geny pro konjugaci jsou vyznačeny tmavě šedě; další typy MGE jsou zvýrazněny světle šedou; barevně jsou označeny geny rezistence k antibiotikům - *tet(M)* pro tetracyklin (červeně), *sph* pro streptomycin (fialově), *blmT* pro bleomycin (zeleně), *aph* pro neomycin (oranžově).

### 6.2.7 Genomové ostrovy

Genomové ostrovy (GEI – „genomic islands“) byly nalezeny na chromozomu některých druhů bakterií. Představují dlouhé úseky DNA (10-200 kb) s charakteristickou strukturou (**Obr. 26**), které se podobně jako ICE začleňují k 3' konci genu pro tRNA. Integrace GEI do chromozomu je zajištěna místně specifickou rekombinací zprostředkovanou vlastním enzymem podobným fágové integráze. Od okolní sekvence se odlišují procentuálním zastoupením G+C. Jsou ohraničeny přímými repetitivy cílové sekvence o délce 16-20 bp. Nesou plazmidové konjugační systémy nebo fágové geny, které zajišťují mobilitu celé struktury konjugací nebo transdukci. Obsahují také další typy MGE (IS, transpozony), které způsobují přeskupení genů v rámci GEI, delece a inserce genů (Dobrindt *et al.*, 2004; Snyder a Champness, 2007).

Původně byly popisovány ve spojitosti s patogenitou u extraintestinálně patogenních kmenů *E. coli* a byly proto označovány jako ostrovy patogenity (PAI- „pathogenicity island“) (Hacker *et al.*, 1990). Kromě nejrůznějších virulenčních faktorů kódují další funkce zahrnující metabolismus sukrozy a aromatických sloučenin, rezistenci k těžkým kovům a antimikrobiálním látkám případně ovlivňují fitness hostitelské bakterie nebo její schopnost symbiózy. Jeden z nejlépe prostudovaných GEI spojený s antibiotickou rezistencí u klinicky významným gramnegativních bakterií je SGI1 („salmonella genomic island 1“). Byl poprvé identifikován u multirezistentního kmene *Salmonella* Typhimurium DT104 (Boyd *et al.*, 2000). SGI1 o velikosti 43 kb nese geny rezistence k aminoglykozidům (*aadA2*), amfenikolům (*floR*), tetracyklinu (*tetG*), ampicilinu (*bla<sub>PSE-1</sub>*) a sulfonamidům (*sul1*). Dalším významným GEI je SSCmec (SSC – „staphylococcal cassette chromosome“) u *S. aureus* rezistentní k meticilinu (Shore a Coleman, 2013).

#### A. Obecná struktura



#### B. Salmonella genomic island 1 (SGI1) u *Salmonella* Typhimurium DT104



**Obr. 26: Genomový ostrov**

Vytvořeno volně podle Dobrindt *et al.*, 2004; Fluit, 2005.

- (A) Genom - cílová oblast v genomu bakterie, do které se v okolí tRNA začleňuje genomový ostrov; IS – inzerční sekvence; DR – přímé repetice. Oblast označená jako konjugace nese sadu genů pro zajištění konjugativního přenosu celé struktury genomového ostrovu.
- (B) Geny kódující rezistenci k antibiotikům jsou označeny barevně podle následujícího klíče: tmavě zelená – *addA2* pro rezistenci k aminoglykozidům; tmavě modrá – *qacEΔ1* pro rezistenci ke kvartérním amoniovým sloučeninám; světle modrá – *sul1* pro rezistenci k sulfonamidům; fialová – *floR* pro rezistenci k florfenikolu; červená – *tetG* pro rezistenci k tetracyklinu; žlutá – *bla<sub>PSE-1</sub>* pro rezistenci k beta-laktamům. Mobilní elementy (inzerční sekvence, geny pro integrázu, resolvázu) jsou vyznačeny šedě; IRT a IRI - invertované repetice integronu.

## 6.2.8 Plazmidy

Plazmidy představují extrachromozomální mobilní genetické elementy schopné autonomní replikace. Jsou charakteristickými strukturami prokaryotických buněk, ale byly identifikovány také u některých eukaryot (kvasinek). Významně ovlivňují základní biologické vlastnosti svých hostitelů, poskytují jim selektivní výhodu a podílejí se na jejich diverzitě a evoluci (Funnel a Phillips, 2004).

Plazmidy představují jedny z největších MGE s komplexní strukturou. Jejich velikost se různí od několika párů bazí až po stovky kilobazí. Jeden z největších plazmidů popsáný u *Streptomyces clavuligerus* dosahuje 1.8 Mbp, čímž se blíží velikosti bakteriálního chromozomu (Alvarez-Alvarez *et al.*, 2014). Obvykle se vyskytují ve formě kovalentně uzavřené kružnicové molekuly tvořené dvěma vlákny DNA, byly však popsány plazmidy lineární nebo jednovláknové (Snyder a Champness, 2007).

Na plazmidy je někdy pohlíženo jako na buněčné parazity, jelikož nenesou genetickou informaci pro zajištění základních funkcí bakteriální buňky. Za určitých okolností však svým hostitelům poskytují selekční výhody, např. v přítomnosti antibiotika, chemických polutantů, v prostředích s omezeným spektrem živin apod. Plazmidy jsou významné především z klinického pohledu, jelikož se významně podílí na udržování a šíření rezistence k antibiotikům (Funnel a Phillips, 2004).

V následujících kapitolách jsou představeny základní charakteristiky plazmidů gramnegativních bakterií, je popsána jejich základní organizační struktura, mechanismy replikace, kontroly počtu kopií, nástroje pro stabilní udržování v hostitelských buňkách a způsoby horizontálního šíření v bakteriálních populacích. Poslední kapitoly jsou věnovány popisu plazmidů v kontextu funkcí, které poskytují svému hostiteli s důrazem na rezistenci k antibiotikům.

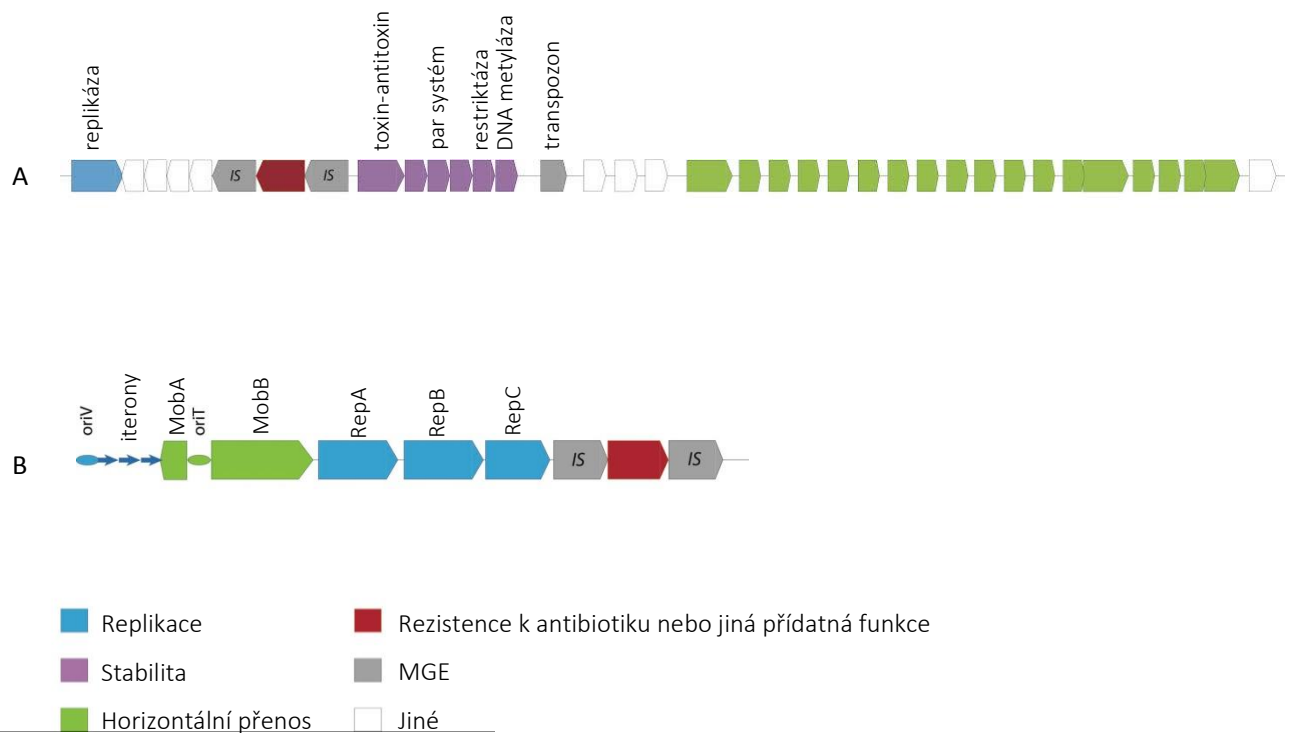
### 6.2.8.1 Základní organizace plazmidů

Pro plazmidy je charakteristická modulární struktura (Obr. 27) tvořená geny zajišťující základní funkce plazmidu, které jsou součástí konzervativní oblasti neboli kostry plazmidu, a geny pro přídatné funkce přítomné ve variabilní plazmidové oblasti (Norman *et al.*, 2009). Základní struktura plazmidů je představena na Obr. 28.



**Obr. 27:** Základní struktura plazmidů

Vytvořeno podle Norman *et al.*, 2009.

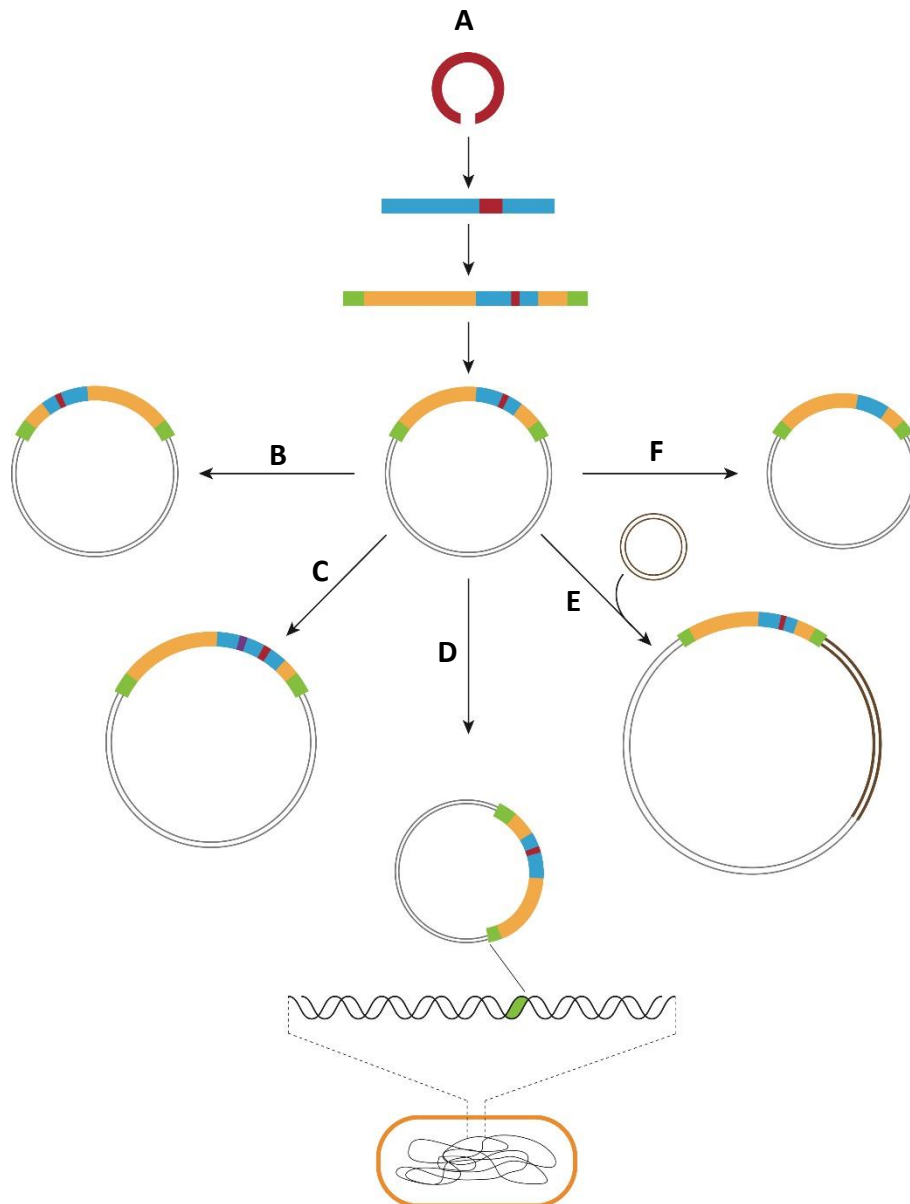


**Obr. 28:** Schematické znázornění struktury konjugativních (A) a mobilizovatelných (B) plazmidů

Konzervativní oblast každého plazmidu nese geny pro vlastní replikaci, které zajišťují sladění replikace plazmidu s buněčným cyklem hostitele. Replikační oblast rovněž reguluje počet kopií plazmidu a zabraňuje tak vzniku nadměrné energetické zátěže pro buňku, které by mohlo nastat při nekontrolovaném množení plazmidu. Počet kopií plazmidů na buňku se liší a je charakteristický pro daný typ plazmidu. Malé plazmidy se obvykle vyskytují v desítkách až stovkách kopií, jsou tzv. vysokokopiové, zatímco velké plazmidy čítají 1–10 kopií na buňku, jsou tedy nízkokopiové. Počet kopií zásadním způsobem ovlivňuje mechanismy jejich stabilní propagace v bakteriálních populacích (Dale a Park, 2004). Další genetická výbava konzervativní oblasti se u jednotlivých skupin plazmidů různí. Nízkokopiové plazmidy obvykle obsahují v blízkosti oblasti pro replikaci plazmidu moduly pro zajištění stabilní segregace při dělení buňky. V případě plazmidů schopných horizontálního přenosu do jiných buněk pak kostra plazmidu obsahuje sadu genů pro mobilizaci nebo konjugaci. Konzervativní oblast plazmidů náležících do stejné skupiny je vysoce homologická, nicméně i v této oblasti může plazmid prodělávat genetické přestavby (Norman *et al.*, 2009).

Plazmidy představují mozaikové struktury s vysokou plasticitou. Variabilní oblast plazmidu nese geny pro přídavné funkce hostitelské buňky včetně genů rezistence k antibiotikům a obsahuje různé typy mobilních genetických elementů (inzerční sekvence, transpozony, integrony), které podporují další

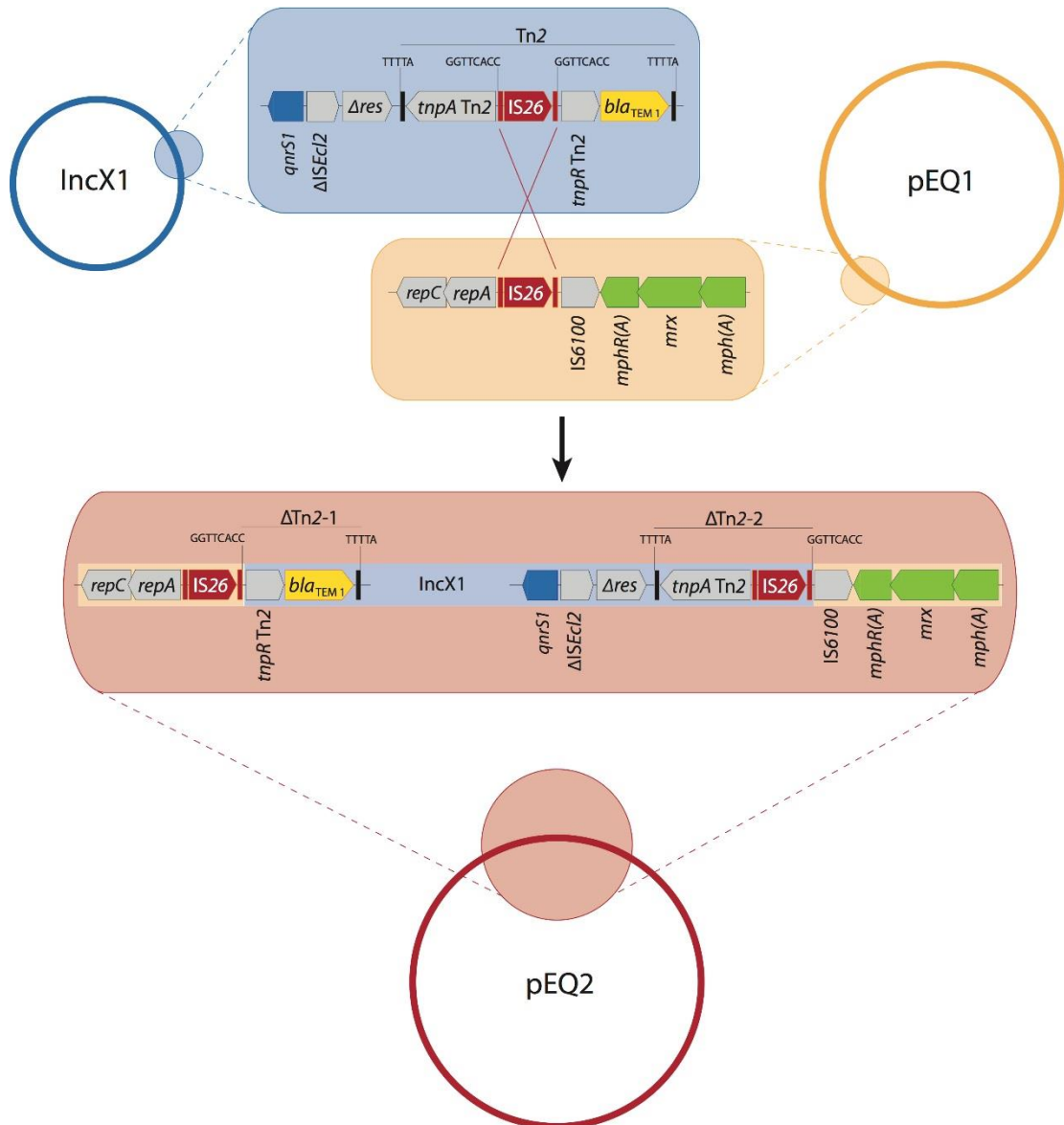
přestavby této oblasti vedoucí ke zvyšování diverzity a komplexnosti plazmidu. Mozaikový charakter plazmidů a příklady jejich evoluce popisuje **Obr. 29**. Proces rekombinace mezi homologními oblastmi dvou plazmidů vedoucí k jejich fúzi je představen na **Obr. 30**. Tento typ přestaveb může plazmidu poskytnout mnohé benefity; může rozšiřovat hostitelské spektrum plazmidu, zvyšovat frekvenci jeho horizontálního přenosu nebo poskytovat hostitelské bakterii další selekční výhody.



**Obr. 29: Mozaikový charakter a plasticita plazmidů včetně příkladů jejich evoluce**

(A) Příklad mozaikového charakteru variabilní oblasti plazmidu. Genová kazeta je součástí integronu, který je vnořen do kompozitního transpozonu v oblasti multirezistence plazmidu. (B)–(F) evoluční změny spojené s plasticitou plazmidů, (B) homologní rekombinace vedoucí k inverzím, (C) integrace dalších genů rezistence a mobilních genetických elementů, (D) začlenění plazmidu nebo jeho části do chromozomu prostřednictvím homologní rekombinace; (E) fúze dvou plazmidů jako důsledek rekombinace mezi kopiemi stejného elementu na různých plazmidech; (F) ztráta genu z oblasti multirezistence.





**Obr. 30:** Rekombinace mezi homologními oblastmi plazmidů vedoucí k plazmidovým fúzím

Obrázek popisuje fúzi multirezistentního plazmidu pEQ1 z inkompatibilní skupiny IncHI1 (zvýrazněn oranžově) a plazmidu skupiny IncX1 (zvýrazněn modře) nesoucí gen rezistence k fluorochinolonům *qnrS1* a gen *bla<sub>TEM-1</sub>* integrovaný do Tn2 (Dolejska *et al.*, 2014<sup>24</sup>). Kódující geny jsou vyznačeny šipkou, přičemž orientace šipky určuje směr transkripce. Geny rezistence k antibiotikům jsou vyznačeny žlutou, modrou nebo zelenou barvou. Místo homologní rekombinace v oblasti IS26 mezi IncX1 a pEQ1 plazmidy je zvýrazněno červeným křížkem. Homologní rekombinace mezi IS26 obou plazmidů vedla ke vzniku plazmidu pEQ2 tvořeného kompletní sekvencí plazmidů pEQ1 a IncX1. Důsledkem této fúze je přerušení transpozonu Tn2.

### 6.2.8.2 Nomenklatura plazmidů

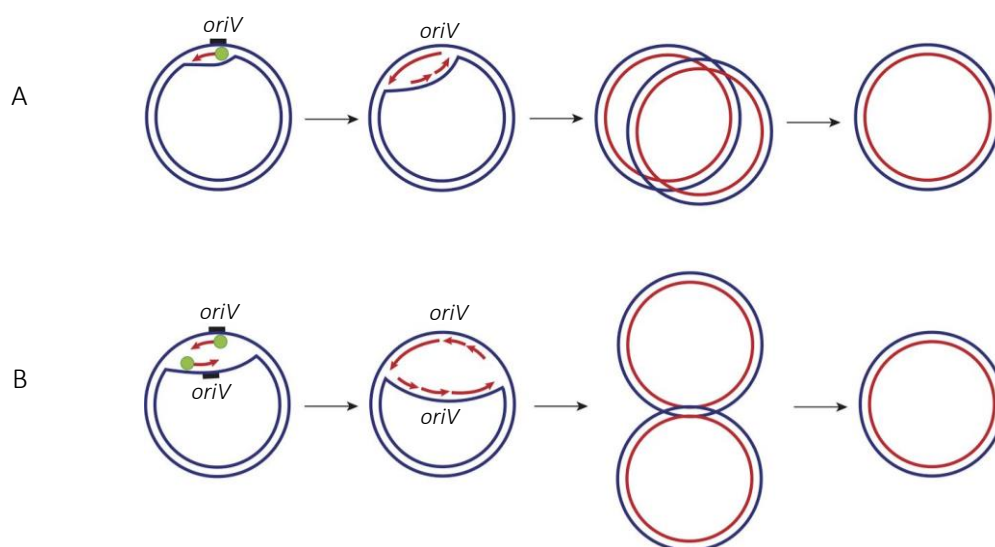
Původně byly plazmidy pojmenovávány podle fenotypu, který kódují. Například Ti plazmid (Ti – „tumor inducing“) z *Agrobacterium tumefaciens* získal jméno podle schopnosti indukovat nádory rostlin (Engler *et al.*, 1975). Jeden z prvních popsáných plazmidů ColE1, identifikovaný u *Shigella* a *E. coli* v Japonsku, nese gen pro tvorbu kolicinu E1 (Snyder a Champness, 2007). Dalším příkladem je Tol plazmid kódující enzymy pro degradaci toluenu (Williams a Murray, 1974). V současnosti se od tohoto přístupu ustupuje především z důvodu, že jeden plazmid obvykle kóduje různé funkce kromě té, podle které byl původně pojmenován. Dnešní nomenklatura využívá systému písmen a číslic. Název plazmidu začíná písmenem „p“, následuje jedno nebo více velkých písmen reprezentující iniciály autora nebo zkratku laboratoře, ve které byl plazmid popsán. Název je zakončen sledem číslic charakteristických pouze pro daný plazmid (Snyder a Champness, 2007). Jeden z nejznámějších plazmidových vektorů pBR322 využívaných v biotechnologii zkonstruoval Bolivar a Rodriguez (Bolivar *et al.*, 1977).

### 6.2.8.3 Replikace plazmidů

Plazmidy se replikují nezávisle na replikaci bakteriálního chromozomu, proto jsou spolu s chromozomem a fágovou DNA řazeny mezi replikony. Nesou jeden nebo více specifických sekvencí označovaných jako počátek replikace *oriV* („origin of replication vegenerative“), které zajišťují iniciaci replikace (Funnel a Phillips, 2004). Genetická informace plazmidu kóduje pouze některé proteiny pro replikaci, obvykle pouze ty, které jsou potřebné pro její zahájení v místě *oriV*. Ostatní proteiny jako DNA polymerázy, ligázy, primázy, helikázy a další jsou propůjčovány od hostitelské buňky. Počátek replikace obsahuje specifické repetitivní úseky zvané iterony a A+T bohaté oblasti. V prvním kroku se Rep protein kódovaný plazmidem váže na sekvence iteronů. Tato vazba vyvolá místní denaturaci DNA nezbytnou pro správnou funkci DNA polymerázy. Rep slouží také jako podvojný regulátor replikace. V nízké koncentraci replikaci aktivuje, naopak ve vysoké koncentraci působí jako inhibitor. Zároveň interaguje s dalšími replikačními proteiny tvořenými hostitelskou buňkou (Dale a Park, 2004; Funnel a Phillips, 2004).

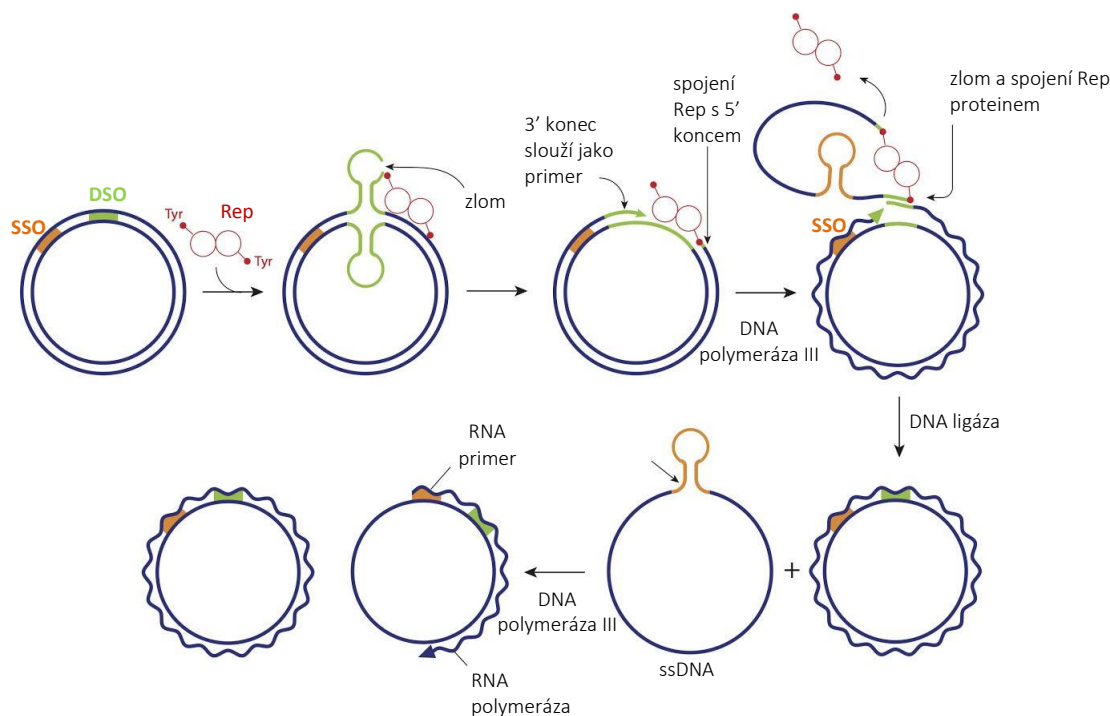
Replikace plazmidů probíhá jedním ze tří základních mechanismů zahrnujících (a) replikaci typu *théta*, (b) replikaci na otáčející se kružnici a (c) mechanismus nahrazení řetězce neboli „strand-displacement“ (Obr. 31–33). Replikace *théta* je specifická pro chromozom a některé plazmidy gramnegativních bakterií. Většina velkých a nízkokopiových plazmidů se replikuje tímto mechanismem. Svě jméno získala díky struktuře připomínající řecké písmeno *théta*, která se tvoří rozvolněním dsDNA v místě *oriV* (Obr. 31). Replikací mechanismem otáčející se kružnice disponují RC plazmidy (RC – „rolling circle“). Jedná se obvykle o malé plazmidy s vysokým počtem kopií v buňce. Jednotlivé kroky replikace, které popisuje Obr. 32, připomínají množení ssDNA fágů nebo přenos plazmidu při bakteriální konjugaci

(Snyder a Champness, 2007). Replikace mechanismem nahrazení řetězce je typická pro IncQ plazmidy. V počátku replikace dochází k tvorbě charakteristické vlásenkové konformace, která umožňuje zahájení syntézy nového řetězce (**Obr. 33**). Během replikace je pak vytěšňován jeden řetězec ve formě D-smyčky (del Solar *et al.*, 1998).



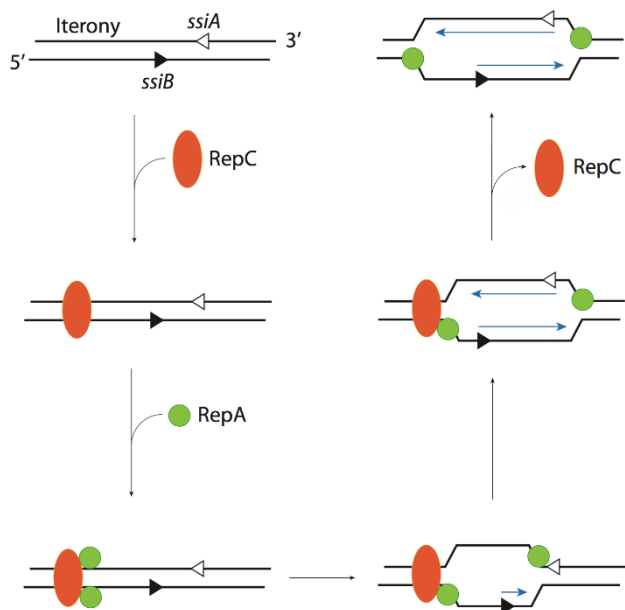
**Obr. 31:** Replikace bakteriálního plazmidu typu théta

Vytvořeno podle Snyder a Champness, 2007. Replikace probíhá jedním nebo oběma směry od RNA primeru. V případě jednosměrné replikace (A) se vytvoří pouze jedna replikační vidlice pohybující se kolem molekuly směrem k počátku replikace. Následně dojde k rozestupu těchto dvou dceřiných molekul DNA. Při obousměrné replikaci (B) se dvě replikační vidlice pohybují navzájem opačným směrem od *oriV* dokud se nepotkají, což vede k rozestupu molekul.



**Obr. 32: Replikace na otáčející se kružnici**

Vytvořeno podle del Solar *et al.*, 1998. V prvním kroku rozpoznává Rep protein palindromatické sekvence DSO („double strand origin“). Následuje vytvoření zlomu v jednom z řetězců a kovalentní spojení Rep proteinu s fosfátem na 5' konci tohoto řetězce. Volný 3' konec působí jako primer pro DNA polymerázu, která syntetizuje nový řetězec podle matrice nenaštěpeného vlákna za tvorby kružnicové dsDNA (dvouvláknová, ds – „double strand“). Současně dochází k odvíjení původního naštěpeného vlákna za tvorby uzavřené kružnicové ssDNA. Výsledkem je tedy jedna molekula finální dsDNA a jedna ssDNA (jednovláknová, ss – „single strand“), u které musí dojít k dokončení replikace. V následující fázi se tvoří komplementární vlákno k odvíjenému řetězci ssDNA a to odlišným mechanismem oproti prvnímu kroku. RNA polymeráza vytváří primer, který se váže do oblasti SSO („single strand origin“) a zahajuje syntézu (Khan, 1997, 2000).



**Obr. 33: Inicie replikace IncQ plazmidů při replikaci mechanismem náhrady řetězce**

Vytvořeno podle del Solar *et al.*, 1998. Replikace se účastní tři replikační protein RepA (5'-3' helikáza), RepB (primáza) a RepC (inicie replikace). Replikace je zahájena v palindromatických sekvencích *ssiA* a *ssiB* interakcí iteronů s RepA a RepC (vyobrazena pouze interakce s RepC, RepB se váže do oblastí bohatých na AT v blízkosti vazby RepC). Interakce s replikačními proteiny převádí DNA v počátku replikace do jednovláknové formy za vzniku vlásenky. V této podobě je *ssi* oblast lépe přístupná pro RepB s funkcí primázy, který tyto palindromatické sekvence rozpoznává a specificky se k nim váže. Během replikace RepA s funkcí helikázy odděluje původní vlákna DNA. Nově syntetizované vlákno je zvýrazněno modře. Šipky značí směr syntézy (5'-3') nového vlákna.

#### 6.2.8.4 Regulace replikace plazmidů

Replikace plazmidů je energeticky náročný proces. Plazmidy disponují vlastními autoregulačními mechanismy, které zajišťují udržování optimálního počtu kopií v závislosti na velikosti plazmidu, frekvenci replikace a kódovaných genech. Plazmidy s vysokým počtem kopií jsou obvykle malé a replikují se mechanismem otáčející se kružnice. Naopak nízkokopiové plazmidy, které jsou obvykle velké (> 30 kb), využívají replikaci typu  $\theta$  a jejich množení je obvykle spjato s replikací bakteriálního chromozomu (Funnel a Phillips, 2004).

K regulaci počtu kopií využívají dvou základních mechanismů. Při prvním mechanismu založeném na principu protismyslné (antisense) RNA dochází k inhibici tvorby primeru nebo Rep proteinu, které jsou potřebné pro iniciaci replikace. Druhý mechanismus využívá interakci iteronů s Rep proteiny.

Regulace replikace ColE1 plazmidů probíhá prostřednictvím malé RNA (RNA I). K inhibici replikace dochází prostřednictvím interakce RNA I s molekulou RNA II. Oba typy RNA jsou navzájem komplementární, jelikož jsou přepisovány z opačných řetězců stejného úseku plazmidu. V případě absence RNA I dochází k vazbě molekuly RNA II k DNA v místě *oriV* za tvorby hybridního RNA-DNA komplexu. V této formě je vlákno RNA I štěpeno RNázou, která uvolňuje 3' hydroxylovou skupinu sloužící jako primer pro zahájení replikace DNA polymerázou. RNA I se vytváří při vysokém počtu kopií plazmidu v buňce. Váže se na komplementární molekulu RNA II za tvorby dsRNA duplexu, což vede k inhibici replikace (Funnel a Phillips, 2004; Snyder a Champness, 2007).

Podobným mechanismem disponují některé IncFII plazmidy, které na rozdíl od ColE1 plazmidů nevyužívají protismyslné RNA k inhibici tvorby RNA primeru, ale jejím prostřednictvím potlačují translaci Rep proteinu. Gen *repA* kódující Rep protein je u těchto plazmidů přepisován ze dvou různých promotorů. Promotor  $P_{copB}$  zajišťuje transkripci *repA* a současně *copB*. Druhý promotor  $P_{repA}$  přítomný v sekvenci genu *copB* pak přepisuje pouze gen *repA*. Bezprostředně po vstupu plazmidu do buňky probíhá transkripce *repA* z obou promotorů, což zajišťuje rychlý nárůst Rep proteinu. Plazmidová DNA se množí až do dosažení požadovaného počtu kopií. Translace proteinu CopB, který působí jako represor  $P_{repA}$ , vede k poklesu Rep proteinu a zastavení replikace (Snyder a Champness, 2007).

Druhá skupina plazmidů využívá pro kontrolu počtu kopií iterony. Jak bylo výše popsáno, iterony jsou repetitivní sekvence nezbytné pro iniciaci replikace, mají ale rovněž schopnost regulovat množení plazmidu. Tohoto mechanismu využívají především nízkokopiové IncF nebo IncP plazmidy. S rostoucí koncentrací plazmidů v buňce roste také množství Rep proteinu. Rep proteiny pak vytváří dimery, které se vážou k sekvencím iteronů na dvou rozdílných molekulách plazmidů. U takto zpárovaných plazmidů pak nemůže probíhat replikace. Iteronů je také využíváno k zábraně replikace vzájemně inkompatibilních plazmidů. Pokud jsou v buňce přítomné dva plazmidy se stejnou sekvencí iteronů, dojde k párování těchto

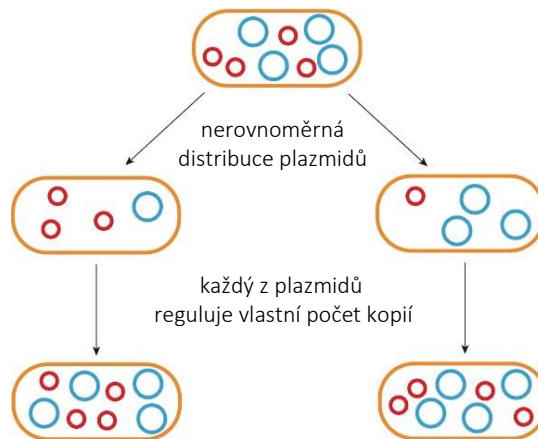
plazmidů v homologních oblastech iteronů vedoucí k inhibici jejich replikace (Funnel a Phillips, 2004; Snyder a Champness, 2007).

#### 6.2.8.5 Inkompatibilita plazmidů

Bakteriální buňka může nést jeden nebo mnoho různých plazmidů za splnění podmínky, že každý z těchto plazmidů nese odlišný počátek replikace *oriV*. Plazmidy se stejným počátkem replikace obvykle nejsou schopny se množit v téže buňce a jsou pak považovány za neslučitelné neboli inkompatibilní (Snyder a Champness, 2007). Pojem inkompatibilita plazmidů (Inc) je tedy definována jako neschopnost dvou různých plazmidů se stabilně udržovat v jedné hostitelské buňce (Novick *et al.*, 1976; Novick a Hoppensteadt, 1978). Plazmidy ze stejné skupiny inkompatibility sdílí podobné mechanismy replikace včetně kontrolních systémů a procesu segregace do dělicích se dceřiných buněk (Novick, 1987). Tento fenomén je přiblížen v následujících odstavcích.

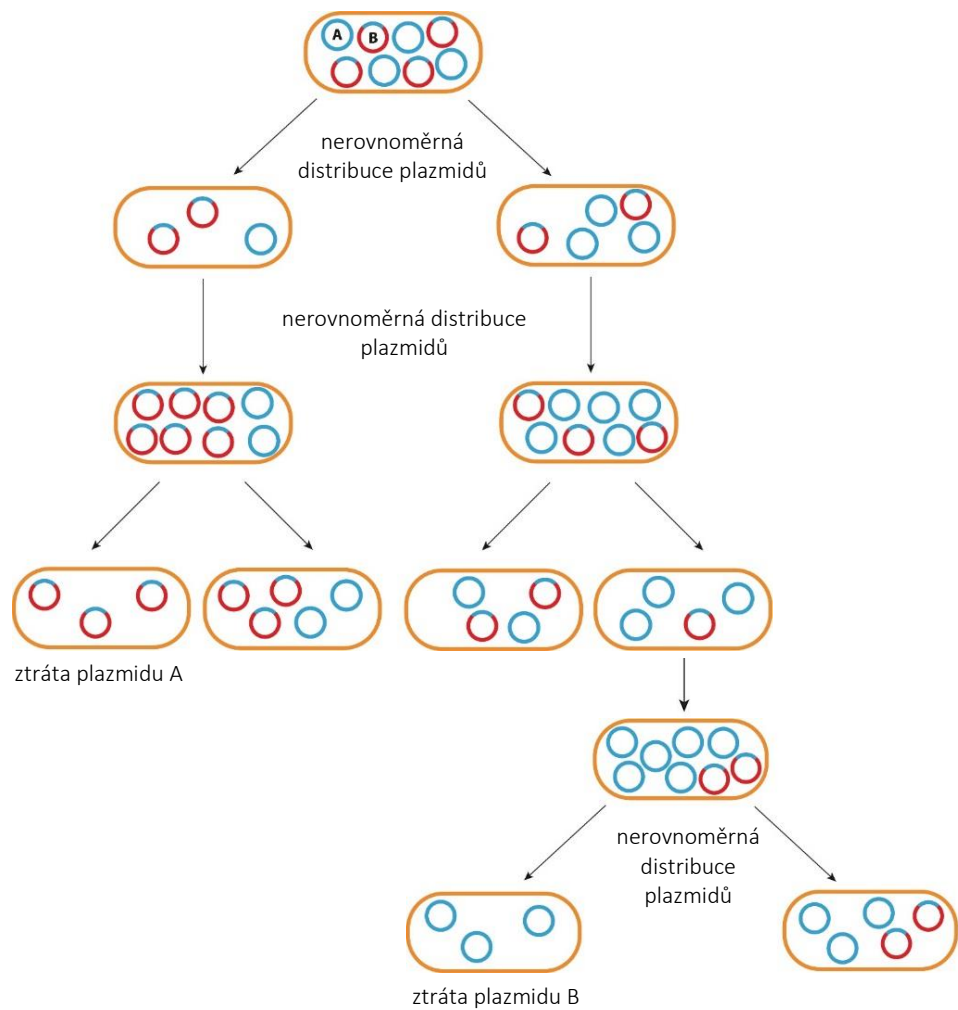
Při buněčném dělení obvykle nedochází k rovnoměrnému rozdělení plazmidu do dceřiných buněk. V případě, že se jedná o plazmidy z různých Inc skupin, replikují se v nových buňkách až do dosažení požadovaného počtu kopií. Před buněčným dělením tedy každý z plazmidů dosáhne stejného počtu kopií jako v původní donorové buňce (**Obr. 34**). Pokud však buňka nese dva plazmidy ze stejné Inc skupiny, nemůže být v důsledku sdílení stejných mechanismů kontroly replikace zajištěno dostatečné namnožení obou plazmidů. Kontrolní systémy totiž nerozeznávají dva plazmidy jako odlišné a náhodně replikují jeden nebo druhý. Jeden z plazmidů pak obvykle bývá méně zastoupen (**Obr. 35**). Při buněčném dělení má plazmid s menším počtem kopií v buňce také nižší pravděpodobnost rovnoměrné distribuce do dceřiných buněk a do některé z buněk se nemusí vůbec přenést (Snyder a Champness, 2007).

Dalším faktorem, který ovlivňuje kompatibilitu plazmidů, je způsob jejich rozestupu do dceřiných buněk při buněčném dělení. I jinak odlišné plazmidy, které disponují stejným mechanismem segregace, jsou vzájemně inkompatibilní. Takovéto plazmidy vytváří při procesu segregace páry a každá z dceřiných buněk pak nese pouze jeden plazmid z tohoto páru. Při buněčném dělení tedy dochází ke ztrátě jednoho či druhého plazmidu (Snyder a Champness, 2007).



**Obr. 34:** Stabilní udržování dvou plazmidů ze stejných inkompatibilních skupin při buněčném dělení

Vytvořeno podle Snyder a Champness, 2007.



**Obr. 35:** Ztráta plazmidů náležících do stejné inkompatibilní skupiny při buněčném dělení

Vytvořeno podle Snyder a Champness, 2007.

#### 6.2.8.6 Koexistence plazmidů ze stejné Inc skupiny

Plazmidy ze stejné Inc skupiny se mohou za určitých okolností stabilně množit v jedné buňce. Jde o případy, kdy jsou oba plazmidy vysokokopiové a nesou odlišné geny antibiotické rezistence nebo jiné selekční faktory. Zároveň musí působit kontinuální selekční tlak, který zajistí stabilitu obou plazmidů.

Problém udržování plazmidů ze stejné Inc skupiny se týká především plazmidů nízkokopiových. Mezi tyto plazmidy náleží IncF, které se v buňce nachází obvykle v jedné kopii (Snyder a Champness, 2007). Pro stabilní udržování využívají různé mechanismy zahrnující segregální a adiční systémy, které budou popsány níže. Fenomén inkompatibility rovněž mohou překonávat svým mozaikovým charakterem spojeným s přítomností dvou nebo i více replikonů na jednom plazmidu (Johnson a Nolan, 2009; Osborn *et al.*, 2000). Sdružování FII replikonu s příbuznými replikony skupin FIA či FIB bylo popsáno a představuje důležitý proces v evoluci plazmidů skupiny IncF (Bergquist *et al.*, 1982; Bergquist *et al.*, 1986; Osborn *et al.*, 2000).

Mozaikové IncF plazmidy obsahující více replikonů jsou popisovány u *E. coli* a *Klebsiella* spp. ve spojitosti s klinicky významnou rezistencí (Villa *et al.*, 2010). Multirezistentní IncF plazmidy nesoucí replikony FIA a FIB spolu s *bla*<sub>CTX-M</sub> udílející ESBL fenotyp, *aac(6′)-Ib-cr* pro plazmidově determinovanou rezistenci k fluorochinolonům a dalšími geny pro rezistenci k jiným antibiotickým skupinám byly zdokumentovány (Albrechtova *et al.*, 2012b<sup>11</sup>; Tausova *et al.*, 2012<sup>10</sup>). Šíření beta-laktamázy CTX-M-15 mezi různými sekvenčními typy *K. pneumoniae* zprostředkované IncF plazmidy bylo popsáno u pediatrických pacientů na Klinice dětské onkologie. U těchto kmenů byly nalezeny dva IncFII<sub>K</sub> plazmidy spolu přítomné v jedné buňce. Oba plazmidy byly multireplikonové a vykazovaly minimální odlišnosti v sekvenci genu *copA* kódující FII<sub>K</sub> replikon. Menší z plazmidů pKDO1 nesl replikon FII<sub>K</sub> sekvenční varianty 7 (FII<sub>K7</sub>) a dále replikon náležící do Rep-3 rodiny. Větší plazmid pKPN-CZ obsahoval replikon FIB<sub>K</sub> a dále FII<sub>K</sub> sekvenční varianty 8 (FII<sub>K8</sub>) (Dolejska *et al.*, 2013a<sup>17</sup>). Bylo prokázáno, že pro koexistenci dvou příbuzných IncF plazmidů postačuje pouze několika mutací v genu *copA* (Osborn *et al.*, 2000).

#### 6.5.8.7 Klasifikace plazmidů Enterobacteriaceae

Fenomén inkompatibility je využíváno při klasifikaci plazmidů do skupin. První pokusy o vytvoření systému byly učiněny Hedgesem a Dattou v 70. letech minulého století. Pro detekci různých skupin inkompatibilních plazmidů Enterobacteriaceae byla navržena sada DNA práb homologických k oblastem kódujícím replikační funkce (Couturier *et al.*, 1988). Na základě této prvotní metodiky bylo později vyvinuto několik technik založených na detekci replikonů pomocí PCR (Carattoli *et al.*, 2005a; Fekete *et al.*, 2002; Gotz *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 2012a; Johnson *et al.*, 2007). Mezi ty nejpoužívanější patří metoda PBRT („PCR-based replicon typing“) vyvinutá týmem A. Carattoli (Carattoli *et al.*, 2005a),



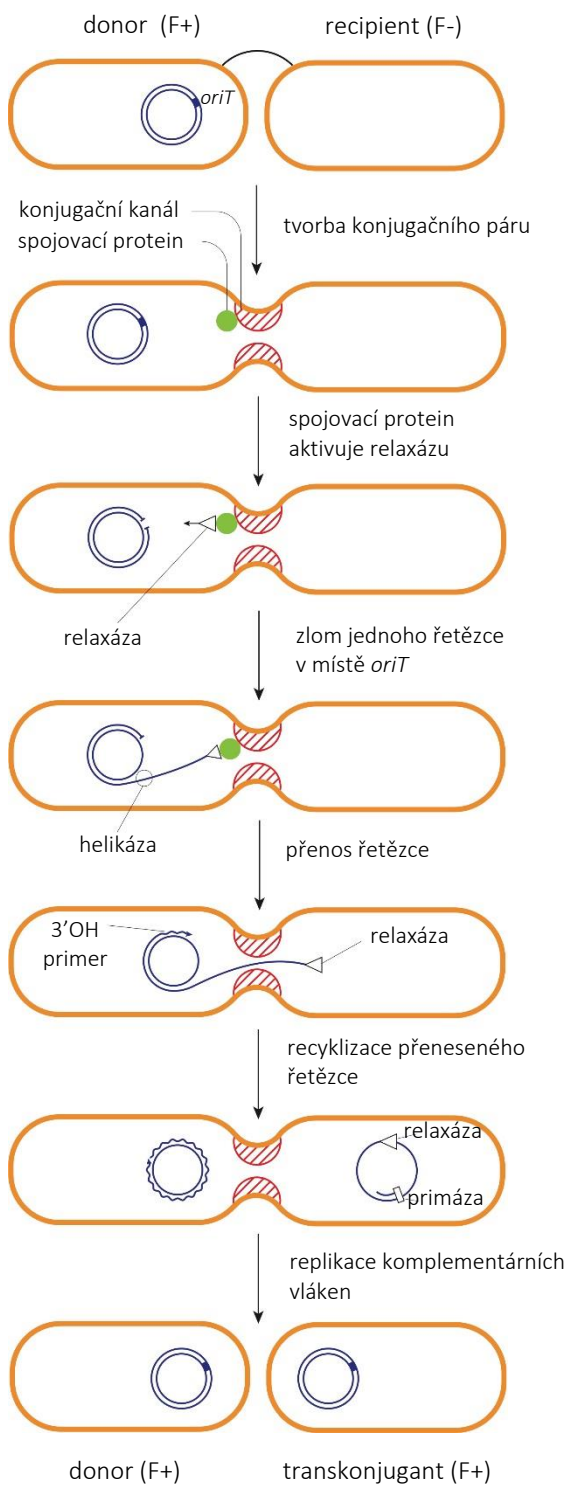
kteřá se stala užitečným nástrojem pro studium epidemiologie rezistentních plazmidů (Carattoli, 2009). Touto metodikou je možné detekovat plazmidy nejvýznamnějších inkompatibilních skupin zahrnující FIA, FIB, FIC, FIIA, HI1, HI2, I1-Igamma, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X2 a Y. Výše popsaný fenomén, kdy některé plazmidy nesou více různých replikonů, však přináší problémy při klasifikaci.

Novým přístupem je pak klasifikace plazmidů na základě relaxáz (Compain *et al.*, 2014; Francia *et al.*, 2004; Garcillan-Barcia *et al.*, 2009; Pilar Garcillan-Barcia *et al.*, 2015) nebo plazmidových segregčních systémů (Bousquet *et al.*, 2015). Tato schémata však zatím nejsou všeobecně přijímána.

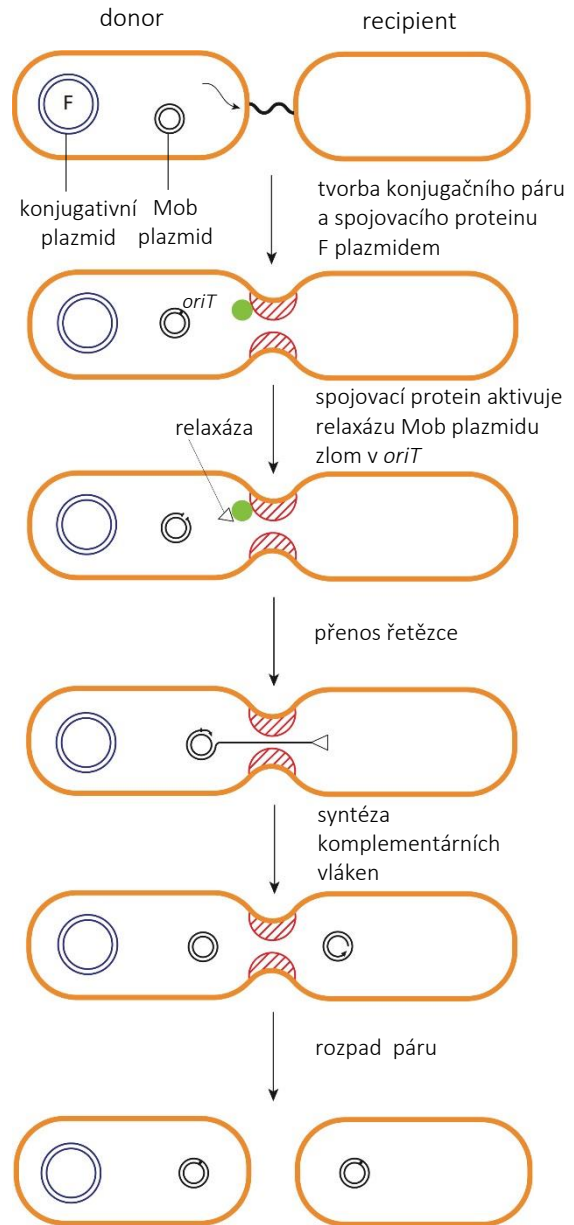
Plazmidy Enterobacteriaceae byly původně klasifikovány do 26 základních inkompatibilních skupin (Funnel a Phillips, 2004). Díky rychle přibývajícimu množství sekvenčních dat v genových bankách jsou některé plazmidy překlasifikovány a jsou rovněž identifikovány nové inkompatibilní skupiny. Nedávno byla vyvinuta online aplikace pro *in silico* detekci a charakterizaci plazmidů Enterobacteriaceae s využitím dat celogenomového sekvenování (Carattoli *et al.*, 2014), která je volně dostupná na <https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>. Tato databáze je průběžně aktualizována na základě současných poznatků.

#### 6.2.8.8 Horizontální přenos plazmidů

Nejefektivnější nástroj přenosu plazmidů mezi buňkami představuje konjugace. Plazmidy schopné tohoto přenosu se nazývají **konjugativní plazmidy**. Konjugace je složitý proces, na kterém se podílí skupina genů uspořádaná na plazmidu ve specifické **oblasti Tra** („transfer“ neboli přenos). Tato oblast zaujímá podstatnou část celkové genetické informace plazmidu. V případě IncF plazmidů, u kterých je mechanismus konjugace podrobně zdokumentován, oblast Tra dosahuje přes 30 kb a je tvořena až 60 geny. Geny *tra* u IncF plazmidů zajišťují (Snyder a Champness, 2007) (a) biosyntézu a sestavování pilu (*traA,B,C,E,F,G,H,L,K,Q,U,V,W*), (b) stabilizaci konjugačního páru (*traG,N*), (c) konjugativní metabolismus (*traD,I,M,Y,Z*), (d) regulaci přenosu (*traJ, finO, finP*) a (e) povrchovou exkluzi (*traS, T*). Proces konjugace je blíže popsán v následujících odstavcích a graficky shrnut na **Obr. 36**.



**Obr. 36:** Schéma přenosu konjugativního plazmidu  
Vytvořeno podle Snyder a Champness, 2007.



**Obr. 37:** Schéma přenosu Mob plazmidu  
Vytvořeno podle Snyder a Champness, 2007.

V prvním kroku konjugačního procesu musí dojít ke kontaktu mezi donorovou a recipientní buňkou. Ten je zajištěn buď prostou kolizí nebo v případě gramnegativních bakterií prostřednictvím konjugativních (sex) pilů, které rozpoznávají příslušné receptory na recipientní buňce. Pily představují struktury tvořené proteiny piliny. Nacházejí se na povrchu bakteriální buňky, dosahují průměru 10 nm a obsahují centrální kanál (Snyder a Champness, 2007). Struktura pilů se mezi jednotlivými plazmidovými transferovými systémy značně liší. Komplexní transferové systémy (např. IncF plazmidů) disponují dlouhými a tenkými pily se schopností kontrakce pro zajištění úzkého kontaktu buněk, což je výhodné především pro konjugaci v tekutých médiích. Naopak neohebné (tuhé) pily zajišťují konjugaci na pevných podkladech (Funnel a Phillips, 2004).

V dalším kroku konjugace dochází ke stabilizaci spojení donorové a recipientní buňky a k tvorbě konjugačního kanálu, kterým prochází přenášené vlákno DNA. Některé *tra* geny, které se podílí na tvorbě konjugačního kanálu, byly identifikovány, ale jeho přesná struktura doposud popsána nebyla (Samuels *et al.*, 2000). Specifita přenosu je zajištěna spojovacími („coupling“) proteiny, které se váží ke konjugačnímu kanálu a aktivují enzym relaxázu. Relaxáza je specifická DNA endonukleáza, která vytváří jednořetězcové zlomy v okolí oblasti *oriT* („origin of transfer“), od které je zahájen přenos DNA. Zlomené vlákno DNA přechází ve směru 5'-3' s navázanou molekulou relaxázy do recipientní buňky. Recyklizace jednovláknové DNA je po přenosu zajištěna relaxázou. 3' konec přenášeného vlákna slouží v donorové buňce jako primer pro zahájení syntézy komplementárního vlákna mechanismem otáčející se kružnice. V recipientní buňce primáza syntetizuje RNA primer potřebný pro tvorbu komplementárního vlákna. Po přenosu DNA se konjugační pár rozpadá (Snyder a Champness, 2007).

Proces konjugace je regulován na mnoha úrovních. Z důvodu vysoké energetické náročnosti je transkripce genů *tra* po většinu času reprimována. Vysoce konjugativní genetické elementy obvykle kódují různé povrchové exkluzní systémy, které regulují nepotřebný přenos mezi buňkami obsahující stejné nebo vysoce příbuzné plazmidy. Například u F plazmidů se tvoří vnější membránový protein TraT bránící stabilnímu spojení buněk, které již obsahují IncF plazmidy (F+). Případně se tvoří protein vnitřní membrány TraS, který znemožňuje vstup DNA do buňky při náhodném spojení dvou F+ buněk (Snyder a Champness, 2007).

Konjugace je ovlivněna celou řadou fyziologických parametrů (hustotou buněk, teplotou, hladinou kyslíku, růstovou fází). Například konjugační systém plazmidů skupiny inkompatibility IncH je vysoce termosenzitivní a plazmidy této skupiny jsou přenášeny při teplotním optimu 20° C (Taylor, 2009).

Další skupinu představují mobilizovatelné (Mob) plazmidy, které kódují pouze některé z výše popsaných funkcí a pro svůj přenos do recipientních buněk využívají aparát vytvořený konjugativním plazmidem (Snyder a Champness, 2007). Mob plazmidy nesou počátek přenosu *oriT* a *mob* geny pro tvorbu relaxázy a helikázy. Proces mobilizace je v podstatě identický s konjugací (**Obr. 37**). V prvním

kroku dochází ke kontaktu buněk a tvorbě kanálu, což je zajištěno plazmidem konjugativním. Spojovací protein tvořený opět konjugativním plazmidem aktivuje relaxázu mobilizovatelného plazmidu. Relaxáza se váže do *oriT*, kde vytváří zlom v jednom z vláken. Následně je 5' konec DNA vlákna vtahován relaxázou do recipientní buňky. Mezi nejnámější mobilizovatelné plazmidy Enterobacteriaceae asociované s rezistencí k antibiotikům patří ColE plazmidy. K přenosu využívají konjugační aparát IncFI, IncI1 a IncP plazmidů (Smillie *et al.*, 2010).

Plazmidy, které nekódují vlastní přenos se mohou šířit horizontální cestou prostřednictvím bakteriofágů, transformací nebo po jejich integraci do molekul přenosných plazmidů také konjugací nebo mobilizací (Smillie *et al.*, 2010).

#### 6.2.8.9 Hostitelské rozmezí plazmidů

Jednotlivé skupiny plazmidů se odlišují rozmezím hostitelských bakterií, ve kterých se mohou replikovat. Z tohoto pohledu rozlišujeme plazmidy s úzkým spektrem hostitelů, např. ColE nebo pBR322, které se replikují pouze v *E. coli* a příbuzných druzích. Druhou skupinu představují plazmidy se širokým spektrem hostitelů (např. RK2, RSF1010 nebo RC plazmidy). Až na drobné výjimky platí pravidlo, že plazmidy gramnegativních bakterií se nereplikují v buňkách grampozitivních bakterií a obráceně. Hostitelské rozmezí plazmidů je určováno charakterem replikačního počátku *oriV* (Snyder a Champness, 2007).

Plazmidy s širokým spektrem hostitelů disponují řadou nástrojů (Funnel a Phillips, 2004). Například specifická struktura *oriV* oblasti IncP plazmidů která splňuje požadavky různých druhů bakteriálních hostitelů (Popowska a Krawczyk-Balska, 2013). Rovněž IncQ plazmidy jsou vysoce promiskuitní a mají schopnost množit se v buňkách gramnegativních i grampozitivních bakterií. Nesou genetickou informaci pro tvorbu dalších proteinů potřebných pro replikaci (např. helikázu a primázu) a jsou tedy nezávislé na replikačních proteinech kódovaných chromozomem hostitelské buňky (Meyer, 2009).

Hostitelská specifita plazmidů má své dopady na antibiotickou rezistenci. Plazmidy nesoucí geny rezistence se schopností replikovat se v širokém spektru hostitelů a horizontálně se přenášet do nepříbuzných bakterií mají vyšší potenciál šířit přenášený gen rezistence v bakteriálních populacích.

Dalším nástrojem pro rozšíření spektra hostitelských bakterií je přítomnost dvou a více různých replikonů v jedné molekule plazmidu (Funnel a Phillips, 2004). Tento problém byl představen v kapitole 6.5.8.6. Příkladem je pGS500 u klinických izolátů *K. pneumoniae* obsahující replikon alfa, který plazmid řadí mezi úzkospektré IncFII plazmidy a replikon beta příbuzný plazmidům IncN se širokým rozmezím hostitelských buněk (Osborn *et al.*, 2000). Tyto typy plazmidů jsou dokumentovány i ve spojitosti

s antibiotickou rezistencí. Mohou vznikat fúzí dvou celých plazmidů nebo výměnou jejich částí homologní rekombinací (Dolejska *et al.*, 2014<sup>24</sup>). Přítomnost dvou i více různých funkčních replikonů však nemusí automaticky zajistit větší rozmezí hostitelů. Typickým příkladem jsou IncF plazmidy, které nesou dva a více příbuzných F replikonů (např. FIA, FIB, FIIA, FI<sub>k</sub> atd.), úzce vázané na buňky enterobakterií, zejména *E. coli* a *K. pneumoniae* (Funnel a Phillips, 2004).

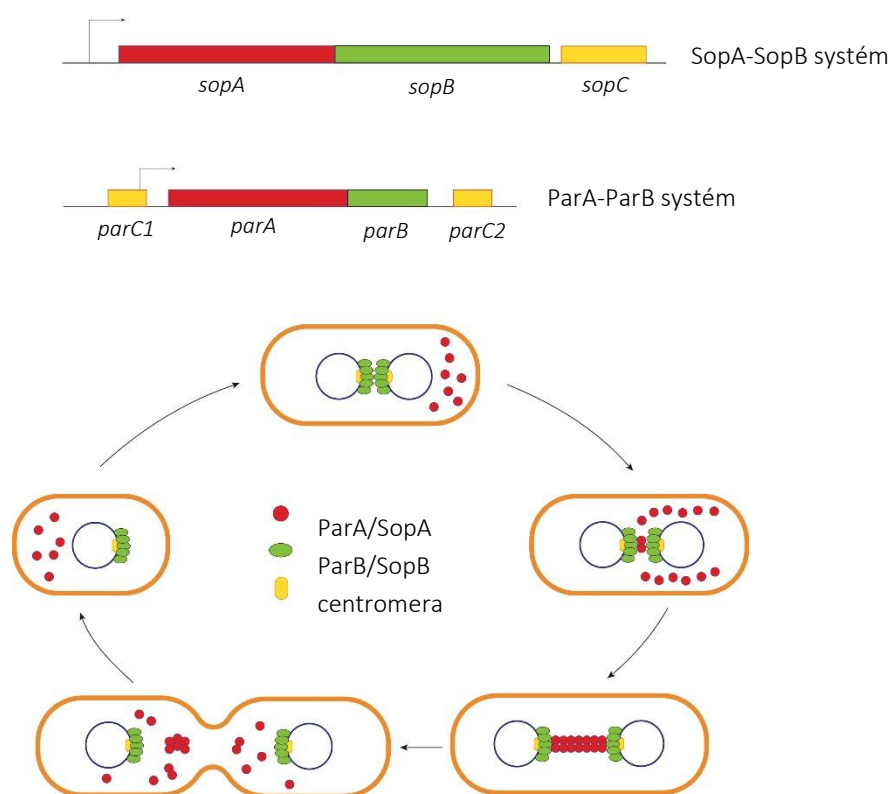
#### 6.2.8.10 Mechanizmy stabilního udržování plazmidů

Plazmidy disponují různými mechanismy pro stabilní udržování se v hostitelské buňce. Nástroje vysokokopiových plazmidů se odlišují od těch, které k přežití používají plazmidy s nízkým počtem kopií na buňku. Tyto strategie zahrnují aktivní segregáční mechanismy, adiční systémy nebo specifické nástroje pro rozdělování plazmidových multimerů.

#### Segregační stabilita plazmidů

Jedná se o aktivní proces uplatňovaný především nízkokopiovými plazmidy, který zajišťuje přenesení alespoň jedné kopie plazmidu do nově vzniklých dceřiných buněk při cytokinezi. Bez tohoto systému by docházelo k jejich náhodné distribuci, což je v případě plazmidů s jednou či dvěma kopiemi na buňku spojeno s rizikem jejich ztráty při buněčném dělení. Tato funkce, označovaná jako Par („partitioning“), je v principu totožná se segregací bakteriálního chromozomu (Snyder a Champness, 2007).

Bylo popsáno několik typů Par systémů, které se liší uspořádáním kódujících genů a aminokyselinovou sekvencí proteinů. Mezi nejrozšířenější plazmidové segregáční systémy patří ParA-ParB, SopA-SopB, RepA-RepB, ParM-ParR a další (Cerin a Hackett, 1993). Pro všechny Par systémy je společná přítomnost dvou plazmidově kódovaných proteinů Par a specifického vazebného místa v plazmidové sekvenci, které funguje podobně jako centromera (**Obr. 38**). Jeden z Par proteinů (ParB v případě systému ParA-ParB nebo SopB u systému SopA-SopB) se váže na oba plazmidy v této specifické sekvenci (*parC2/sopC*) a dává vznik plazmidovému páru. Druhý Par protein (ParA/SopA), který disponuje ATPázovou aktivitou, se váže na ParB/SopB spojující plazmidový pár. Navíc využívá energii uvolněnou z ATP k pohybu plazmidu do středu hostitelské buňky. Polymerací podjednotek ParA/SopA se vytváří vlákno, které postupně oddaluje plazmidy z páru a segreguje je do dceřiných buněk (Bouet *et al.*, 2007).

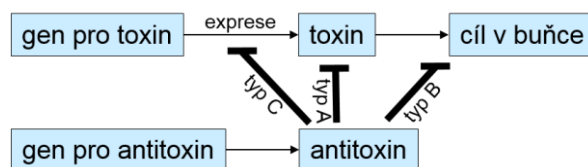


**Obr. 38:** Schéma segregace plazmidů při buněčném dělení

Vytvořeno podle Bouet *et al.*, 2007.

### Plazmidové adikční systémy

Plazmidy disponují systémy, které využívají k vlastní proliferaci smrti hostitelské buňky, která ztratila plazmid. Plazmidové adikční systémy se skládají ze dvou hlavních komponent (Obr. 39). Jedna z komponent plní funkci toxinu a druhá představuje protilátku neboli antitoxin, která toxin inaktivuje. Pokud



**Obr. 39:** Schéma plazmidového adikčního systému

Vytvořeno podle Funnel a Phillips, 2004.

buňka nese plazmid, vytváří se obě komponenty. V případě ztráty plazmidu a tím i genů pro syntézu adikčního systému se žádná z komponent nově nevytváří, v buňce však přetrvává toxin a jeho antitoxin vytvořený před ztrátou plazmidu. Antitoxin je labilní, brzy se rozkládá účinkem enzymů a stabilnější toxin pak usmrcuje buňky bez plazmidu (Funnel a Phillips, Funnel, 2004; Rawlings, 1999).

Adikční systémy klasifikujeme do tří základních skupin na základě kroku v letálním účinku toxinu, který je antitoxinem inhibován, na (a) klasické proteinové systémy, (b) restriktivně modifikační systémy a (c) systémy regulované protismyslnou RNA.

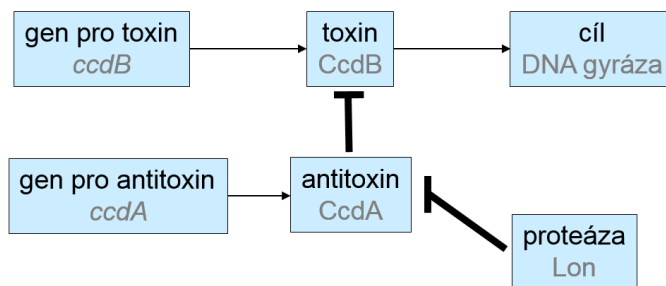
Klasické proteinové systémy (známé pod názvem systém toxin-antitoxin) jsou založeny na inhibici toxinu jeho přímou vazbou s antitoxinem (Funnel a Phillips, 2004; **Obr. 40**). Jsou rozšířené na multirezistentních plazmidech *E. coli* a koliformních bakterií nesoucích geny pro širokospektré beta-laktamázy CTX-M a další klinicky významné mechanismy rezistence. Prevalentní adikční systémy (nesené zejména IncF plazmidy) zahrnují CcdAB, PemKI, VagCD a RelBE (Mnif *et al.*, 2010; Tamang *et al.*, 2013). Např. toxin CcdB inhibuje podjednotku DNA gyrázy GyrA a je inaktivován antitoxinem CcdA (Dao-Thi *et al.*, 2005).

Obecnou funkcí restriktivně modifikačních (RM) systémů je ochrana buňky před cizorodou DNA (**Obr. 40**). Představují tak hlavní bariéru horizontálního toku genů (Tock a Dryden, 2005), ale jsou rovněž nástrojem pro stabilní udržování plazmidů v buňce. Funkci toxinu plní restriktivní enzym napadající specifickou sekvenci DNA na chromozomu hostitelské bakterie. Modifikační systém, který chrání cílová místa toxinu jejich metylací, pak působí jako antitoxin (Kobayashi, 2001). R-M systém EcoRII je rozšířený v sekvencích multirezistentních IncN a IncF plazmidů (Carattoli *et al.*, 2010; Dolejska *et al.*, 2013a,b<sup>14,17</sup>; Kayama *et al.*, 2015; Woodford *et al.*, 2009).

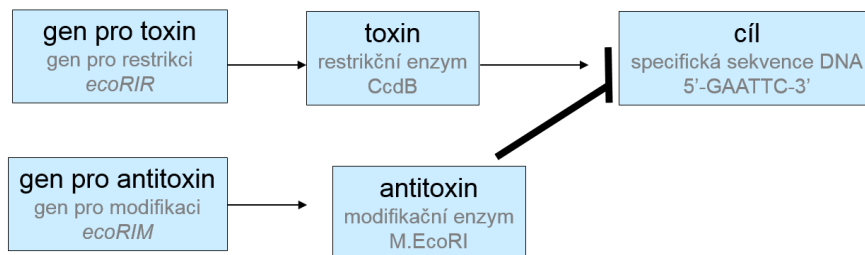
Třetí typ plazmidového adikčního systému je založen na postranskripční inhibici syntézy toxinu prostřednictvím protismyslné RNA (**Obr. 40**). V případě ztráty plazmidu je pak antitoxin rychle degradován RNázou. Mezi známé systémy nesené rezistentními plazmidy enterobakterií patří Hok-Sok, SrnB a PndAC (Brouwer *et al.*, 2014; Doumith *et al.*, 2012; Funnel a Phillips, 2004; Yang *et al.*, 2015). V případě Hok-Sok systémů kóduje gen *hok* transmembránový protein s funkcí toxinu, který rychle vyvolává ztrátu membránového potenciálu. Tvorba Hok toxinu je regulována Sok-RNA, která je komplementární k začátku genu *hok* a plní tak funkci protismyslné RNA (Thisted a Gerdes, 1992).

Pro IncF plazmidy je charakteristická přítomnost několika různých adikčních systémů na jednom plazmidu současně (Dolejska *et al.*, 2013a<sup>17</sup>; Doumith *et al.*, 2012; Woodford *et al.*, 2009). Tato vlastnost je jedním z vysvětlení jejich úspěchu v celosvětovém šíření širokospektrých beta-laktamáz skupiny CTX-M. Například na IncF plazmidech multirezistentního epidemického klonu *E. coli* ST131 s produkcí CTX-M-15 bylo nalezeno až 5 různých adikčních systémů (Doumith *et al.*, 2012).

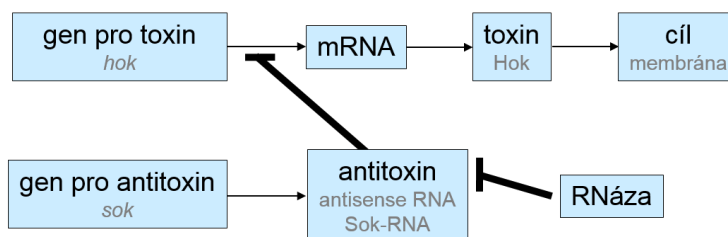
### Klasický proteinový systém (typ A)



### Restrikčně modifikační systém (typ B)



### Systém regulovaný protismyslnou RNA (typ C)



Obr. 40: Plazmidové adikční systémy

Vytvořeno podle Funnel a Phillips, 2004.



## System rozdělování multimerních plazmidových forem

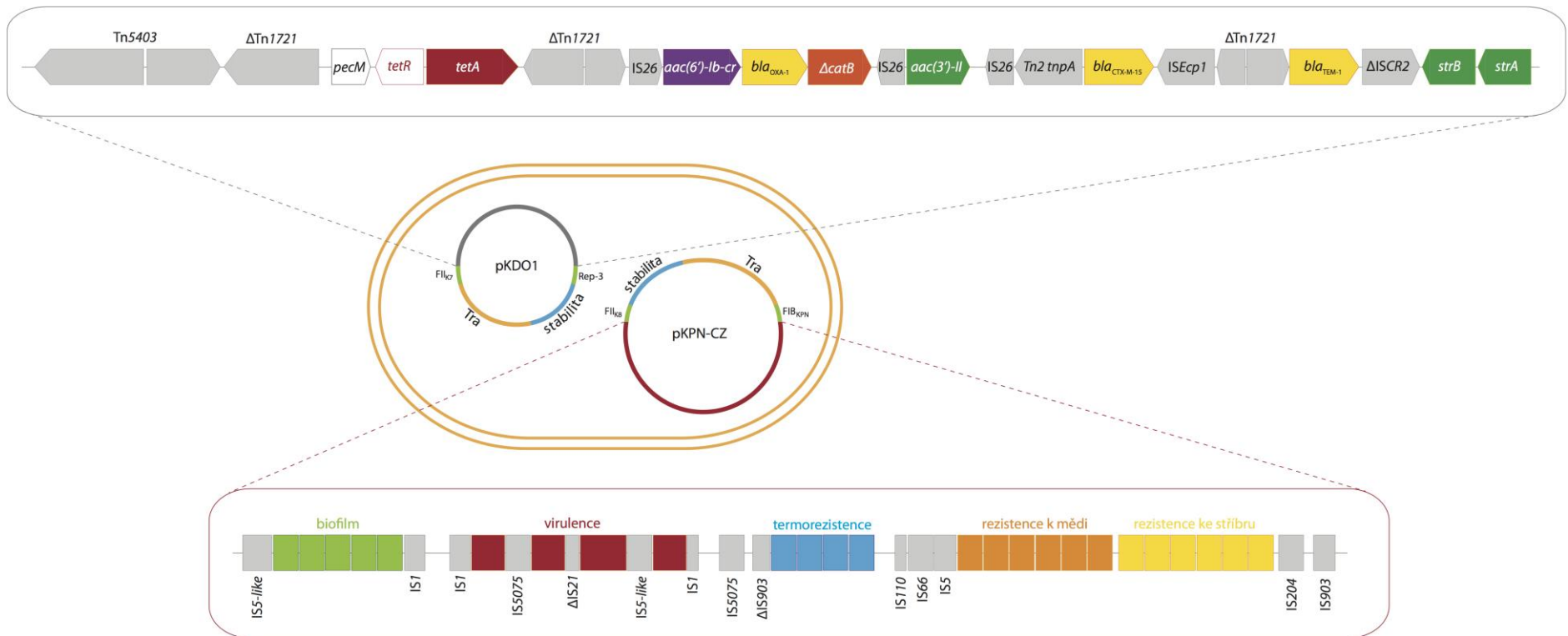
Vysokokopiové plazmidy jsou náchylné k tvorbě dimerních až multimerních struktur v důsledku homologní rekombinace mezi identickými DNA sekvencemi jednotlivých kopií plazmidů. Multimery se snadněji replikují pravděpodobně v důsledku přítomnosti několika počátků replikace. Tvorba těchto struktur však může vést k problémům při segregaci plazmidů během buněčného dělení. Plazmidy s vysokým počtem kopií nedisponují systémem aktivní segregace jako plazmidy nízkokopiové a do buňky se rozestupují náhodně. Přítomnost plazmidových multimerů, které jsou rozpoznávány při segregaci jako jeden plazmid, je spojena s rizikem, že se do jedné z dceřiných buněk nedostane žádná kopie plazmidu (Snyder a Champness, 2007). Plazmidy však využívají různé místně specifické rekombinační systémy, které tyto multimerní formy rozdělují. Mezi nejlépe charakterizované patří *cer-XerC,D* popsány u ColE1 plazmidů. Resolváza XerCD kódovaná chromozomem hostitelské buňky rozpoznává oblast plazmidu *cer* a místně specifickou rekombinací převádí dimerní struktury zpět na monomery (Croizat *et al.*, 2014).

### 6.2.8.11 Funkce kódované plazmidy

Kromě genetické informace pro základní funkce plazmidů jakými jsou replikace, stabilní udržování se v buňce a horizontální přenos, plazmidy kódují různé funkce, které dávají hostitelské buňce selekční výhodu. Hrají úlohu v patogenezi, poskytují determinanty rezistence k široké paletě antimikrobiálních látek, dezinfekčních přípravků a těžkých kovů nebo kódují enzymy degradující organické polutanty. Jeden plazmid může nést současně geny pro několik výše uvedených funkcí (**Obr. 41**). V následujících odstavcích jsou tyto plazmidy přenášené funkce gramnegativních bakterií blíže představeny. Pozornost se soustředí zejména na sdružení přídatných funkcí s geny rezistence k antibiotikům nesené plazmidy. První kapitola věnovaná jedné z klinicky nejvýznamnějších funkcí plazmidů, rezistenci k antibiotikům, je pouze stručným úvodem do problému. Plazmidy odpovědné za šíření rezistence ke klinicky významným antibiotikům (na příkladu šíření širokospektrých beta-laktamáz) budou blíže popsány v kapitole 7.10.3.

### Rezistence k antibiotikům

Plazmidy poskytují hostitelské buňce schopnost odolávat inhibičnímu účinku prakticky všech skupin antimikrobiálních látek. Mezi nejčastější mechanismy asociované s plazmidy patří rezistence k beta-laktamům, tetracyklinům, sulfonamidům, aminoglykozidům, amfenikolům, makrolidům, trimetoprimu a chinolonům. Tomuto tématu se podrobně věnuje recentní publikace A. Carattoli (Carattoli, 2009).



**Obr. 41.** *Klebsiella pneumoniae* ST416 nesoucí IncFII<sub>K</sub> plazmidy sdružené s rezistencí k šesti antibiotickým skupinám a dalšími přídatnými funkcemi

Kmen *K. pneumoniae* ST416 produkující CTX-M-15 byl izolován z pacientů na Klinice dětské onkologie ve Fakultní nemocnici Brno (Dolejska *et al.*, 2012<sup>12</sup>). U kmene byla stanovena kompletní sekvence plazmidů technikou nové generace sekvenování s cílem charakterizovat kontext genu *bla*<sub>CTX-M-15</sub> a identifikovat další přídatné faktory, které se mohly podílet na šíření a udržování kmene v nemocničním prostředí (Dolejska *et al.*, 2013a<sup>17</sup>). Kmen obsahoval dva IncFII<sub>K</sub> plazmidy, pKDO1 (127 508 bp; GenBank JX424423) a pKPN-CZ (207 819 bp; JX424424). Oba plazmidy byly multireplikonové a vykazovaly drobné odlišnosti v sekvenci genu *copA* kódující FII<sub>K</sub> replikon. pKDO1 nesl replikon FII<sub>K</sub> sekvenci varianty 7 (FII<sub>K7</sub>) a dále replikon náležící do Rep-3 rodiny. Větší plazmid pKPN-CZ obsahoval replikon FIB<sub>K</sub> a dále FII<sub>K</sub> sekvenci varianty 8 (FII<sub>K8</sub>). Plazmid pKDO1 byl spojen s antibiotickou rezistencí. Obsahoval oblast multirezistence o velikosti 40 kb (detail šedé oblasti) s geny rezistence k šesti antibiotickým skupinám zahrnující beta-laktamy (*bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>), fluorochinolony (*qnrB1*, *aac(6)-Ib-cr*), tetracykliny [*tet(A)*], aminoglykozidy [*aac(3)-II*, *strAB*, *aac(6)-Ib-cr*], sulfonamidy (*sul2*) a trimetoprim (*dfrA14*). Na plazmidu pKPN-CZ byly identifikovány různé geny kódující přídatné funkce, které se mohly podílet na virulenci a perzistenci studovaného kmene (detail červené oblasti). Jednalo se o geny pro produkci biofilmu, geny zajišťující rezistenci k vysokým teplotám, odolnost k těžkým kovům a sady genů kódující potenciální virulenční faktory (například systém pro příjem železitých iontů). Výše popsané variabilní oblasti obou plazmidů byly vnořeny do kostry plazmidů v okolí genů pro replikaci (zelená oblast). Konzervativní oblast obou plazmidů dále obsahovala sadu genů pro konjugativní přenos (Tra; žlutá) a stabilní udržování plazmidu (modrá).

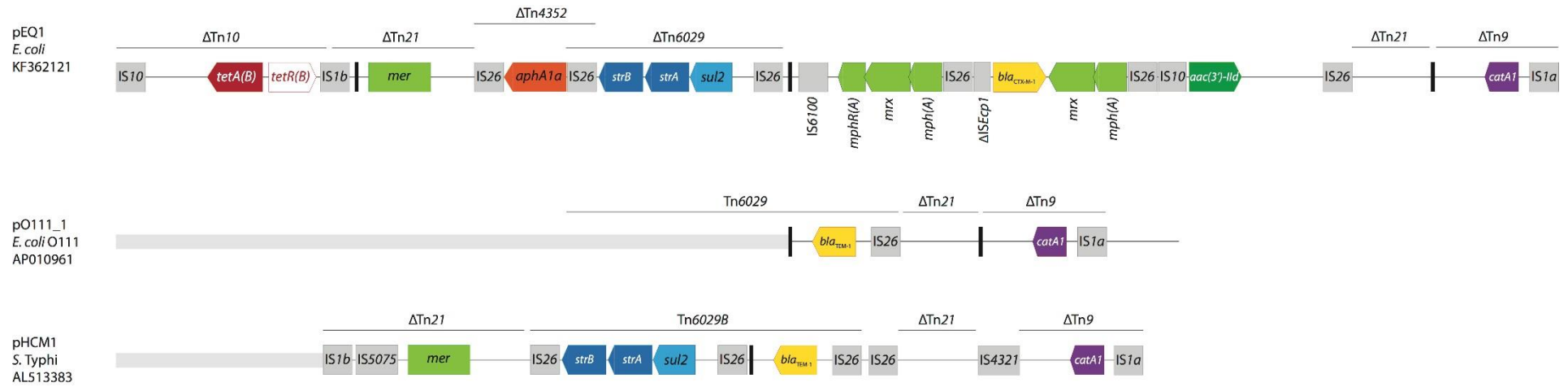
Rezistentní plazmidy dosahují obvykle velikosti > 20 kb, nesou nástroje pro stabilní udržování se v hostitelské buňce (popsané výše v kap. 6.5.8.8) a obvykle disponují schopností konjugativního přenosu mezi buňkami. Začleňování genů není náhodné a probíhá v charakteristických cílových místech plazmidu. Oblast, která již nese nějaký gen rezistence, je pak náchylnější k dalším genetickým přestavbám. Geny rezistence jsou na plazmidech přítomné v multirezistentní oblasti označované jako MRR oblast („multidrug resistance region“) vnořené do základní kostry plazmidu. Tato oblast je vysoce plastická a vykazuje mozaikový charakter (**Obr. 42**). Díky tomuto uspořádání pak rezistentní plazmid může buňce poskytnout fenotyp rezistence k různým antibiotickým skupinám současně. Geny pro rezistence nesené plazmidy tvoří součást jiných mobilních elementů (transpozonů, integronů) nebo se nachází v blízkosti inzerčních sekvencí. Tato organizace zajišťuje v hostitelské buňce jejich přemísťování na jiné místo v rámci téže molekuly plazmidu případně i mobilizaci mezi různými genofory (Norman *et al.*, 2009).

Rezistentní plazmidy enterobakterií náleží do různých Inc skupin. Byla popsána spojitost mezi Inc skupinou a genem rezistence. Například plazmidy skupin IncF, IncA/C, IncL/M, IncN a IncI1 se významně podílí na šíření beta-laktamáz CTX-M a CMY-2 (Carattoli, 2009, 2013). Tyto skupiny plazmidů v kontextu šíření klinicky významných mechanismů rezistence budou popsány v kapitole 7.10.3.

### Rezistence ke kovům a biocidům

Jelikož se těžké kovy v prostředí nachází přirozeně, je také rezistence bakterií k těmto látkám velice běžná (Datta a Hughes, 1983). Místa ovlivněná člověkem (nemocnice, nemocniční i průmyslové odpadní vody, zemědělská půda, těžební oblasti) obsahují zvýšené podíly bakterií s touto rezistencí (Altimira *et al.*, 2012; Bharagava *et al.*, 2014; Heck *et al.*, 2015; Mourao *et al.*, 2015; Nakahara *et al.*, 1977; Sutterlin *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2013).

Antimikrobiální aktivity některých kovů je využíváno například v dezinfekčních přípravcích v nemocnicích nebo při úpravě vody. V současnosti nachází těžké kovy také uplatnění v lékařství při přípravě nanočástic, které se vyznačují zvýšenou antibakteriální aktivitou a snadnou distribucí v lidském organismu (Silver, 2003; Silver a Phung, 2005). Rezistence k těmto látkám může tedy významně komplikovat prevenci a terapii infekčních onemocnění. Toxickému účinku kovů se bakterie brání různými mechanismy zahrnující aktivní odčerpávání kovu, jeho enzymatickou modifikaci nebo tvorbu proteinů vázajících kov. Tato rezistence je obvykle kódovaná geny ve formě operonů nesených velkými (100-300 kb) plazmidy různých Inc skupin. Na plazmidech byly nalezeny geny pro rezistenci ke stříbru, arsenu, kadmiu, kobaltu, chromu, mědi, rtuti, niklu, olovu, teluru nebo zinku.



**Obr. 42:** Organizace MRR oblasti plazmidu pEQ1 a její srovnání s příbuznými oblastmi jiných plazmidů

Vytvořeno podle Dolejska *et al.*, 2014<sup>24</sup>. Plazmid pEQ1 (GenBank KF362121) byl identifikován u izolátů *E. coli* z koní hospitalizovaných na Klinice chorob koní, VFU Brno. Náležel do skupiny IncHI1 a nesl multirezistentní oblast s geny rezistence k šesti skupinám antibiotik (geny rezistence vyznačeny barevně, orientace genu označena šipkou) zahrnující beta-laktamy (*bla<sub>CTX-M-1</sub>*), tetracykliny [*tet(A)*], aminoglykozidy [*aphA1a*, *aac(3)-IId*, *strAB*], sulfonamidy (*sul2*), makrolidy [*mph(A)*] a amfenikoly (*catA1*) a operon *mer* pro rezistenci ke rtuti jako součást  $\Delta$ Tn21. Geny rezistence byly v této oblasti nesený různými rodinami transpozónů (hranice transpozónu vyznačena čarou) a sdruženy s inzerčními sekvencemi (šedé čtverce). Multirezistentní oblasti s různou mírou sekvenční homologie byly identifikovány na příbuzných IncHI1 plazmidech pO111\_1 z *E. coli* O111 (AL010961) a pHCM1 ze *Salmonella* Typhi (AL513383). Silná šedá čára v sekvenci plazmidů pO111\_1 a pHCM1 značí > 99 % podobnost s multirezistentní oblastí pEQ1.

Rezistence ke kovům bývá často sdružena s odolností vůči antibiotikům (Silver, 2003; Silver a Phung, 2005). Příkladem je multirezistentní epidemický klon *K. pneumoniae* ST258 odpovědný za šíření karbapenemázy KPC-3. Tento klon nese plazmid ze skupiny IncFII<sub>k</sub> a zároveň genové klastery *pcoABCDRSE*, *arsRDABC* a *silPABCRSE* pro rezistenci k mědi, arsenu a stříbru (Garcia-Fernandez *et al.*, 2012). Příbuzný IncFII<sub>k</sub> plazmid byl také popsán v České republice u klinických izolátů *K. pneumoniae* s produkcí CTX-M-15 (Dolejska *et al.*, 2013a<sup>17</sup>). Také plazmidy odpovědné za celosvětové šíření karbapenemázy NDM-1 nesou geny rezistence k několika těžkým kovům (Dolejska *et al.*, 2013c<sup>15</sup>; Huang *et al.*, 2013).

Jeden z nejčastějších transpozonů asociovaný s rezistentními plazmidy je Tn21. Představuje vysoce úspěšný transpozon s pandemickým rozšířením u klinických i komenzálních izolátů z člověka, zvířat i prostředí. Tn21 obsahuje ve své sekvenci *mer* operon pro rezistenci ke rtuti a integrony třídy 1 s genovými kazetami pro odolnost k různým antibiotikům (Hobman *et al.*, 2002; Liebert *et al.*, 1999). Operon *mer* je obvykle přítomný na plazmidech kódujících geny pro karbapenemázy a ESBL (Chen *et al.*, 2009; Dolejska *et al.*, 2014<sup>24</sup>; Fernandez-Alarcon *et al.*, 2011; Papagiannitsis *et al.*, 2016<sup>32</sup>; Villa *et al.*, 2013a,b<sup>21</sup>).

Rezistence k biocidům je nejčastěji podmíněna transportními systémy vázanými na chromozom. Jedinou prevalenční determinantou ve formě genové kazety na konjugativních plazmidech je *qacE1* (nebo její deletovaná forma *qacEΔ1*). Poskytuje rezistenci ke kvartérním amoniovým sloučeninám. Jako součást integronů se nachází na multirezistentních plazmidech ve spojitosti s rezistencí k sulfonamidům, aminoglykozidům a beta-laktamům (Bean *et al.*, 2009; Pal *et al.*, 2015; Pastrana-Carrasco *et al.*, 2012).

## Virulence

Virulenční faktory usnadňují přežívání bakterie v hostitelském organismu. Zajišťují adhezi a invazi v těle hostitele nebo interferují s jeho imunitním systémem. Geny pro virulenční faktory mohou být nesené chromozomem nebo plazmidy. Virulentní plazmidy jsou popisovány zejména ve spojitosti s patogenními kmeny *E. coli*. Jedná se o velké nízkokopiové plazmidy obvykle náležící do skupiny IncF (Johnson a Nolan, 2009). Bylo prokázáno, že většina humánních kmenů ETEC nese na plazmidech geny kódující kolonizační faktory (Gaastra a Svennerholm, 1996; Turner *et al.*, 2006). Překvapivé výsledky přinesla také studie, která zdokumentovala, že většina izolátů *E. coli* O157:H7 nesla virulentní plazmid pO157 (Burland *et al.*, 1998).

Vedle virulence mohou plazmidy kódovat další důležité vlastnosti včetně rezistence k antibiotikům. Významné skupiny plazmidů, které spojují tyto dvě funkce, náleží do skupin IncF a IncI1. Všechny dosud popsány IncI1 plazmidy nesou geny pro pily čtvrtého typu, který napomáhá adhezi a invazi

kmenů STEC (Johnson a Nolan, 2009). Mimo jiné je pro ně charakteristická asociace s rezistencí k antibiotikům včetně produkce ESBL (Carattoli, 2009). Multirezistentní IncF plazmidy klinických izolátů *K. pneumoniae* nesou virulenční faktory, např. systém získávání železa nebo TraT protein udávající rezistenci k séru a snižující fagocytózu makrofágy (Dolejska *et al.*, 2013a<sup>17</sup>; Garcia-Fernandez *et al.*, 2012). U salmonel byl popsán rezistentní plazmid pSLF (IncF) nesoucí vysoce konzervativní lokus *spvRABCD*, který umožňuje salmonelám pronikat do buněk hostitele při extraintestinální fázi infekce a přežívat uvnitř makrofágů (Rodicio *et al.*, 2011).

Další plazmidy kódovanou funkcí, která může hrát úlohu v patogenezí, představuje tvorba biofilmu. Bakterie produkující biofilm ulpívají na nejrůznějších površích, jsou spojené s dlouhodobou perzistencí bakterie a její zvýšenou odolností k inhibičnímu účinku antibiotik. Doposud bylo popsáno pouze několik rezistentních plazmidů s geny pro tvorbu biofilmu, například pOLA52 u *E. coli* nebo pKPN-CZ u *K. pneumoniae* (Dolejska *et al.*, 2013a<sup>17</sup>; Norman *et al.*, 2008).

Výše uvedené příklady podtrhují významnou spojitost mezi plazmidy determinovanou virulencí a rezistencí k antibiotikům. Selektivní tlak spojený s používáním antibiotik tak může nepřímo selektovat virulenční faktory. Zároveň častá lokalizace genů virulence na rezistentních konjugativních plazmidech je spojena s rizikem dalšího šíření patogenního potenciálu v bakteriálních populacích.

## Produkce bakteriocinů

Bakteriociny jsou antimikrobiální proteiny s baktericidní aktivitou, které se významně podílí na udržování mikrobiální diverzity. Na rozdíl od antibiotik působí proti úzkému rozmezí cílových bakterií, obvykle proti druhům příbuzným produkčním kmenům. Kmen produkující bakteriocin musí zároveň tvořit protein, který zajišťuje ochranu před vlastním poškozením buňky. Kmeny *E. coli* jsou běžnými producenty bakteriocinů, jejichž tvorba je spojena s přítomností Col plazmidů (Jeziorowski a Gordon, 2007).

Prvním popsáným kolicinem byl ColE1 nesený mobilizovatelnými ColE1 plazmidy (Dougan *et al.*, 1978). Další skupinu plazmidů nesoucích geny pro bakteriociny představují konjugativní ColV plazmidy skupiny IncF. Obsahují gen pro produkci mikrocinu V a jsou rozšířené u extraintestinálně patogenních kmenů APEC a UPEC (Jeziorowski a Gordon, 2007). Na těchto plazmidech jsou asociovány s rezistencí k antibiotikům a virulencí (Johnson a Nolan, 2009; Johnson *et al.*, 2004). Další typy bakteriocinů, koliciny B a M, byly nalezeny ve spojitosti s rezistentními IncF plazmidy kmenů *E. coli* produkující CTX-M-15 nebo SHV-12 (Dolejska *et al.*, 2011d<sup>8</sup>; Smet *et al.*, 2010b). Geny pro tvorbu kolicinu Ib spolu s geny pro beta-laktamázy CTX-M-1 nebo CMY-2 byly popsány také na IncI1 plazmidech (Lin *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014; Zurfluh *et al.*, 2014).

## Další funkce nesené plazmidy

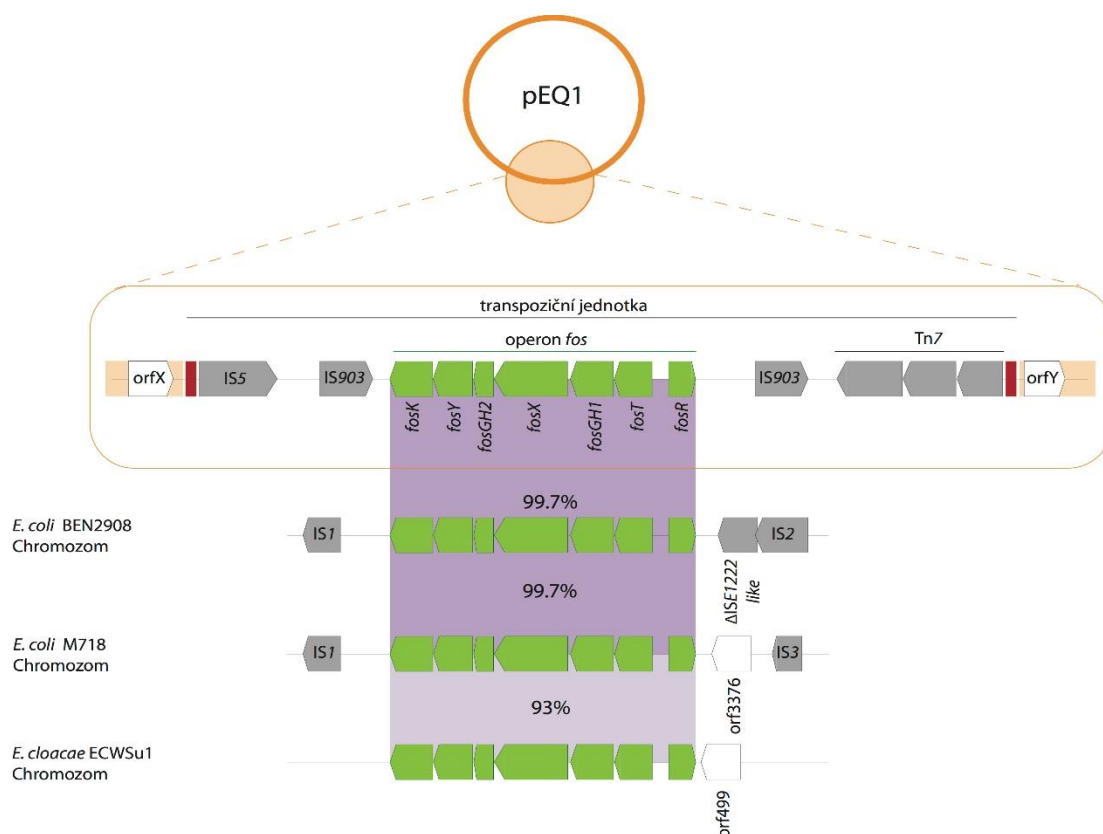
Některé plazmidy nesou geny propůjčující bakteriím schopnost biologicky degradovat organické sloučeniny, které se běžně v přírodě nevyskytují. Jsou známy pod termínem **degradativní plazmidy**. Kódují část příslušné degradační dráhy pro utilizaci kafru, toluenu, naftalenu, n-alkanů, polyaromatických uhlovodíků, bifenyly, pesticidů a dalších organických látek. Obvykle se jedná o velké konjugativní plazmidy ze skupiny inkompatibility P u *Pseudomonas* spp. (Funnel a Phillips, 2004). Nachází praktické využití při bioremediacích.

Další skupinu plazmidů sdruženou s přídatnými funkcemi představují **symbiotické megaplazmidy**. Byly popsány u půdních rhizobií a nesou geny pro symbiotickou fixaci dusíku (Ding a Hynes, 2009).

Na rezistentních plazmidech byly také nalezeny geny pro **rezistenci k vysokým teplotám**. U klinických kmenů *K. pneumoniae* byl popsán gen *clpK* na multirezistentních IncF plazmidech, jehož produkt udílí hostitelským buňkám schopnost odolávat vysoké teplotě (Bojer *et al.*, 2010; Dolejska *et al.*, 2013a<sup>17</sup>; Garcia–Fernandez *et al.*, 2012). Tato funkce by mohla ovlivňovat perzistenci kmenů v nemocničním prostředí.

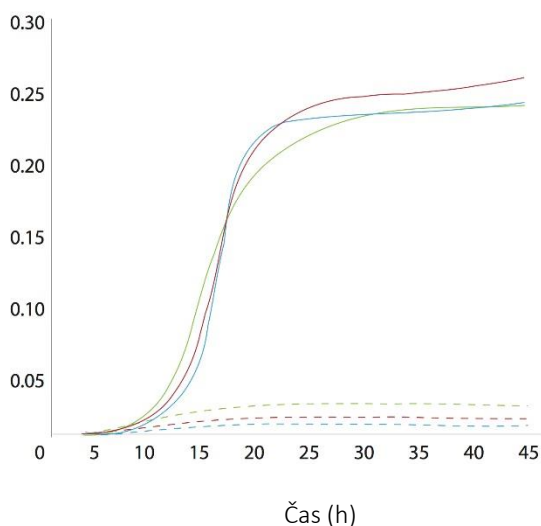
Nedávno byly popsány rezistentní konjugativní plazmidy nesoucí *fos* operon pro **metabolismus krátkých fruktooligosacharidů** (Dolejska *et al.*, 2014<sup>24</sup>). Jednalo se o první studii, která zdokumentovala sdružení genů pro antimikrobiální rezistenci s geny pro metabolismus cukrů. Tyto plazmidy byly identifikovány u kmenů *E. coli* z koní a jejich prostředí (Dolejska *et al.*, 2011a<sup>5</sup>). Struktura *fos* operonu a místo integrace do plazmidu jsou představeny na **Obr. 43**. Fruktooligosacharidy jsou běžně metabolizovány mléčnými bakteriemi, zatímco kmeny *E. coli* je nejsou schopny za normálních okolností využívat (**Obr. 44**). Jelikož tato skupina sacharidů představuje významnou složku rostlinné potravy koní, kmeny *E. coli* schopné tyto cukry využívat jako přídatný zdroj energie pravděpodobně získávají určitou selekční výhodu ve střevním traktu koní.

Plazmidy, které nenesou přídatné geny a nemění tak fenotyp bakteriálního hostitele, se označují jako **plazmidy kryptické**. Při studium potenciálních nových funkcí nesených plazmidy nachází uplatnění funkční genomika (Jorgensen *et al.*, 2015).



**Obr. 43:** Struktura variabilní oblasti plasmidu pEQ1 s *fos* operonem pro metabolismus krátkých fruktooligosacharidů a její srovnání s příbuznými sekvencemi

Vytvořeno podle Dolejska *et al.*, 2014<sup>24</sup>. Operon *fos* je tvořen sedmi geny vyznačenými zelenými šipkami, které určují směr transkripce. Šedé šipky označují mobilní genetické elementy (inzerční sekvence a transpozony). Operony *fos* s vysokou sekvenční homologií (93-99,7 %) ale s odlišným genetickým kontextem byly identifikovány na chromozomu *E. coli* a *E. cloacae*. Místo integrace operonu se v rámci těchto sekvencí různí. V případě pEQ1 plasmidu byl operon součástí kompozitního transpozonu ohraničeného dvěma inzerčními sekvencemi IS903. V této podobě byl operon vnořen do transpoziční jednotky v konzervované oblasti plasmidu (oranžová oblast) mezi geny orfX a orfY. Transpozice jednotky byla spojena duplikací cílové sekvence (červené obdélníky) o velikosti 5 bp ohraničující transpozon na obou stranách.

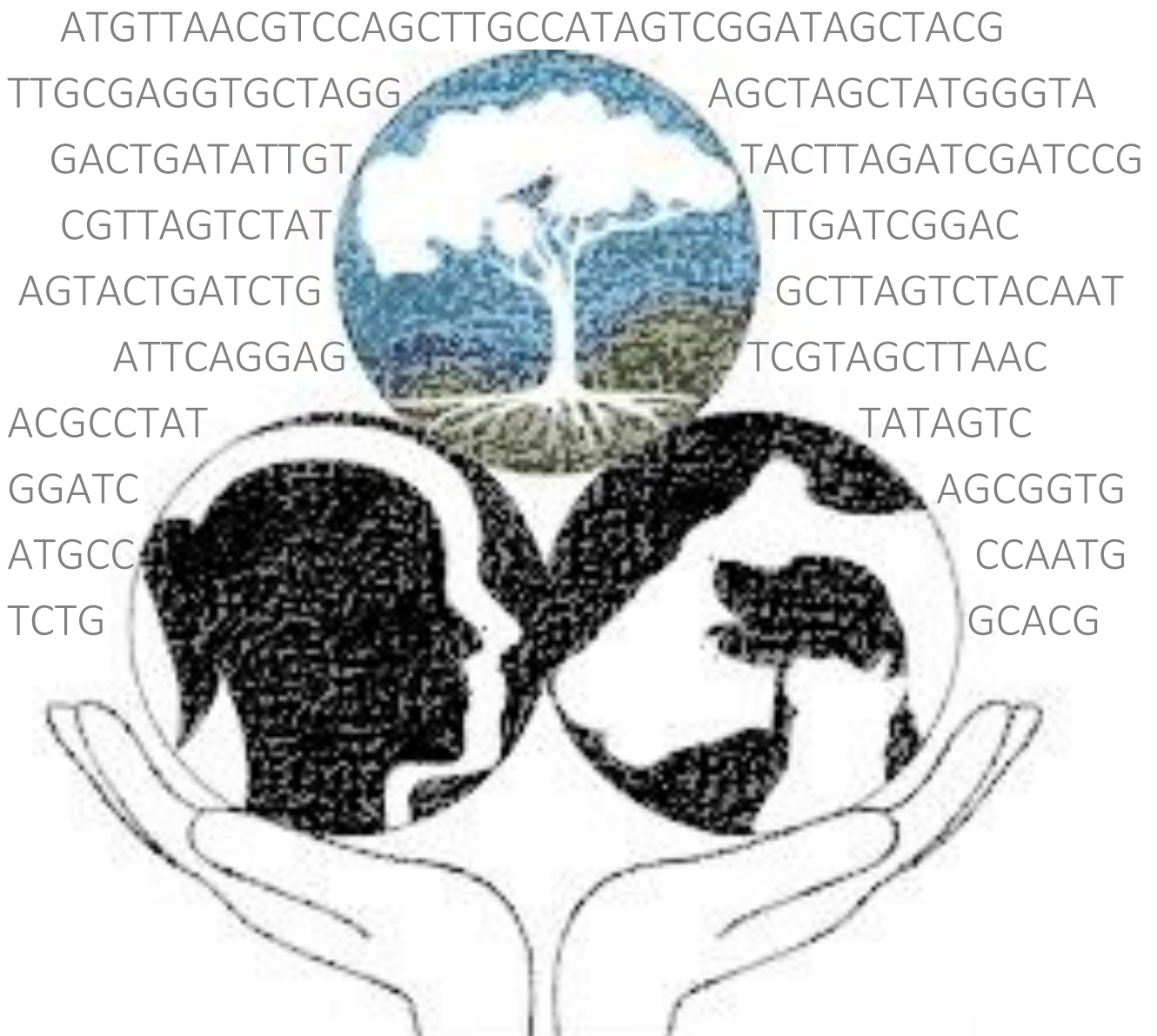


**Obr. 44:** Růst buněk *E. coli* nesoucích plasmid pEQ1 s *fos* operonem v přítomnosti krátkých fruktooligosacharidů

Převzato z Dolejska *et al.*, 2014<sup>24</sup>. scFOS je směs krátkých fruktooligosacharidů. Růst buněk byl sledován v minimálním médiu s přidavkem výše uvedených cukrů.

- *E. coli* Top10 + pEQ1 (5 nM kestóza)
- *E. coli* Top10 + pEQ1 (5 nM nystóza)
- *E. coli* Top10 + pEQ1 (směs scFOS, 0,2 %)
- - - *E. coli* Top10 (5 nM kestóza)
- - - *E. coli* Top10 (5 nM nystóza)
- - - *E. coli* Top10 (směs scFOS, 0,2 %)





## 7. Epidemiologie širokospektrých beta-laktamáz



Narůstající rezistence zástupců čeledi Enterobacteriaceae k cefalosporinům spojená s produkcí beta-laktamáz se širokým spektrem účinku (ESBL, AmpC) představuje rostoucí klinický problém humánní i veterinární medicíny. Tyto enzymy jsou popisovány u komenzálních i patogenních druhů a vyznačují se kosmopolitním rozšířením. Bakterie produkující ESBL jsou identifikovány z případů komunitních i nozokomiálních infekcí, jsou izolovány z trávicího traktu potravinových zvířat a nalézáme je rovněž v prostředí a u zvířat volně žijících. Pro producenty ESBL je navíc charakteristické sdružení s rezistencí k dalším antibiotikům, čímž je podporováno jejich udržování v bakteriálních populacích selekčním tlakem antibiotik z různých funkčních tříd.

V současné epidemiologii ESBL je skloňována zejména beta-laktamáza CTX-M, jejíž šíření je přirovnáváno ke světové epidemii či pandemii. Geny kódující CTX-M se sdružují s inzerčními sekvencemi, integrony a transpozony, které se podílí na expresi genu, jeho šíření a na vytváření výhodnějších kombinací s dalšími genetickými platformami. V této podobě se geny *bla*<sub>CTX-M</sub> začleňují do komplexnějších genetických struktur zahrnujících zejména plazmidy různých inkompatibilních skupin a specifické bakteriální klony, které podporují jejich šíření. Na plazmidech jsou geny pro CTX-M sdruženy s dalšími klinicky významnými mechanizmy, například AmpC beta-laktamázy, karbapenemázami, aminoglykozidovými metylázami a PMQR. Šíření úspěšných klonů (zejména *E. coli* a *K. pneumoniae*) a mobilních genetických elementů utváří dnešní epidemiologii CTX-M.

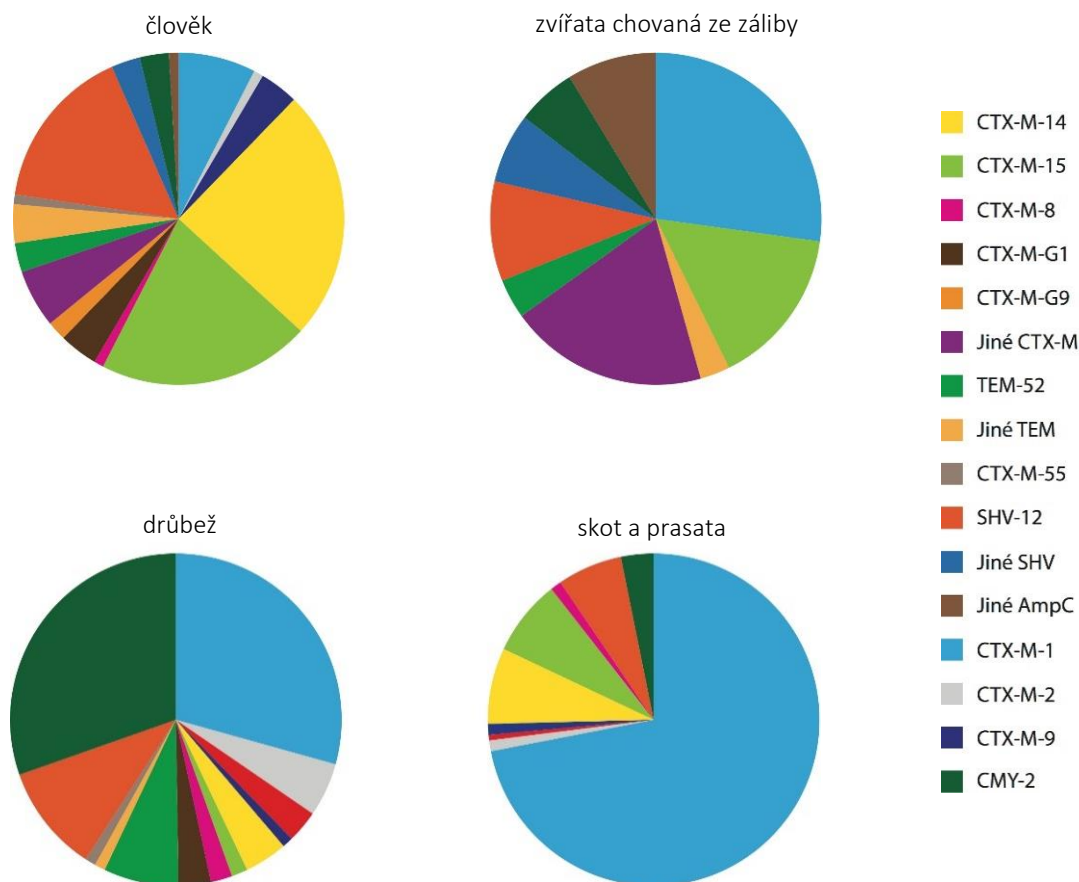
Následující kapitoly jsou zaměřeny na výše uvedené aspekty šíření ESBL. Úvodní kapitoly blíže charakterizují beta-laktamázu CTX-M, vysvětlují její původ a věnují se faktorům, které ovlivňují její úspěšné šíření. Další kapitoly, které obsahují řadu původních prací autora, přináší stručné informace k současné epidemiologii producentů ESBL u člověka, zvířat a v prostředí. Poslední kapitoly jsou pak věnovány MGE v šíření beta-laktamáz s důrazem na enzymy rodiny CTX-M.

## 7.1 Charakteristika beta-laktamáz CTX-M

V posledních dvaceti letech pozoroval svět zásadní změnu v epidemiologii producentů širokospektrých beta-laktamáz. Do konce 90. let dominovaly v Evropě mezi ESBL beta-laktamázy TEM a SHV, zatímco producenti CTX-M tvořili minoritní podíl. Mezi nejčastější producenty ESBL patřily nemocniční kmeny *K. pneumoniae* s SHV-2 nebo SHV-5 (Gniadkowski *et al.*, 1998). V roce 1989 byly současně v Japonsku, Evropě a Severní Americe popsány případy klinických izolátů produkujících CTX-M (Bauernfeind *et al.*, 1992; Bauernfeind *et al.*, 1990; Matsumoto *et al.*, 1988). Během následujících let se CTX-M enzymy rychle rozšířily po celém světě a nahradily dříve frekventované skupiny TEM a SHV. Z počátku byly popisovány především u nemocničních kmenů *K. pneumoniae*, později došlo k jejich šíření v populaci *E. coli* (Pitout *et al.*, 2005). Postupně začaly pronikat do zdravé populace člověka, k farmovým zvířatům a také do prostředí. Změnu epidemiologie názorně dokumentují dlouholeté lokální studie z Itálie

a Rakouska (Brigante *et al.*, 2005; Eisner *et al.*, 2006). Prevalence CTX-M beta-laktamáz mezi ESBL producenty byla v letech 1998–1999 velmi nízká (0–12,5 %), během pěti let však mnohonásobně vzrostla na 38–85 %. Podobná čísla dokumentuje USA, kde během let 2000–2005 došlo k rapidnímu nárůstu kmenů produkujících CTX-M z 25 % na 90 % (Lewis *et al.*, 2007).

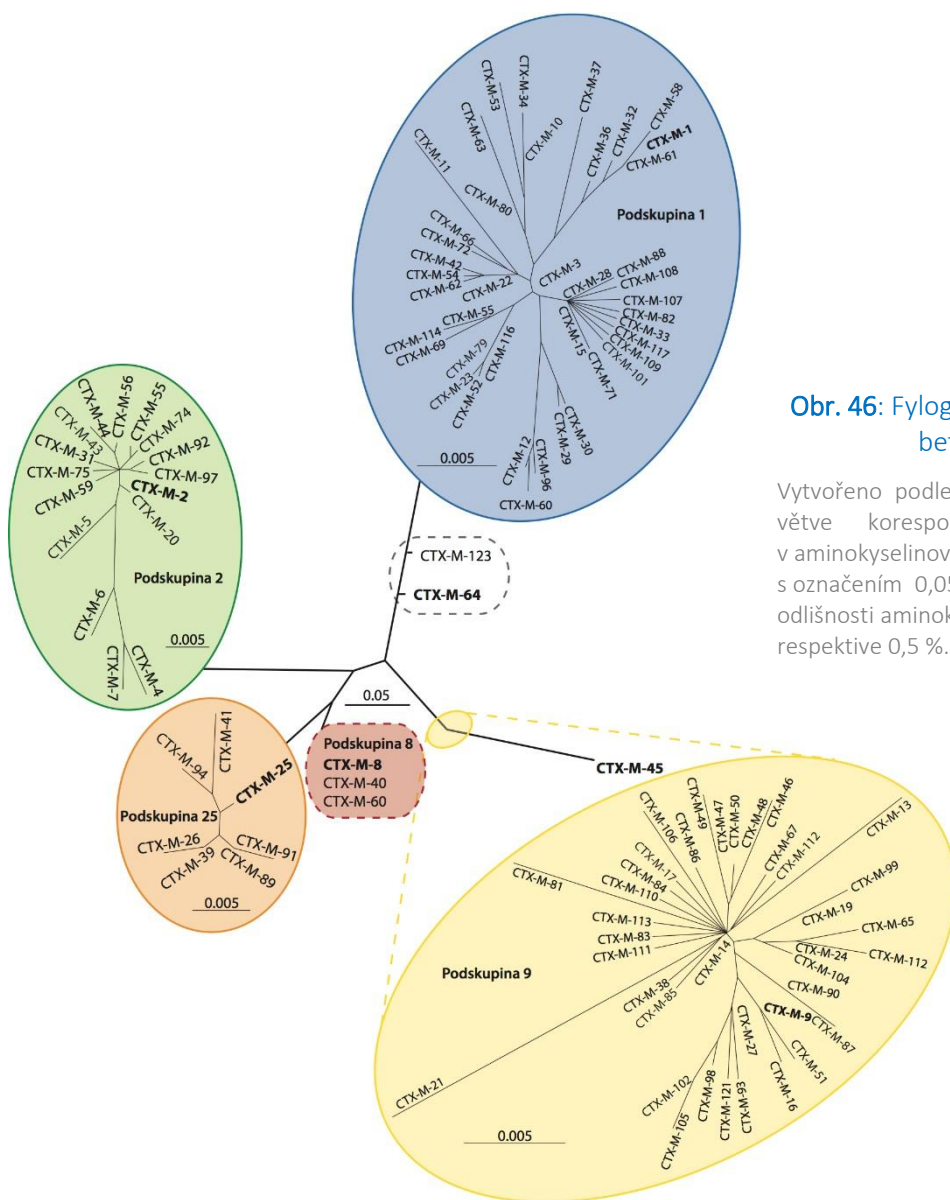
V současné době je jejich rozšíření kosmopolitní a má rostoucí charakter. CTX-M představují nejběžnější ESBL u bakterií původem z člověka, zvířat i prostředí. Nachází se zejména u *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* Typhimurium, ale i u jiných zástupců čeledi Enterobacteriaceae. Distribuci jednotlivých typů cefalosporináz (ESBL a AmpC) v populaci izolátů *E. coli* z člověka, zvířat chovaných ze záliby (psi, kočky, koně) a vybraných skupin potravinových zvířat v Evropě dokumentuje **Obr. 45**. Distribuci jednotlivých variant CTX-M enzymů v různých komoditách se pak blíže věnují kapitoly 7.4–7.8.



**Obr. 45:** Distribuce jednotlivých skupin cefalosporináz (ESBL a AmpC) u *E. coli* humánního i veterinárního původu v Evropě

Vytvořeno podle Ewers *et al.*, 2012. CTX-M-G1 a CTX-G9 značí enzymy podskupin 1 a 9 bez přesného určení sekvenční varianty.

Název CTX-M pochází ze schopnosti těchto enzymů účinněji degradovat cefotaxim v porovnání s ceftazidimem, čímž se odlišují od ESBL typu SHV a TEM. Enzymy CTX-M náleží do molekulární třídy A serinových beta-laktamáz a vyznačují se vysokou heterogenitou (D'Andrea *et al.*, 2013). Třídíme je do šesti základních podskupin: 1, 2, 8, 9, 25 a KLU, které se mezi sebou liší v aminokyselinové sekvenci  $\geq 10\%$  (Obr. 46). Číslo podskupiny představuje archetypální enzym dané skupiny (např. CTX-M-1 pro skupinu 1, CTX-M-2 pro skupinu 2 atd.). Variabilita v rámci skupiny je naopak nízká a dosahuje maximálně 5 %. Bylo rovněž popsáno několik hybridních struktur CTX-M beta-laktamáz, které vykazují charakteristiky dvou různých skupin. Příkladem jsou CTX-M-64, CTX-M-123 a CTX-132, které představují hybridní varianty CTX-M-14 a CTX-M-15 a vznikly pravděpodobně v důsledku rekombinace genů těchto dvou beta-laktamáz (D'Andrea *et al.*, 2013; He *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015).



**Obr. 46:** Fylogenetický strom CTX-M beta-laktamáz

Vytvořeno podle Zhao a Hu, 2013. Délka větve koresponduje s počtem změn v aminokyselinové sekvenci. Měřítko s označením 0,05 a 0,05 představují míru odlišnosti aminokyselinové sekvence, tj. 5 % respektive 0,5 %.

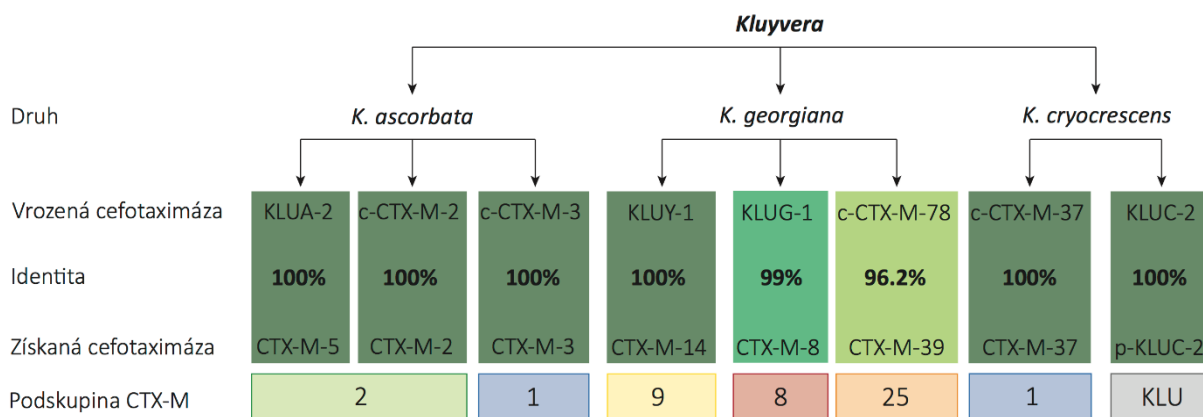
Nejvíce CTX-M-variant obsahují podskupiny 1 a 9 a zároveň představují nejrozšířenější ESBL (D'Andrea *et al.* 2013). V současnosti mezi zástupci čeledi Enterobacteriaceae dominují varianty CTX-M-14 a CTX-M-15, dále také CTX-M-2, CTX-M-3 a CTX-M-1 (Canton *et al.*, 2012b; Zhao a Hu, 2013).

Jednotlivé sekvenční varianty se mohou lišit různou mírou aktivity k cefalosporinům. Například CTX-M-15 a CTX-M-32 se liší od CTX-M-1 a CTX-M-3 substitucí Asp240→Gly, díky které mají mnohonásobně vyšší schopnost hydrolýzy ceftazidimu (Cartelle *et al.*, 2004; Poirel *et al.*, 2002a). Recentní studie španělských autorů se věnovala evoluci CTX-M podskupiny 1 (Novais *et al.*, 2010). Ve své práci dokumentují úlohu selekčního tlaku cefalosporinů (ceftazidimu a cefotaximu) v rychlé diverzifikaci enzymu CTX-M-3. Antibiotika tedy nehrají pouze úlohu v selekci bakterií nesoucích determinanty rezistence, ale představují také významný faktor v evoluci rezistentních variant.

## 7.2 Původ CTX-M

Jako zdroj genu *bla*<sub>CTX-M</sub> u klinicky významných bakterií byl identifikován chromozom *Kluyvera* spp. (Obr. 47). *Kluyvera* spp. náleží do čeledi Enterobacteriaceae, vyskytuje se především v prostředí a vykazuje omezenou patogenitu pro člověka a zvířata (Farmer *et al.*, 1981). Byla izolována jako minoritní součást běžné střevní mikroflóry člověka, kde plní funkci saprofyta či oportunního patogena a dokumentována z případů infekcí močových cest a měkkých tkání (Sarria *et al.*, 2001).

Beta-laktamázy podskupiny CTX-M-1 jsou vysoce homologické s enzymem KLUC-1 identifikovaným u *Kluyvera cryocrescens* (Decousser *et al.*, 2001). Podobné souvislosti byly nalezeny v případě dalších podskupin CTX-M. Enzymy podskupiny 1 a 2 vykazují vysokou míru podobnosti aminokyselinové sekvence s chromozomálními cefotaximázami *Kluyvera ascorbata* (Humeniuk *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2004). Získané CTX-M beta-laktamázy podskupin 8, 9 a 25 jsou příbuzné enzymům popsaným u *Kluyvera georgiana* (Margarita Rodriguez *et al.*, 2010; Olson *et al.*, 2005; Poirel *et al.*, 2002b). Jednotlivé podskupiny CTX-M enzymů mají pravděpodobně svůj původ u různých druhů rodu *Kluyvera*. Variabilita v rámci skupiny je pak dána mikroevolucí genu po jeho přenosu k sekundárnímu hostiteli v důsledku selekčního tlaku cefalosporinů (D'Andrea *et al.*, 2013). Na mobilizaci genů pro CTX-M beta-laktamázy z přirozených rezervoárů ke klinicky významným bakteriím se pravděpodobně podílely inzerční sekvence, zejména *ISEcp1*. Proces mobilizace genů *bla*<sub>CTX-M</sub> bude vysvětlen v kapitole 7.10.1.



**Obr. 47:** Vrozené cefotaximázy *Kluyvera* spp. jako zdroje beta-laktamázy rodiny CTX-M

Vytvořeno podle Zhao a Hu, 2013. Příbuznost vrozených cefalosporináz *Kluyvera* spp. a získaných CTX-M beta-laktamáz Enterobacteriaceae je stanovena na základě aminokyselinové sekvence enzymu a podobnosti okolních sekvencí sdružených s genem pro cefalosporinázu. Předpona „c“ před názvem některých vrozených cefalosporináz *Kluyvera* spp. značí jejich lokalizaci na chromozomu. Získaná cefalosporináza pKLUC-2 vykazující 100 % sekvenci homologii s vrozenou cefalosporinázou KLUC-2 z *K. cryocrescens*, byla popsána na plasmidu u klinického izolátu *Enterobacter cloacae*.

### 7.3 Faktory ovlivňující šíření CTX-M

Současná epidemiologie beta-laktamázy CTX-M je příkladem rychlého a globálního šíření klinicky významného mechanismu rezistence řízené plazmidy. Důvod pozoruhodného úspěchu této skupiny beta-laktamáz nebyl zcela objasněn. Pravděpodobně se jedná o souhrn několika faktorů zahrnující přítomnost genu *bla*<sub>CTX-M</sub> na vysoce konjugativních plazmidech, nízké energetické nároky pro bakteriální buňku potřebné pro expresi *bla*<sub>CTX-M</sub> genu a přítomnost příbuzných genetických elementů u bakteriálních hostitelů umožňující výměnu genů např. rekombinací. Dalším faktorem v jejich expanzivním šíření je vazba na úspěšné klony bakterií (Canton a Coque, 2006; D'Andrea *et al.*, 2013; Rogers *et al.*, 2011; Rossolini *et al.*, 2008; Woodford *et al.*, 2011). Mobilním genetickým elementům a epidemickým klonům v šíření ESBL včetně CTX-M budou blíže věnovat kapitoly 7.9 a 7.10. Producenti CTX-M obvykle vykazují rezistenci k dalším antibiotikům zahrnující zejména aminoglykozidy, fluorochinolony, tetracykliny a sulfonamidy. Kromě cefalosporinů se na jejich selekci mohou podílet i antibiotika z jiných funkčních tříd (Canton a Ruiz-Garbajosa, 2011).

Bylo identifikováno několik rizikových faktorů kolonizace nebo infekce bakteriemi s produkcí ESBL. Zahrnují především terapii cefalosporiny (případně i dalšími antibiotiky), hospitalizaci v nemocnici, pobyt v léčebně dlouhodobě nemocných, cestování do oblastí s endemickým výskytem ESBL, chirurgické zákroky atd. (Laupland *et al.*, 2008a; Laupland *et al.*, 2008b; Lytsy *et al.*, 2008). V případě potravinových zvířat jsou významnými faktory profylaktické použití cefalosporinů, vlastní charakter produkce,



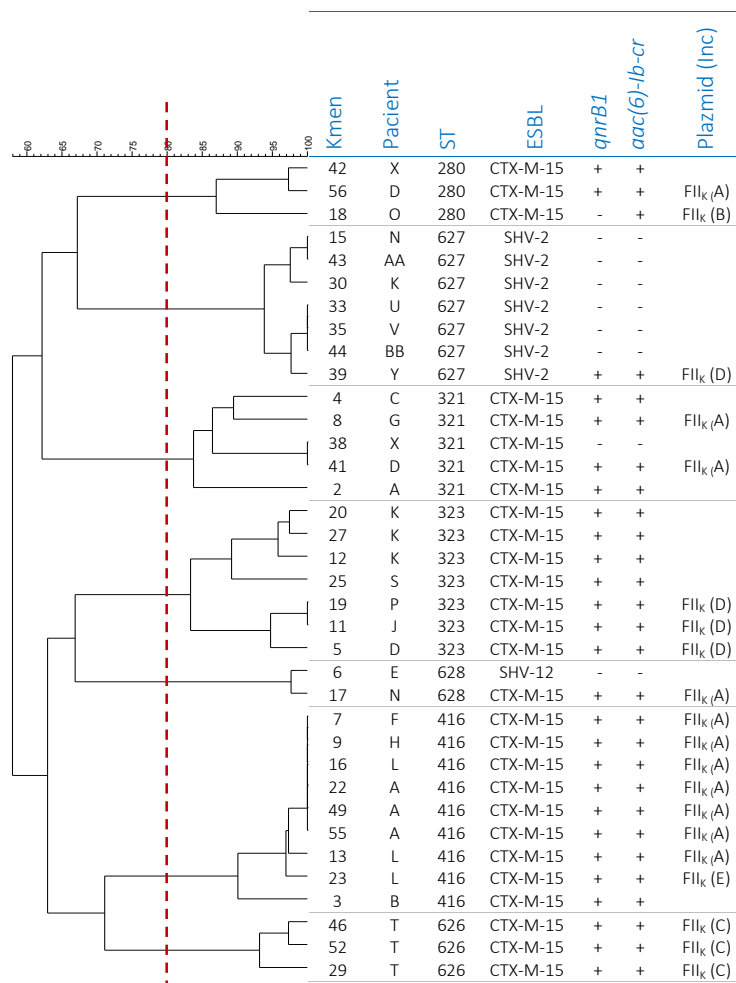
přeplněnost prostor chovu a s tím související hygienické podmínky a další (Dolejska *et al.*, 2011c<sup>6</sup>; Hammerum *et al.*, 2014; Hering *et al.*, 2014).

#### 7.4 Rozšíření ESBL u humánních izolátů

V posledním desetiletí je pozorován významný nárůst prevalence enterobakterií rezistentních k cefalosporinům u hospitalizovaných pacientů a v komunitě. Tento trend se týká celého světa včetně Evropy a zahrnuje patogenní i komenzální bakteriální druhy. Z důvodu klinické závažnosti tohoto mechanismu rezistence se monitoringem výskytu producentů ESBL zabývají programy na lokální, národní i mezinárodní úrovni. V Evropě se jedná především o integrovaný systém EARS-Net (Antimicrobial resistance interactive database), který v současné době koordinuje ECDC (European Centre for Disease and Prevention Control), a do něhož je zapojena i Česká Republika (<http://ecdc.europa.eu/>). V porovnání s Evropou je prevalence producentů ESBL v Jižní Americe a Asii vyšší, naopak Severní Amerika dokumentuje dlouhodobě nižší výskyt. Zároveň v rámci Evropy jsou pozorovány značné geografické odlišnosti.

Pro současnou epidemiologii ESBL u humánních izolátů v Evropě je charakteristická obecná dominance beta-laktamázy CTX-M-15. Nicméně v některých zemích převládají jiné typy CTX-M, např. CTX-M-14 a CTX-M-9 ve Španělsku a Portugalsku nebo CTX-M-1 v Itálii a Francii (Smet *et al.*, 2010a). Beta-laktamáza CTX-M-15 převažuje také u klinických izolátů enterobakterií v České republice (Cekanova *et al.*, 2009; Mícenkova *et al.*, 2014; Papagiannitsis *et al.*, 2015b). Tato varianta rovněž dominovala u izolátů čeledi Enterobacteriaceae (zejména *K. pneumoniae*) s produkcí ESBL v rektálních výtěrech kolonizovaných pacientů hospitalizovaných na Klinice dětské onkologie (**Obr. 48**; Dolejska *et al.*, 2012<sup>12</sup>). U většiny izolátů byl gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> prokázán na příbuzných IncFII<sub>k</sub> plazmidech, které mohly hrát významnou úlohu v šíření ESBL mezi bakteriemi na sledovaném oddělení. Úspěch této beta-laktamázy dokumentuje také španělská studie (Diaz *et al.*, 2010). V rámci národní surveillance nebyla beta-laktamáza CTX-M-15 ve sbírce ESBL izolátů z roku 2000 prokázána. V opakovaném vyšetření v roce 2006 se stala však třetí nejčastější variantou po beta-laktamázách CTX-M-14 a SHV-12. Podobně v Polsku, kde na počátku šíření CTX-M enzymů dominovala varianta CTX-M-3 v souvislosti s diseminací vysoce konjugativního epidemického plazmidu pCTX-M-3, postupně převládá varianta CTX-M-15 (Empel *et al.*, 2008; Golebiewski *et al.*, 2007; Izdebski *et al.*, 2013; Pobiega *et al.*, 2013). K jejímu pronikání dochází také ve státech Jižní Ameriky, kde nahrazuje variantu CTX-M-2 (Bonelli *et al.*, 2014). Častý nález této beta-laktamázy mimo jiné souvisí s šířením epidemického klonu *E. coli* ST131, který je sdružen s CTX-M-15, o čemž bude blíže pojednávat kapitola 7.9.





**Obr. 48:** Charakterizace kmenů *K. pneumoniae* produkujících ESBL z pacientů Kliniky dětské onkologie

Vytvořeno podle Dolejska *et al.*, 2012<sup>12</sup>. Dendrogram byl vytvořen na základě makrorestrikčních profilů genomové DNA. Kmeny s podobností profilu  $\geq 80\%$  (ohrazeno červenou linií) byly vyhodnoceny jako epidemiologicky příbuzné. Kmeny náležely k jednomu ze sedmi sekvenčních typů (ST), byly multirezistentní a nesly plazmidově determinované geny rezistence k fluorochinolonom. Písmeno za inkompatibilní (Inc) skupinou plazmidu vyjadřuje restriční profil plazmidu nesoucího gen pro ESBL. Plazmidy se stejným profilem jsou považovány za identické. U různých pacientů byly nalezeny kmeny se stejnými genotypem a fenotypem.

Produkce ESBL je častá u původců nozokomiálních infekcí v souvislosti s život ohrožující bakteriemi a neonatální sepsí (Canton *et al.*, 2008). Hospitalizovaní pacienti jsou také vystaveni zvýšenému riziku kolonizace gastrointestinálního traktu (GIT) kmeny s produkcí ESBL v porovnání se zdravými jedinci v komunitě (Ben-Ami *et al.*, 2006; Castillo Garcia *et al.*, 2007; Garrido *et al.*, 2014). Z České republiky jsou dostupná recentní data z Olomoucka, která uvádí nosičství enterobakterií s ESBL u 8 % hospitalizovaných pacientů a 3 % jedinců z komunity (Husickova *et al.*, 2012). Pro nozokomiální kmeny je charakteristická rezistence k různým skupinám antibiotik, terapeutické možnosti léčby infekcí těmito kmeny jsou tedy omezené. Účinné jsou karbapenemy a v případě nezávažných infekcí je možné podat kombinace beta-laktamů s inhibitory beta-laktamázy. Při prokázané *in vitro* citlivosti se v závislosti na charakteru infekce často přistupuje k léčbě chinolony nebo aminoglykozidy (Canton a Coque, 2006).

Kmeny *E. coli* produkující CTX-M-15 jsou časté v případech komunitních i nozokomiálních močových infekcí (Martin *et al.*, 2016; Pitout *et al.*, 2005). K zajímavým výsledkům dospěla studie španělských autorů, která prokázala kolonizaci GIT kmeny *E. coli* s produkcí ESBL u 70 % komunitních pacientů s močovou infekcí (Rodriguez-Bano *et al.*, 2008; Valverde *et al.*, 2008). Zároveň 27 % rodinných příslušníků těchto pacientů neslo ve střevním traktu kmen *E. coli* s ESBL. Výsledky těchto studií naznačují, že kolonizovaní jedinci jsou vystaveni vyššímu riziku rozvoje močové infekce vyvolané ESBL kmenem a mohou být také zdrojem pro další osoby. Rizikové je v tomto ohledu cestování do oblastí s vysokým výskytem ESBL. Byla prokázána spojitost mezi zvýšenou kolonizací GIT producenty ESBL a pobytem v Indii, jihovýchodní Asii, Africe a na Středním východě (Dhanji *et al.*, 2011; Peirano *et al.*, 2011; Tangden *et al.*, 2010; Tham *et al.*, 2010). Recentní kanadská studie zdokumentovala nosičství ESBL v GIT u 46 % osob po návratu z výše uvedených oblastí oproti 4 % zjištěným u lidí, kteří po dobu 6 měsíců do zahraničí nevycestovali (Peirano *et al.*, 2011).

## 7.5 Výskyt ESBL u izolátů z potravinových zvířat

Odborných publikací zaměřených na studium producentů ESBL v posledních deseti letech rapidně narůstá. Bakterie s tímto mechanismem rezistence byly dokumentovány u všech skupin potravinových zvířat. Jejich výskyt se různí s ohledem na mnoho faktorů zahrnujících geografickou oblast, druh zvířete, charakter konkrétního chovu, lokality atd. Porovnání hodnot prevalencí ESBL či konkrétních variant těchto enzymů popsanych v odborné literatuře naráží na úskalí z důvodu použití odlišných metodických přístupů různými autory. Programy na národní a mezinárodní úrovni sjednocují metodické přístupy pro izolaci a charakterizaci cílových bakterií rezistentních k cefalosporinům třetí generace. Mechanismus rezistence je v rámci těchto programů však obvykle stanoven jen na úroveň fenotypu odlišující producenty ESBL a AmpC beta-laktamáz. Určení dalších charakteristik metodami molekulární biologie, zejména stanovení konkrétní varianty beta-laktamázy, sekvenčního typu bakterie a plazmidu nesoucího tento mechanismus rezistence, se obvykle neprovádí. Tato informace je však zásadní pro pochopení epidemiologie producentů ESBL v potravním řetězci.

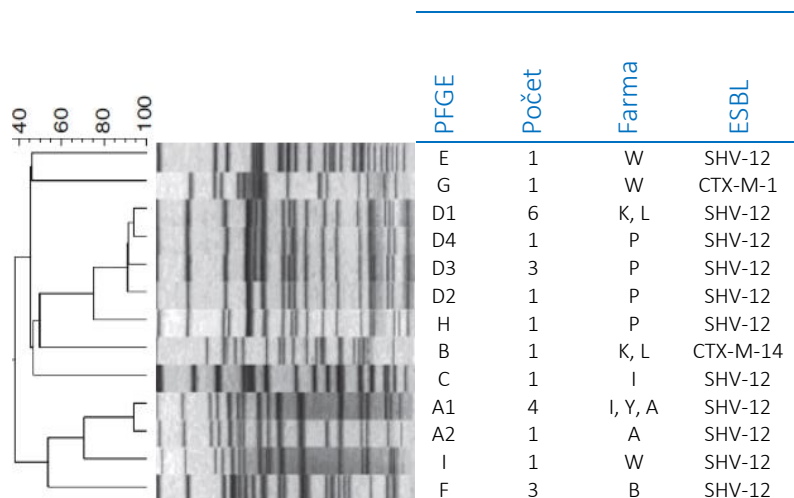
První izoláty s produkcí ESBL byly u potravinových zvířat zachyceny v letech 2000–2001. Jednalo se o kmeny *E. coli* z jatečných kuřat ve Španělsku vyšetřených v rámci národního monitorovacího programu (Brinas *et al.*, 2003). Byly nalezeny kmeny s CTX-M-14 a SHV-12 v celkové prevalenci 1,6 %. Návazná studie provedená o 3 roky později prokázala nárůst na 5 % (Brinas *et al.*, 2005). Další pilotní práce pak pochází z Francie a Japonska, které dokumentují u drůbeže výskyt CTX-M-1, CTX-M-2 a CTX-M-14 (Girlich *et al.*, 2007; Kojima *et al.*, 2005). Následně byly tyto varianty identifikovány také v chovech skotu a prasat v Evropě a Japonsku (Aarestrup *et al.*, 2006; Blanc *et al.*, 2006; Liebana *et al.*,

2006; Meunier *et al.*, 2006; Shiraki *et al.*, 2004). Vysoký podíl izolátů *E. coli* a *Salmonella* spp. s ESBL u drůbeže dnes dokumentuje Španělsko, Itálie, Nizozemí a Polsko. Naopak jejich výskyt u skotu a prasat je v Evropě obecně nízký (EFSA, 2011).

V současné době jsou u izolátů *E. coli* a *Salmonella* spp. z potravinových zvířat nejčastěji nacházeny varianty CTX-M-1, -2, -9, -14, -15, -32, SHV-2, -12 a TEM-52. Nejrozšířenější variantou CTX-M enzymů u bakterií z potravinových zvířat v Evropě je CTX-M-1 (EFSA, 2011; Ewers *et al.*, 2012). Izoláty s produkcí CTX-M-1 tvoří u skotu a prasat 70 % producentů ESBL (Ewers *et al.*, 2012). Beta-laktamáza CTX-M-14 je pak typická především pro Asii, dále je popisována ve Středomoří, jižní Evropě, ve Velké Británii a Belgii (Ewers *et al.*, 2012). Variantu CTX-M-2 dokumentuje střední a severní Evropa, Velká Británie a Irsko (EFSA, 2011). Beta-laktamáza CTX-M-15, která je typická spíše pro humánní klinické izoláty, je nacházena u enterobakterií z potravinových zvířat omezeně. V Evropě je sporadicky prokazována například u skotu (Endimiani *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 2014; Geser *et al.*, 2012; Hunter *et al.*, 2010; Madec *et al.*, 2012), ojediněle také u prasat a drůbeže (Fischer *et al.*, 2014; Randall *et al.*, 2011).

V České republice byl první záchyt producentů ESBL popsán v roce 2010 u drůbeže (Kolar *et al.*, 2010). Jednalo se o 7 (2,3 %) izolátů *E. coli* z krůt a brojlerů, u kterých byla zjištěna přítomnost ESBL variant CTX-M-1, CTX-M-14 nebo SHV-12. Výskytu ESBL u drůbeže jsme se věnovali také na našem pracovišti. V letech 2006-2007 bylo ve spolupráci se Státním veterinárním ústavem vyšetřeno 40 krůtích farem (Dolejska *et al.*, 2011d<sup>8</sup>). Kmeny *E. coli* s produkcí ESBL byly prokázány v prostředí 20 % testovaných farem. Dominovala beta-laktamáza SHV-12 nesená konjugativními IncFII plazmidy. Většina analyzovaných plazmidů vykazovala identický restriční profil, což ukazuje na šíření genu *bla*<sub>SHV-12</sub> horizontální cestou mezi nepříbuznými izoláty *E. coli* zprostředkovaný dominantní plazmidovou linií. Na různých farmách byly nalezeny izoláty s identickým genetickým profilem (Obr. 49). Tato studie upozorňuje na možné šíření těchto kmenů z líhní v zahraničí, ze kterých pochází krůtata zakoupená pro chovy v České republice. Další studie se věnovala vyšetření jatečně opracovaných těl brojlerů z 12 jatek v ČR na přítomnost *E. coli* rezistentní k cefalosporinům a fluorochinolonům (Literak *et al.*, 2013<sup>16</sup>). Ačkoliv výskyt izolátů *E. coli* s rezistencí k fluorochinolonům byl vysoký, žádné ESBL izoláty prokázány nebyly.

ESBL izoláty byly v České republice u skotu a prasat prokázány poprvé v roce 2012 (Bardon *et al.*, 2013). Vyšetřením jatečných těl byly identifikovány izoláty *E. coli* s ESBL (bez určení konkrétní varianty) v 17 % vzorků. Na farmě s frekventovaným použitím ceftiofuru pro terapii a prevenci mastitid byly z 39 % dojnic prokázány izoláty *E. coli* s genem *bla*<sub>CTX-M-1</sub> neseným plazmidem ze skupiny IncN (Dolejska *et al.*, 2011c<sup>6</sup>). Většina izolátů vykazovala stejný genetický profil. Studie poukazuje na význam selekčního tlaku ceftiofuru na klonální a horizontální šíření ESBL v tomto konvenčním chovu. V certifikovaném organickém chovu, ve kterém tato skupina antibiotik zvířatům podávána nebyla, byl identifikován jeden izolát s produkcí ESBL (Dolejska *et al.*, 2011c<sup>6</sup>).



**Obr. 49:** Typizace *E. coli* s produkcí ESBL z prostředí krůtích farem v ČR

Vytvořeno podle Dolejska *et al.*, 2011d<sup>8</sup>. Příbuznost izolátů byla stanovena makrorestrikční analýzou genomové DNA následovanou separací fragmentů pulzní gelovou elektroforézou (PFGE). Podobnost PFGE profilů izolátů znázorňuje dendrogram vlevo. Izoláty jsou vyhodnoceny jako příbuzné, pokud vykazují alespoň 85 % podobnost PFGE profilů. Kmeny s identickým genotypem byly nalezeny například na farmách I, Y, A (kmeny s profilem A1) nebo na farmách K a L (kmeny s profilem D1 nebo B).

## 7.6 Výskyt ESBL u izolátů ze zvířat chovaných ze záliby

Výskyt producentů ESBL je sledován u cílových skupin zvířat, zejména u psů, koček a koní. První izolát s produkcí ESBL (varianta SHV-12) byl prokázán u psa s močovou infekcí ve Španělsku v roce 1998 (Teshager *et al.*, 2000). Brzy poté byly publikovány další práce dokumentující jejich výskyt u psů v Itálii a Portugalsku (Carattoli, 2008; Carattoli *et al.*, 2005b; Costa *et al.*, 2004; Feria *et al.*, 2002; Pomba *et al.*, 2009). Podobně jako u potravinových zvířat rovněž u zvířat chovaných ze záliby v současnosti dominuje beta-laktamáza CTX-M, konkrétně varianta CTX-M-1. Další frekventovanou beta-laktamázou je CTX-M-15, která se vyskytuje přibližně u 15 % izolátů s ESBL (Ewers *et al.*, 2012).

Nejvíce prací je zaměřeno na psy z důvodu jejich blízkého kontaktu s člověkem a vyplývajících rizik zoonotického přenosu rezistentních a patogenních bakterií. Prevalence nosičství producentů ESBL ve střevě psů se v jednotlivých zemích značně liší (Ewers *et al.*, 2012). Popsané rozdíly v sobě odrážejí jednak specifickou epidemiologii dané oblasti, odlišné metodické postupy při odběru vzorků a kultivaci producentů ESBL a v neposlední řadě také to, zda vzorek pochází od zdravého jedince nebo od zvířete s prokázaným infekčním onemocněním. Nejvyšší čísla dokumentuje například Nizozemí, kde byly tyto izoláty selektivní kultivací prokázány u 45–55 % zdravých i průjmujících psů (Hordijk *et al.*, 2013). V České republice se tímto problémem zabývala pouze jedna studie z našeho pracoviště, která prokázala izoláty *E. coli* s CTX-M-1 u 4 % zdravých psů (Albrechtová *et al.*, 2012a).

Beta-laktamáza CTX-M-15 je u izolátů ze zdravých i nemocných psů často popisována v souvislosti s humánním pandemickým klonem *E. coli* ST131 (Albrechtova *et al.*, 2012b<sup>11</sup>; Albrechtova *et al.*, 2014<sup>25</sup>; Bogaerts *et al.*, 2015; Ewers *et al.*, 2010; Haenni *et al.*, 2014). Ze psů byly také izolovány enterobakterie s produkcí karbapenemáz OXA-48, NDM-5 a VIM-1 (Stolle *et al.*, 2013). Původ těchto kmenů je s nejvyšší pravděpodobností humánní.

Výskytem enterobakterií s produkcí ESBL u koní se zabývalo pouze několik prací (Damborg *et al.*, 2012; Dierikx *et al.*, 2012; Ewers *et al.*, 2010; Maddox *et al.*, 2012a; Schmiedel *et al.*, 2014; Vo *et al.*, 2007). Hospitalizace a antibiotická terapie představují významné faktory pro kolonizaci GIT koní ESBL kmeny (Damborg *et al.*, 2012; Maddox *et al.*, 2012b). Nosičství enterobakterií s tímto mechanismem rezistence u zdravých koní však nebyla věnována dostatečná pozornost. Vyšetřením hospitalizovaných koní na přítomnost producentů ESBL se zabývala také naše výzkumná skupina (Dolejska *et al.*, 2011a<sup>5</sup>). Studie byla realizována na Klinice chorob koní (VFU Brno), která je největší klinikou v České republice. Selektivní kultivací vzorků trusu byly nalezeny multirezistentní kmeny *E. coli* s produkcí CTX-M-1 u třetiny vyšetřených koní. Současně však byly také prokázány ve stěrech z prostředí stájových boxů a u hmyzu odchyceném na klinice. Frekventovaný nález kmenů s identickým genotypem u koní a v prostředí ukazuje na nozokomiální šíření ESBL kmenů mezi hospitalizovanými jedinci a na pravděpodobnou perzistenci těchto kmenů v prostředí nemocnice. Z jednoho ošetřovatele na klinice byl izolován kmen identický s tím, který dominoval ve střevě koní. Gen pro beta-laktamázu CTX-M-1 byl u většiny vyšetřených izolátů nalezen na multirezistentních konjugativních IncHI1 plasmidech. Horizontální přenos genů rezistence představoval významný faktor v šíření CTX-M-1 mezi kmeny *E. coli* na klinice.

## 7.7 Šíření ESBL v prostředí – význam odpadních vod

Humánní i veterinární odpady jsou považovány za důležité zdroje rezistentních bakterií pro přilehlé vodní ekosystémy (Gao *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Rizzo *et al.*, 2013; Schijyen *et al.*, 2015; Tennstedt *et al.*, 2003). V rozvojovém světě je nedostatečná sanace odpadu spojena s kontaminací vodních toků a zdrojů pitné vody rezistentními bakteriemi. Enterobakterie produkující ESBL byly izolovány v 10–33 % vzorků studniční, kohoutkové a balené pitné vody v Číně, Bangladéši a Demokratické republice Kongo (De Boeck *et al.*, 2012; Talukdar *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015). Příkladem je také šíření bakterií s karbapenemázou NDM-1 v Novém Dillí v povrchové a pitné vodě (Walsh *et al.*, 2011). Kontaminace vodního prostředí antropogenními odpady se týká i světa rozvinutého. Do vodních toků se rezistentní bakterie dostávají cestou ČOV, které nejsou schopné rezistentní bakterie spolehlivě odstranit.

V odpadních vodách se běžně vyskytují nízké koncentrace antibiotik, například fluorochinolonů, trimetoprimu nebo sulfonamidů, které jsou v ČOV obtížně odstraňovány (Gobel *et al.*, 2005; Golet *et al.*,

2002). Multirezistentní kmeny tak mohou být přítomnými antibiotiky selektovány. Vývoj pokročilých technologií čištění odpadních vod, které zajistí redukcí rezistentních a patogenních bakterií, je nezbytný pro omezení šíření těchto kmenů do prostředí.

Recentní práce dokumentují vysokou úroveň kontaminace vody odcházející z ČOV do vodních toků bakteriemi s produkcí ESBL (Amos *et al.*, 2014; Blaak *et al.*, 2015; Ojer-Usoz *et al.*, 2014; Reinthaler *et al.*, 2010). Problematikou ESBL bakterií v odpadních vodách jsme se zabývali na našem pracovišti. Po dobu 45 dní byly odebírány vzorky na odtoku z brněnské komunální ČOV do řeky Svratky (Dolejska *et al.*, 2011b<sup>9</sup>). Enterobakterie s ESBL byly izolovány ve dvou třetinách vzorků. Podobně jako v jiných studiích i v našem souboru dominovala ESBL typu CTX-M-15. Významným výsledkem byl průkaz multirezistentní patogenní klonální linie *E. coli* ST131, ke které náleželo 73 % izolovaných kmenů *E. coli*. Cestou odpadních vod se tedy do prostředí dostávají bakterie, které se vyznačují nejen rezistencí k různým antibiotickým skupinám, ale také zvýšenou patogenitou. Kmeny s patogenním působením ve střevě a rovněž kmeny ExPEC tvoří významný podíl v populaci koliformních bakterií odpadních vod (Dolejska *et al.*, 2011b<sup>9</sup>; Franz *et al.*, 2015).

Šíření rezistentních a patogenních bakterií do vodních toků může být spojeno se vznikem zdravotních rizik pro člověka. Nizozemská studie prokázala ESBL izoláty v rekreačních vodách v blízkosti ČOV (Blaak *et al.*, 2014a). Porovnáním sledovaných fenotypových a genotypových charakteristik byly prokázány identické kmeny v odpadní i povrchové rekreační vodě. Kontaminované povrchové vody mohou být také potenciálním zdrojem rezistentních bakterií pro zvířata. Enterobakterie s ESBL byly prokázány například u vodních ptáků (Guenther *et al.*, 2011). Tomuto tématu se blíže věnuje následující kapitola.

## 7.8 Výskyt ESBL izolátů u volně žijících zvířat

První práce popisující bakterie s ESBL u volně žijících zvířat byla publikovaná v roce 2006 (Costa *et al.*, 2006). V následujících letech aktivní monitoring u různých druhů volně žijících savců a ptáků potvrdilo jejich obecné rozšíření. Souhrnný přehled prací publikovaných do roku 2011, které dokumentují výskyt *E. coli* s produkcí ESBL u volně žijících zvířat nedávno zpracoval tým německých autorů (Guenther *et al.*, 2011). Z této rešerše a dalších aktuálních publikací vyplývá, že ESBL byly u volně žijících zvířat popsány na všech kontinentech s výjimkou Antarktidy (Bonnedahl *et al.*, 2014; Dolejska *et al.*, 2016<sup>30</sup>; Guenther *et al.*, 2011). Nejvíce studií pochází z Evropy (Guenther *et al.*, 2011), nikoli z důvodu vyšší prevalence ESBL producentů v porovnání s ostatními částmi světa, ale díky aktivnímu výzkumu několika evropských týmů.

Spektrum ESBL variant popsaných u volně žijících zvířat prakticky zrcadlí současnou epidemiologii v humánní i veterinární provenienci. Nejčastější ESBL představuje CTX-M, zejména pak varianty CTX-M-1 a CTX-M-15, omezeně také CTX-M-9, CTX-M-14 a CTX-M-32 (Guenther *et al.*, 2011). O původu kmenů rovněž svědčí nález specifických klonálních linií u volně žijících zvířat, které jsou opakovaně prokazovány u hospodářských zvířat a člověka (Guenther *et al.*, 2011; Jamborova *et al.*, 2015<sup>26</sup>).

Enterobakterie produkující ESBL byly izolovány z vodních ptáků (Guenther *et al.*, 2011; Literak *et al.*, 2010a<sup>4</sup>; Stedt *et al.*, 2015; Tausova *et al.*, 2012<sup>10</sup>; Veldman *et al.*, 2013), dále u zástupců skupiny krkavcovitých (Jamborova *et al.*, 2015<sup>26</sup>; Loncaric *et al.*, 2013), dravců (Guenther *et al.*, 2012a; Pinto *et al.*, 2010) a drobných hlodavců (Guenther *et al.*, 2012b; Ho *et al.*, 2015; Literak *et al.*, 2009<sup>2</sup>). Ojediněle byly také zachyceny u vysoké zvěře, divokých prasat, šelem, zajícovitých a ryb (Costa *et al.*, 2006; Literak *et al.*, 2010b<sup>3</sup>; Sousa *et al.*, 2011).

Nejvíce prací se soustředí na vodní ptactvo, u kterého jsou navíc ze všech druhů volně žijících ptáků dokumentovány nejvyšší prevalence ESBL. V některých zemích se pohybují v desítkách procent a významně přesahují čísla popsaná pro člověka a hospodářská zvířata. Například španělská recentní studie prokázala producenty ESBL u 75 % vyšetřených racků (Stedt *et al.*, 2015). Producenti ESBL byly popsány také u racků a jiných druhů vodních ptáků v České republice (Dolejska *et al.*, 2009<sup>1</sup>; Tausova *et al.*, 2012<sup>10</sup>). Pro racky je typická úzká vazba na prostředí ovlivněné lidskou činností a konzumace odpadu na skládkách a v blízkosti farem. Z tohoto pohledu rackové představují vhodný model pro studium šíření rezistentních bakterií do prostředí. Frekventovaný záchyt ESBL u vodních ptáků může poukazovat na fekální kontaminaci povrchových vod odpady z měst a hospodářské produkce.

U vodních ptáků byly identifikovány bakterie s rezistencí ke karbapenemům. Tato antibiotika ze skupiny beta-laktamů jsou výhradně humánními přípravky a slouží jako léky poslední volby při terapii závažných infekcí (Dolejska *et al.*, 2016<sup>30</sup>). Izoláty s touto rezistencí byly prokázány u 40 % racků z kolonie v Novém Jižním Walesu (Austrálie). Rezistence ke karbapenemům byla spojena s přítomností genu skupiny *bla*<sub>IMP-4</sub>. Karbapenemáza IMP-4 je rozšířená u klinických izolátů v Austrálii (AGAR; www.agargroup.org), naopak v ostatních částech světa se vyskytuje zřídka. Výsledky této studie ukazují na humánní původ těchto kmenů, kterými byli rackové kolonizováni pravděpodobně v důsledku přiživování se na odpadcích na blízké skládce komunálního odpadu. Přímý důkaz o přenosu rezistentních bakterií mezi racky a odpadem produkovaným člověkem přináší americká studie, která ve vzorcích z racků a odpadních vod prokázala kmeny *E. coli* se stejným ribotypizačním profilem (Nelson *et al.*, 2008).

Kolonizovaná volně žijící zvířata mohou rezistentní bakterie dále šířit a představovat možné sekundární zdroje pro člověka a potravinová zvířata. V tomto jsou významní zejména migrující ptáci, kteří

mohou rezistentní kmeny přenášet mezi různými státy případně či kontinenty (Hernandez *et al.*, 2010; Hernandez *et al.*, 2013).

## 7.9 Rizikové a úspěšné klony *E. coli* v šíření ESBL

Jedním z hlavních faktorů, který se odráží v narůstající prevalenci Enterobacteriaceae s produkcí ESBL, je expanze multirezistentních klonálních linií (**Obr. 50, Tab. 8**). Některé z těchto úspěšných linií navíc disponují extraintestinálně patogenním charakterem a vyznačují se zoonotickým potenciálem. Významné multirezistentní linie *E. coli* sdružené s CTX-M zahrnují ST10, ST23, ST69, ST131, ST167, ST410, ST617 a další (Ewers *et al.*, 2012; Woodford *et al.*, 2011).

Nejvýznamnější klon v současné době představuje *E. coli* **ST131**. V literatuře je někdy tento klon označován pod plným názvem *E. coli* B2-O25b:H7-ST131, který v sobě vedle sekvenčního typu (ST131) dále zahrnuje fylogenetickou skupinu (B2) a sérotyp (O25b:H7). Je odpovědný za celosvětové šíření beta-laktamázy CTX-M-15, ale byl prokázán i ve spojitosti s dalšími variantami CTX-M enzymů (např. CTX-M-3, -14, -27), jinými skupinami cefalosporináz (CMY-2, SHV-12) a nedávno také s karbapenemázami KPC, NDM a VIM (Accogli *et al.*, 2014; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014). Kromě multirezistentního fenotypu, který mimo jiné zahrnuje rezistenci k fluorochinolonům, se vyznačuje vysokou virulencí spojenou s přítomností genů pro různé virulenní faktory. *E. coli* ST131 je častým původcem infekcí močových cest, bakteriemií a neonatálních sepsí, vyvolává také infekce ran, pneumonie a intraabdominální infekce (Banerjee a Johnson, 2014).

Podobnost restričních profilů genomové DNA *E. coli* ST131 stanovených pulzní gelovou elektroforézou se pohybuje v rozmezí 60–100 %, což ukazuje na vysokou genetickou variabilitu tohoto klonu. Komparativní analýzy rozsáhlých sbírek kmenů potvrdily existenci několika subklonálních linií, které se odlišují profilem antibiotické rezistence a přítomností specifických mutací v základním genomu (Johnson *et al.*, 2013a; Price *et al.*, 2013). Geny rezistence jsou u této linie obvykle nesené multirezistentními IncF plazmidy (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014).

Prevalence ST131 mezi klinickými izoláty *E. coli* je různá v závislosti na geografické oblasti a hostiteli a dosahuje až 30 %. Díky častému výskytu tohoto klonu není překvapující, že je rovněž izolován ze zdravých i nemocných zvířat, především psů a také v potravinách (Albrechtová *et al.*, 2012b<sup>11</sup>; Ewers *et al.*, 2010; Giufre *et al.*, 2012; Schink *et al.*, 2013; Vincent *et al.*, 2010). Šíření ST131 do prostředí a k volně žijícím zvířatům bylo rovněž zdokumentováno (Dolejska *et al.*, 2011b<sup>9</sup>; Jamborova *et al.*, 2015<sup>26</sup>; Vignaroli *et al.*, 2013). V současné době probíhá na našem pracovišti komparativní analýza různých genetických markerů u rozsáhlého souboru izolátů této linie. Výsledky ukazují na cirkulaci identických izolátů v



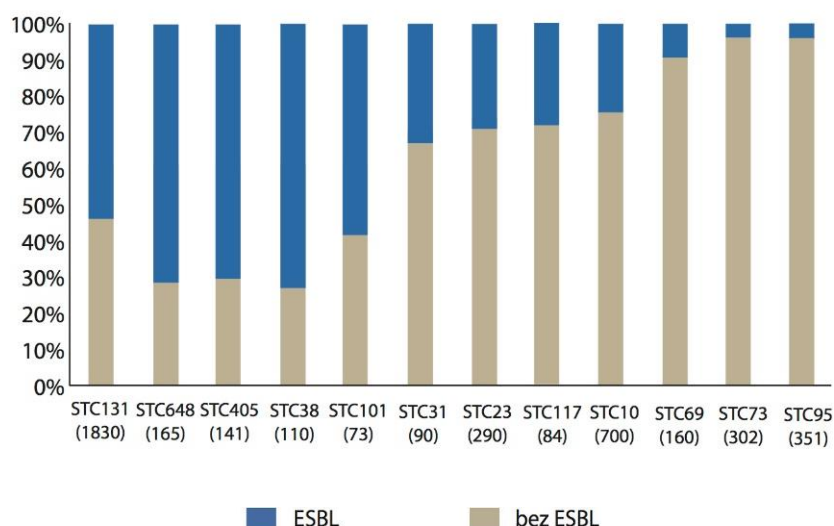
nemocnicích, v prostředí odpadních vod a také u volně žijících živočichů (I. Jamborová *et al.*, VFU Brno, nepublikovaná data).

Faktory, které stojí za úspěchem expanzivního klonu *E. coli* ST131 nebyly doposud objasněny. Zřejmě jde o souhrn vlastností tohoto klonu zahrnující efektivní mezilidský přenos, zvýšenou schopnost kolonizace, perzistenci ve střevě a močových cestách, vyšší virulenci a rozsáhlejší rezistenci k antibiotikům v porovnání s jinými kmeny (Banerjee a Johnson, 2014; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014).

**Tab. 8:** Linie *E. coli* v šíření klinicky významných beta-laktamáz

Klonální komplex (počet)	Beta-laktamáza	Potvrzená přítomnost				Rozšíření	
		Zvířata chovaná ze záliby	Potravinová zvířata	Volně žijící zvířata	Člověk	Zvířata	Člověk
STC131 (n=1013)	CTX-M-3,-9,-14,-15,-27,-32 SHV-5,-7,-12 AmpC (CMY-2) NDM-1	x	x	x	x	globální	globální
STC648 (n=119)	CTX-M-14,-15,-32 AmpC (CMY-2) NDM-1	x	x	x	x	globální	globální
STC405 (n=101)	CTX-M-1,-3,-14,-15 AmpC (CMY-2) NDM-1	x		x	x	Evropa	globální
STC38 (n=83)	CTX-M-1,-9,-14,-15,-27,-32 AmpC (CMY-2) OXA-48 NDM-1	x	x	x	x	Evropa	globální
STC101 (n=50)	CTX-M-1,-14,-15 AmpC (CMY-2) NDM-1	x		x	x	Evropa	Evropa, Asie, Afrika
STC31 (n=30)	CTX-M-14,-15		x		x	Německo	globální
STC23 (n=85)	CTX-M-1,-3,-14,-15 SHV-12,-44 AmpC (CMY-2) NDM-1 TEM-52	x	x	x	x	Evropa	globální
STC117 (n=22)	CTX-M-1,-2,-14,-15 AmpC (CMY-2)	x	x	x	x	Evropa	Evropa, Asie
STC10 (n=227)	CTX-M-1,-2,-14,-15,-27 SHV-5,-12 AmpC (CMY-2) TEM-52	x	x	x	x	globální	globální
STC69 (n=16)	CTX-M-1,-14,-27 AmpC (CMY-2)	x	x	x	x	Evropa	globální
STC95 (n=15)	CTX-M-3,-14,-15				x	-	globální
STC73 (n=11)	CTX-M-14,-15	x	x			Německo	globální

Převzato z Ewers *et al.*, 2012 a doplněno o naše práce (Jamborová *et al.*, 2015<sup>26</sup> a I. Jamborová *et al.*, VFU Brno, nepublikovaná data).

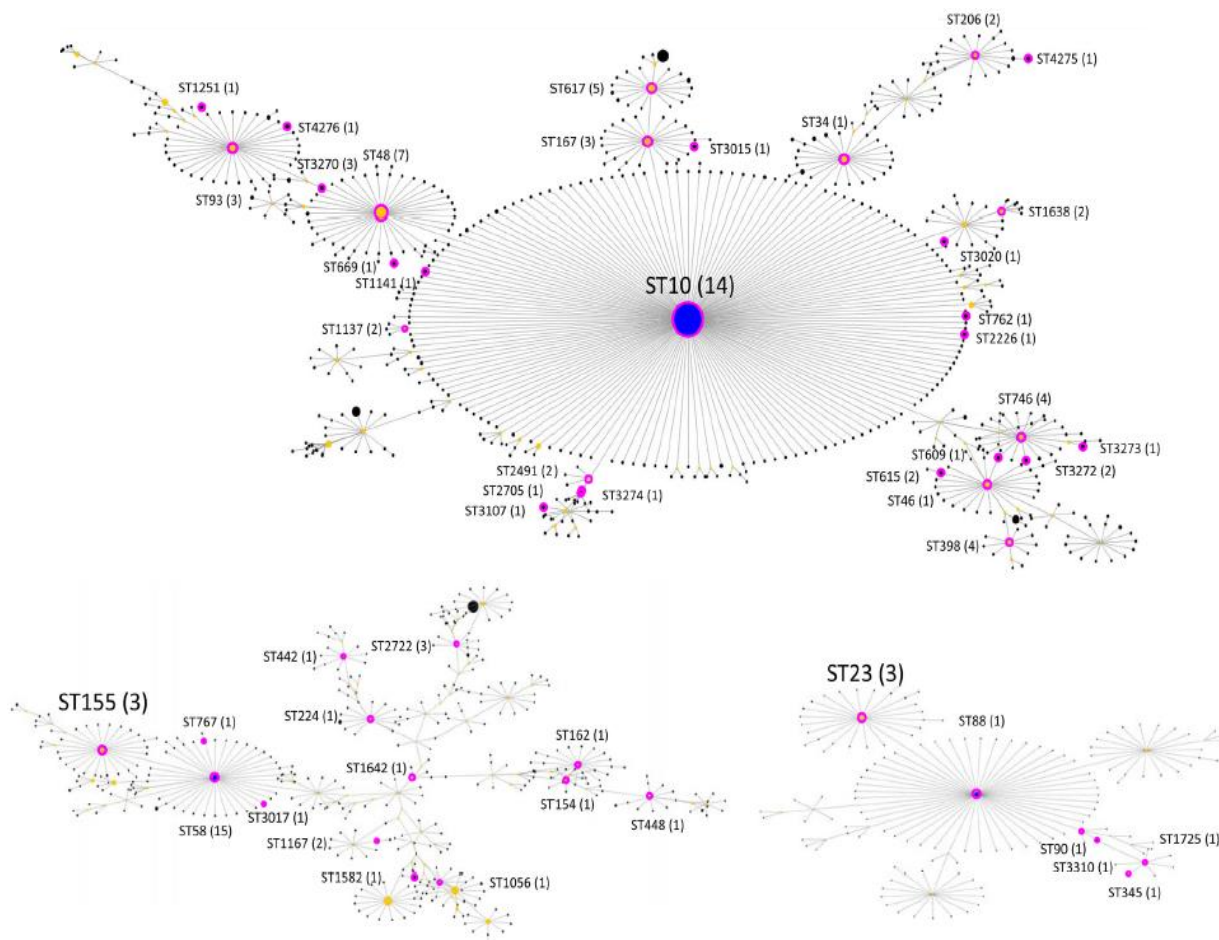


**Obr. 50:** Distribuce širokospektrých beta-laktamáz u významných linií *E. coli*

Upraveno podle Ewers *et al.*, 2012. STC představuje soubor kmenů příbuzných sekvenčních typů definovaný jako klonální komplex. Počty izolátů náležících k danému komplexu jsou uvedeny v závorce. Graf zohledňuje zejména výskyt širokospektrých beta-laktamáz. Některé ST jsou zároveň významnými producenty AmpC beta-laktamáz a karbapenemáz.

Významné linie se zvýšenou schopností kolonizace a perzistence představují multirezistentní ExPEC kmeny **ST405** a **ST648**, které u člověka vyvolávají závažné infekce. Jsou asociovány nejen s CTX-M (CTX-M-1, -15, -32), ale také s AmpC beta-laktamázou CMY-2 a karbapenemázou NDM (Ewers *et al.*, 2012; Hornsey *et al.*, 2011; Tamang *et al.*, 2013). *E. coli* ST648 produkující CTX-M-15 je považována za novou expanzivní klonální linii ze zoonotickým potenciálem, na jejímž šíření se pravděpodobně významně podílí zvířata chovaná ze záliby (Ewers *et al.*, 2014). Tato linie byla prokázána u pacientů v nemocnicích, u hospodářských zvířat (drůbeže a prasat), u psů, koní a volně žijících zvířat (Cortes *et al.*, 2010; Ewers *et al.*, 2014; Guenther *et al.*, 2012a; Zong a Yu, 2010).

*E. coli* **ST10** představuje vysoce heterogenní skupinu komenzálních i patogenních kmenů (EAEC, ETEC, ExPEC). Je dokumentována u lidí z případů komunitních i nozokomiálních infekcí, dále u potravinových zvířat, v potravinách a v prostředí, **Obr. 51** (Jamborova *et al.*, 2015<sup>26</sup>; Manges a Johnson, 2012). ExPEC linie **ST69** je prokazována z infekcí močových cest, ale nachází se také u potravinových zvířat, především drůbeže (Blaak *et al.*, 2014b; Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Manges a Johnson, 2012).



**Obr. 51:** eBURST diagram sekvenčních typů *E. coli* nesoucích cefalosporinázy (AmpC/ESBL) a/nebo plazmidově determinovanou rezistenci k fluorochinolonům z trusu havranů polních v Evropě

Převzato z Jamborova *et al.*, 2015<sup>26</sup>. Diagram dělí kmeny do tří klonálních komplexů (STC10, STC23 a STC155). Sekvenční typy lišící se v jedné alele jsou vzájemně propojeny čarou. Každý ST je reprezentován uzlem. Sekvenční typy identifikované v této studii jsou označeny růžovým kroužkem. Nejpočetnější linii v této studii představovala *E. coli* ST10.

## 7.10 Mobilní genetické elementy v šíření ESBL

Geny kódující ESBL jsou sdruženy s inzerčními sekvencemi, integrony, transpozony případně dalšími MGE. V této podobě jsou pak začleněny buď do bakteriálního chromozomu nebo jsou nesený konjugativními plazmidy. Asociace s MGE významně přispívá k šíření *bla* genů v bakteriálních populacích a utváří charakteristický obraz současné epidemiologie producentů ESBL. V následujícím textu jsou představeny nejvýznamnější MGE v šíření ESBL, přičemž pozornost je soustředěna především na ty, které mobilizují gen beta-laktamázy CTX-M. Text je doplněn grafickým znázorněním genetického kontextu dalších ESBL genů vedle *bla*<sub>CTX-M</sub> (**Obr. 55**). Pro úplnost jsou znázorněny i struktury nesoucí jiné skupiny klinicky významných beta-laktamáz (**Obr. 56–58**).

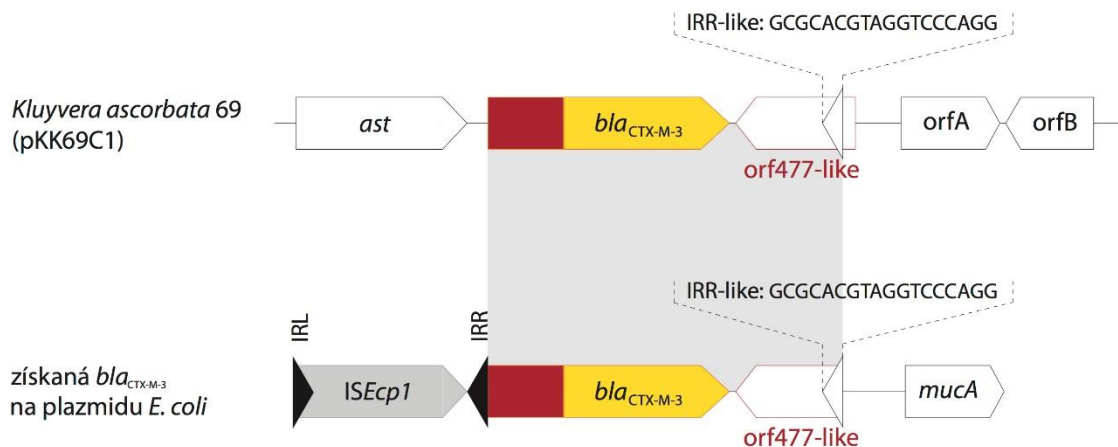
### 7.10.1 *ISEcp1* v šíření ESBL

Pro *bla*<sub>CTX-M</sub> geny různých sekvenčních variant je charakteristické jejich sdružení s inzerčními sekvencemi *ISEcp1*. Tato sekvence byla nalezena v souvislosti s *bla*<sub>CTX-M</sub> podskupin 1, 2, 25 a 9 (Canton *et al.*, 2012b; Zhao a Hu, 2013). Podílí se také na mobilizaci genů spojených s jinými mechanizmy rezistence, například s AmpC beta-laktamázi nebo PMQR (Cattoir *et al.*, 2008a; Partridge, 2011). *ISEcp1* přenáší sekvence lokalizované za svým 3' koncem a zároveň poskytuje přilehlému genu protomor a tím zvyšuje jeho expresi (Canton *et al.*, 2012b).

#### 7.10.1.1 Struktura modulu *ISEcp1-bla*<sub>CTX-M</sub>

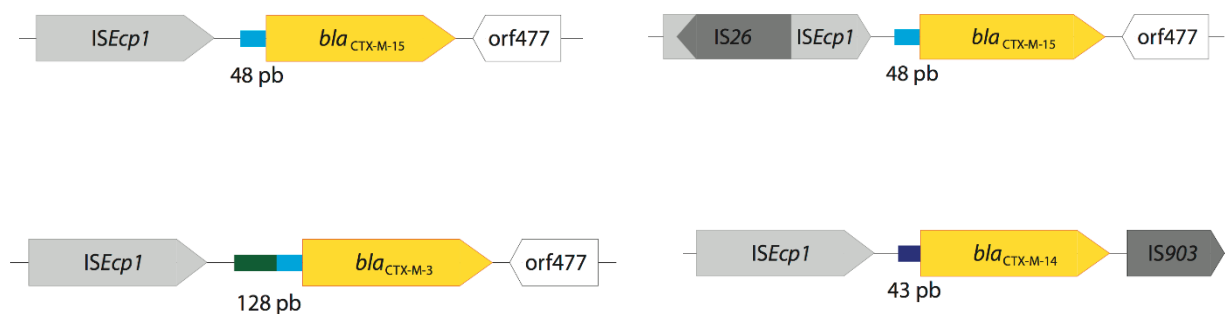
*ISEcp1* náleží do rodiny IS1380, obsahuje gen kódující transponázu tvořenou 420 aminokyselinovými zbytky a dvě nedokonalé obrácené repetice. Inzerční sekvence je v modulu *ISEcp1-bla*<sub>CTX-M</sub> u klinických izolátů následována krátkou oblastí označovanou jako „spacer“. Na základě vysoké sekvenční homologie této oblasti s genetickým kontextem chromozomálních genů *bla*<sub>klu</sub> u *Kluyvera* spp. se předpokládá, že sekvence „spaceru“ byla přenesena spolu s genem pro beta-laktamázu z chromozomu rezervoárových bakterií. Sekvence „spaceru“ vykazují v rámci CTX-M podskupiny vysokou sekvenční homologii, což může ukazovat na mobilizaci genu z rezervoárových bakterií jedinou transpoziční událostí (Canton *et al.*, 2012b). Délka sekvence významně ovlivňuje sílu exprese a tím i hladinu rezistence k cefalosporinům (Ma *et al.*, 2011). V případě *bla*<sub>CTX-M</sub> podskupiny 1 sekvence dosahuje velikosti 48–128 bp, u ostatních podskupin se pohybuje v rozmezí 34 až 52 bp.

Při 3' konci platformy *ISEcp1-bla*<sub>CTX-M</sub> se obvykle nachází orf477, IS903 nebo příbuzné elementy. Gen orf477 byl identifikován v okolí *bla*<sub>CTX-M</sub> na chromozomu *Kluyvera* spp., dá se tedy předpokládat, že byl z rezervoárových druhů mobilizován spolu s genem pro vlastní beta-laktamázu, **Obr. 51** (Zhao a Hu, 2013). Sekvence *ISEcp1* může být přerušena vnořením jiných inzerčních sekvencí (IS1, IS10, ISCR1, IS26), které ovlivňují schopnost mobilizace modulu *ISEcp1-bla*<sub>CTX-M</sub>. Nejčastěji je popisována transpozice IS26, která probíhá do různých oblastí *ISEcp1* sekvence. Příklady struktur okolí genů *bla*<sub>CTX-M</sub> sdružených s *ISEcp1* jsou uvedeny na **Obr. 52**.



**Obr. 51:** Kontext genu  $bla_{\text{CTX-M-3}}$  klinických izolátů a srovnání s chromozomální variantou *Kluyvera* spp.

Vytvořeno podle Rodríguez *et al.*, 2004. Okolí genu  $bla_{\text{CTX-M-3}}$  klinických izolátů vykazuje vysokou úroveň podobnosti s genetickým okolím rezervoárových druhů. Homologická oblast (vyznačená šedým stínováním) zahrnuje „spacer“ (červená), gen  $bla_{\text{CTX-M-3}}$  a část *orf477* včetně alternativní obrácené repetice (IRR-like). Tato repetice může být během transpozice chybně rozpoznávána *ISEcp1*, což vede k mobilizaci celého *ISEcp1-bla\_{\text{CTX-M}}* modulu. Repetice je obvykle zakončena guanosinem, který pravděpodobně hraje důležitou úlohu v procesu transpozice.



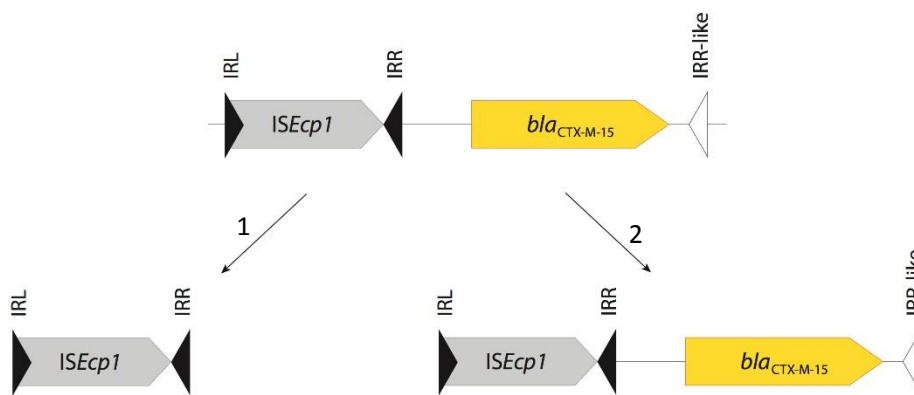
**Obr. 52:** Struktura okolí  $bla_{\text{CTX-M}}$  genů sdružených s *ISEcp1*

Vytvořeno podle Canton *et al.*, 2012. Obrácené a přímé repetice nejsou ve struktuře znázorněny. Barevný obdelník před  $bla_{\text{CTX-M}}$  označuje sekvenci „spaceru.“

### 7.10.1.2 *ISEcp1* v mobilizaci a expresi genu $bla_{\text{CTX-M}}$

*ISEcp1* sdružená s genem  $bla_{\text{CTX-M}}$  zajišťuje dvojí funkci, jednak expresi genu a dále jeho mobilizaci. Tato podvojná funkce je jedním z faktorů úspěšného šíření beta-laktamázy CTX-M. Gen  $bla_{\text{CTX-M}}$  postrádá silný promotor a pro vlastní expresi využívá promotoru *ISEcp1*. Rezervoárové bakterie rodu *Kluyvera* tuto inzerční sekvenci v okolí genu  $bla_{\text{Klu}}$  postrádají. Hladina exprese je tedy u nich nízká a neprojeví se

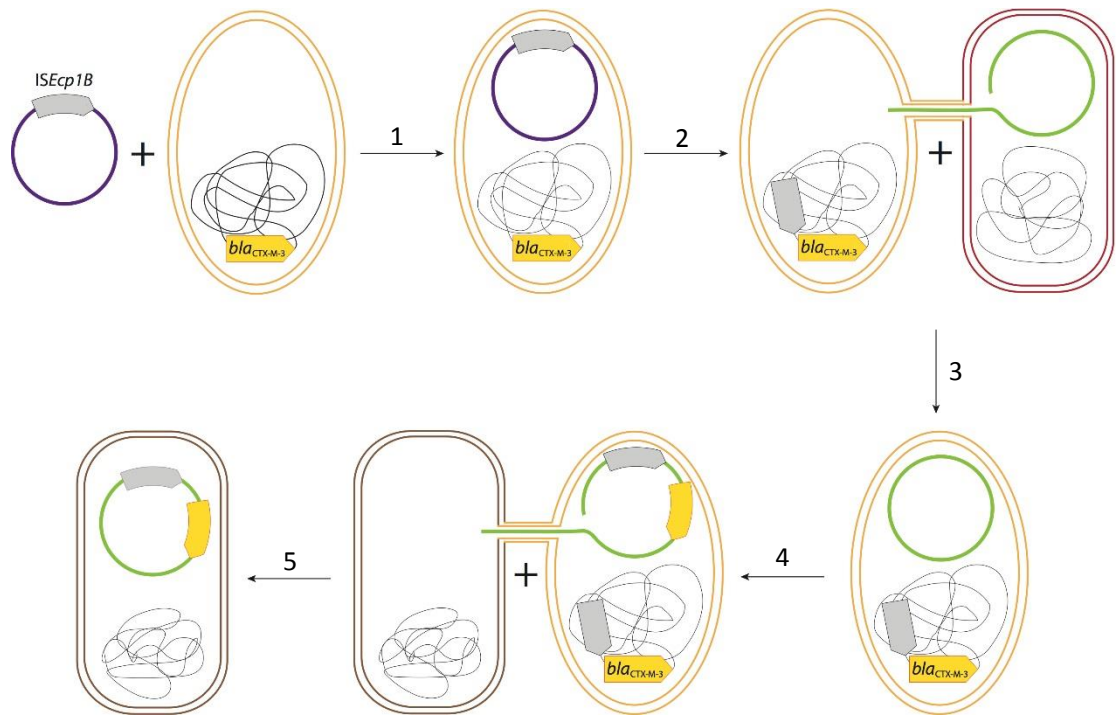
fenotypem rezistence k cefalosporinům. Druhou funkcí, kterou *ISEcp1* zajišťuje, je pohyb genu *bla*<sub>CTX-M</sub> mezi genofory. Charakteristická struktura modulu *ISEcp1-bla*<sub>CTX-M</sub> umožňuje dvojitý typ přenosu, který je představen na **Obr. 53**. Během procesu transpozice rozpoznává transponáza obrácené repetice (IRL a IRR) ohraničující *ISEcp1* a inzerční sekvenční je přenášena z donorového místa do místa cílového jako samostatná jednotka. V důsledku chybnému rozpoznání alternativních pravých obrácených repetit (IRR-like) lokalizovaných v okolí sdružených genů nastává nedokonalá transpozice celé jednotky, v tomto případě tedy i genu *bla*<sub>CTX-M</sub>. Alternativní IRR byly identifikovány i v okolí chromozomálních genů *bla*<sub>klu</sub> *Kluyvera* spp. a s nejvyšší pravděpodobností tak hrály zásadní úlohu v mobilizaci genu z rezervoárových bakterií (Canton *et al.*, 2012b; Lartigue *et al.*, 2008).



**Obr. 53:** Transpozice inzerční sekvenční nesprávným rozpoznáním pravé obrácené repetice vedoucí k přenosu přilehlého genu rezistence

IRL, levá obrácená repetice; IRR, pravá obrácená repetice; IRR-like, alternativní obrácená repetice pravá vykazuje určitou míru sekvenční homologie s IRR; (1) Transponáza rozpoznává obrácené repetice ohraničující inzerční sekvenční (IRL a IRR) a přenáší se pouze oblast inzerční sekvenční. (2) Transponáza chybně rozpoznává alternativní IRR (IRR-like) a přenáší kromě vlastní inzerční sekvenční i přilehlý gen.

Proces mobilizace genu *bla*<sub>CTX-M</sub> zprostředkovaný *ISEcp1* z chromozomu rezervoárových bakterií na plazmid klinických izolátů se podařilo prokázat v laboratorních podmínkách (**Obr. 54**). Zároveň bylo zjištěno, že mobilizace *bla*<sub>CTX-M</sub> genu prostřednictvím *ISEcp1* je indukována stresovými faktory, kterými může být zvýšená teplota nebo účinkem některých antibiotik, například cefalosporinů. Na základě těchto výsledků je spekulováno, že na šíření *bla*<sub>CTX-M</sub> by mohlo kromě rostoucí spotřeby antibiotik mít také vliv globální oteplování (Lartigue *et al.*, 2006; Nordmann *et al.*, 2008).



**Obr. 54:** Mobilizace genu  $bla_{CTX-M-2}$  z chromozomu *Kluyvera ascorbata* prostřednictvím *ISEcp1B*

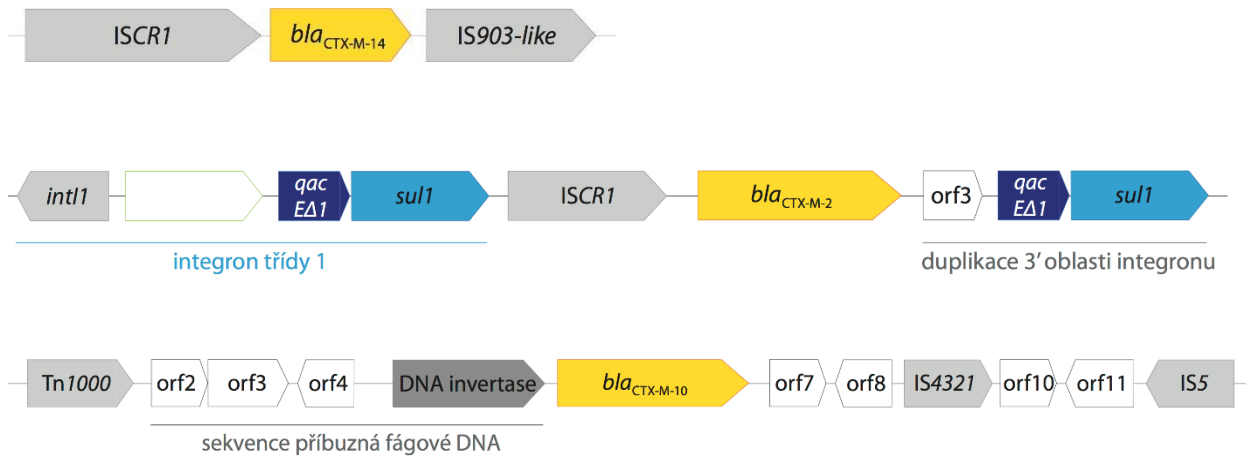
Schéma znázorňuje kroky experimentálního přenosu genu popsané v publikaci autorů Lartigue *et al.*, 2006. (1) Přenos plazmidového vektoru s *ISEcp1B* (šedá šipka) elektroporací do buněk *K. ascorbata* nesoucích  $bla_{CTX-M-2}$  na chromozomu (žlutá šipka). (2) Transpozice *ISEcp1B* před  $bla_{CTX-M-2}$  vedoucí k nárůstu exprese *bla* genu. Buňky obsahující transponovanou jednotku byly selektovány na kulturační půdě s přidavkem cefalosporinu (cefotaximu). (3) Přenos konjugativního plazmidu do buněk *K. ascorbata*. (4) Transpozice jednotky *ISEcp1B-bla\_{CTX-M-2}* na konjugativní plazmid indukovaná cefotaximem nebo teplotou 40°C. (5) Přenos plazmidu nesoucího jednotku *ISEcp1B-bla\_{CTX-M-2}* konjugací do recipientních buněk *E. coli*.

### 7.10.2 Další mobilní elementy sdružené s ESBL

Druhou významnou inzerční sekvencí mobilizující *bla* geny je *ISCR1*. Byla popsána především ve spojitosti s  $bla_{CTX-M}$  podskupin 2 a 9 (Zhao a Hu, 2013). Modul *ISCR1-bla\_{CTX-M}* se obvykle nachází mezi sekvencí integronů třídy 1 a duplikovanou 3' oblastí integronu tvořenou  $\Delta orf3$  a  $qac\Delta 1/sul1$  (Obr. 55). Gen  $bla_{CTX-M}$  v toto případě netvoří klasickou genovou kazetu integronu. Podobně jako *ISEcp1* se i *ISCR1* účastní mobilizace a exprese sdružených genů a je odpovědná za přenos  $bla_{CTX-M}$  genů z chromozomu rezervoárových bakterií. Vnoření jednotky do integronu proběhlo pravděpodobně procesem homologní rekombinace mezi dvěma úseky DNA sdruženými s *ISCR1*. Další IS identifikované v okolí  $bla_{CTX-M}$  zahrnují například *IS1*, *IS5*, *IS10*, *IS26*, *IS50A*, *IS1294*, *IS1326*, *IS1300*, *IS4321* a *IS6100* (Zhao a Hu, 2013).

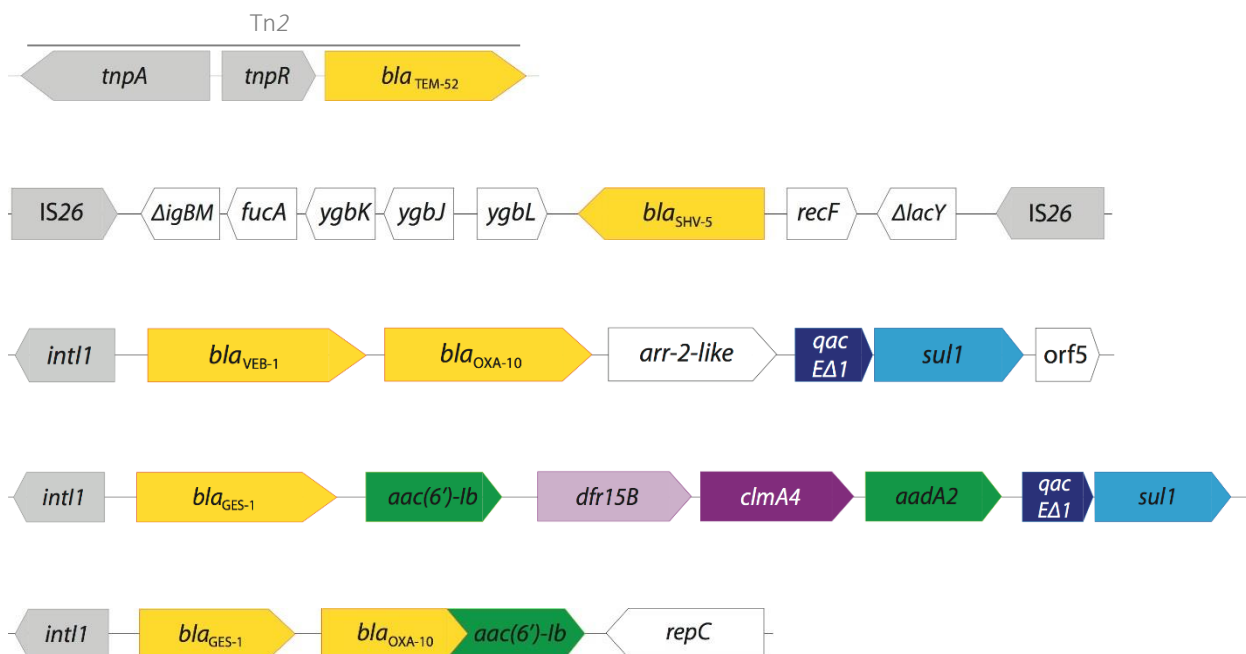
Na mobilizaci genů se mohou podílet bakteriofágy (Colomer-Lluch *et al.*, 2011b; Oliver *et al.*, 2005). Na 5' konci genu  $bla_{CTX-M-10}$  byla identifikována oblast sekvence bakteriofága obsahující gen pro DNA invertázu, která se účastní procesu mobilizace (Obr. 55). Charakteristická struktura blízkého okolí genu  $bla_{CTX-M}$  ukazuje na jeho přenos z rezervoárové bakterie *K. cryocrescens* transdukci (Oliver *et al.*, 2001).

Kódující geny širokospektrých beta-laktamáz typu TEM, například TEM-52, jsou obvykle neseny transpozony Tn3 rodiny (**Obr. 55**). Do transpozonů se mohou integrovat také *bla*<sub>CTX-M</sub> geny sdružené s inzerčními sekvencemi (Partridge *et al.*, 2011; Zong *et al.*, 2015).



**Obr. 55:** *ISCR1* a sekvence odvozené od bakteriofágů sdružené s *bla*<sub>CTX-M</sub>

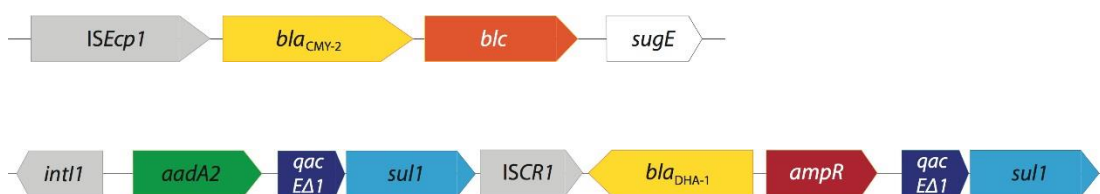
Vytvořeno podle Canton *et al.*, 2012b; Smet *et al.*, 2010a. Obrácené a přímé repetice nejsou ve struktuře znázorněny.



**Obr. 56:** Příklady genetického kontextu další skupin ESBL

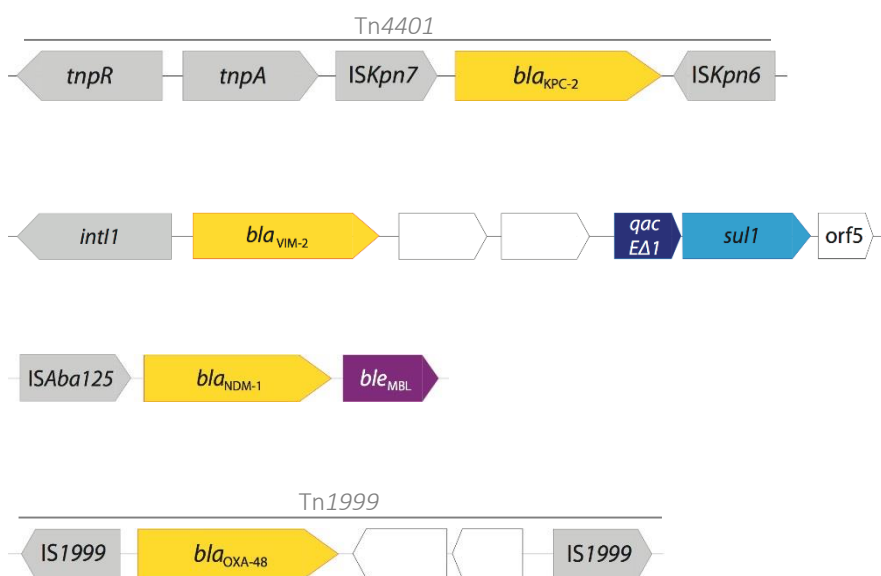
Vytvořeno podle Canton *et al.*, 2012b; Smet *et al.*, 2010a. Obrácené a přímé repetice nejsou znázorněny. *bla*<sub>TEM-52</sub> je součástí transpozonů rodiny Tn3; geny *bla*<sub>SHV</sub> rodiny jsou obvykle neseny kompozitními transpozony ohraničenými na obou stranách *IS26*. Geny pro jiné skupiny ESBL (*VEB-1*, *GES-1*, *OXA-10*) se vyskytují ve fromě genové kazety integronů.





**Obr. 57:** Příklady kontextu genů AmpC beta-laktamáz sdružených s inzerčními sekvencemi

Vytvořeno podle Canton *et al.*, 2012b; Smet *et al.*, 2010a. Obrácené a přímé repetice nejsou ve struktuře znázorněny. Beta-laktáza DHA-1 je sdružena s ISCR1 ve struktuře blízké okolí genů *bla*<sub>CTX-M</sub> skupin 2 a 9. Modul ISCR1-*bla*<sub>DHA-1</sub> je včleněn mezi integron třídy 1 a duplikovanou 3' oblast integronu. Rozšířená beta-laktamáza skupiny CMY-2 je sdružena s ISEcp1.



**Obr. 58:** Příklady kontextu genů klinicky významných karbapenemáz

Vytvořeno podle Nordmann *et al.*, 2012a. Obrácené a přímé repetice nejsou ve struktuře znázorněny. Geny karbapenemáz KPC a OXA-48 jsou součástí kompozitních transpozonů. Geny metallo-beta-laktamáz NDM jsou sdruženy s ISAbal25 a genem rezistence k bleomycinu. Jiné rodiny metallo-beta-laktamáz (VIM a IMP) jsou genovými kazetami integronů třídy 1, sporadicky také třídy 3.

### 7.10.3 Plazmidy v šíření ESBL

V šíření ESBL hrají významnou roli epidemické plazmidy z různých inkompatibilních skupin. Jsou dokumentovány celosvětově u různých druhů čeledi Enterobacteriaceae, zejména *E. coli*, *Salmonella* spp. a *Klebsiella* spp. ze zvířat, člověka a prostředí. Nejvýznamnější plazmidy v šíření ESBL (CTX-M, TEM, SHV), AmpC beta-laktamáz (CMY-2) a karbapenemáz náleží do inkompatibilních skupin F, A/C, N, HI2, I1, K a L/M. Kromě genů beta-laktamáz obvykle nesou také geny rezistence k antibiotikům z jiných funkčních tříd, které podporují jejich perzistenci v prostředí se selekčním tlakem širokého spektra antibiotik. Některé třídy rezistentních plazmidů disponují nástroji pro proliferaci v hostitelských bakteriálních

buňkách, jak bylo popsáno v kapitole 6.5.8.10. Jsou sdruženy s faktory virulence, geny pro stabilní propagaci plazmidu při buněčném dělení a dalšími faktory, které zvyšují celkové fitness bakteriálního hostitele (Carattoli, 2009, 2013). Následující odstavce blíže charakterizují plazmidy vybraných inkompatibilních skupin, které se významně podílí na šíření ESBL v enterobakteriálních populacích.

### 7.10.3.1 Virulentní plazmidy rodiny IncF v šíření CTX-M-15

Plazmidy skupiny IncF patří mezi nejlépe charakterizované plazmidy. Jsou nízkokopiové a replikují se v poměrně úzkém spektru hostitelů limitovaném na čeleď Enterobacteriaceae (Osborn *et al.*, 2000). Patří mezi nejčastěji detekované plazmidy u humánních i veterinárních klinických izolátů této skupiny bakterií včetně patogenních kmenů APEC a UPEC (Carattoli, 2008; Carattoli, 2009; Johnson *et al.*, 2012b; Johnson *et al.*, 2007; Woodford *et al.*, 2009). Jejich dobrou adaptaci na enterobakterie podporuje také skutečnost, že byly frekventovaně detekovány ve sbírkách z předantibiotické éry (Datta *et al.*, 1980). V současnosti představují nejvýznamnější plazmidy v celosvětovém šíření CTX-M-15 (Carattoli, 2009, 2013).

Na rozdíl od plazmidů jiných inkompatibilních skupin se IncF vyznačují vysokou variabilitou základní kostry. Mají proměnlivou velikost (50-200 kb), nesou různý počet replikonů a mohou se rovněž lišit mírou konjugačních schopností. Vysoká proměnlivost a rychlá evoluce stojí za úspěchem těchto plazmidů. Zvyšují fitness bakteriálního hostitele, kterému poskytují různé virulenční faktory (bakteriociny, siderofory, cytotoxiny, aderenční faktory) a multirezistentní fenotyp (Osborn *et al.*, 2000). Disponují adičními systémy pro stabilní udržování v hostitelské buňce (Woodford *et al.*, 2009). Bylo prokázáno, že IncF plazmidy asociované s CTX-M obsahují vyšší počet těchto systémů než ty, které nesou jiné typy širokospektrých beta-laktamáz. Například na plazmidech nesoucích geny *bla*<sub>CTX-M-15</sub> nebo *bla*<sub>CTX-M-9</sub> bylo identifikováno až 5 různých systémů (Mnif *et al.*, 2010). Tato charakteristická asociace s adičními systémy je jedním z dalších faktorů určujících úspěch CTX-M beta-laktamáz.

Plazmidy IncF rodiny sdružené s genem *bla*<sub>CTX-M-15</sub> obvykle obsahují replikon FII, mohou však nést další příbuzné replikony FIA nebo FIB a vykazovat multireplikonový charakter (Villa *et al.*, 2010). Gen kódující CTX-M-15 je součástí multirezistentní oblasti, která nese geny pro úzkospektré beta-laktamázy OXA-1 a TEM-1 a determinanty rezistence k fluorochinolonům a aminoglykozidům, zejména *aac(6')-Ib-cr* (Albrechtova *et al.*, 2012b<sup>11</sup>; Dolejska *et al.*, 2013a<sup>17</sup>; Woodford *et al.*, 2009). Další mechanismy rezistence k beta-laktamům sdružené s IncF zahrnují jiné varianty CTX-M (-1, -2, -3, -9, -14, -24, -27), beta-laktamázy SHV (-2, -5, -12) a AmpC (CMY-2, DHA-1) nebo karbapenemázu KPC-2. Častá je také přítomnost genů *qnr*, *qepA* pro rezistenci k fluorochinolonům a *armA* a *rmtB* podmiňující rezistenci k aminoglykozidům (Carattoli, 2009, 2013).

### 7.10.3.2 Multirezistentní IncA/C<sub>2</sub> plazmidy v šíření beta-laktamáz

Tato skupina plazmidů se dostala do popředí zájmu až v posledních letech díky šíření klinicky významných mechanismů rezistence k cefalosporinům a karbapenemům. IncA/C jsou velké (140–200 kb), konjugativní a nízkokopiové plazmidy s širokým spektrem hostitelů, které využívají mechanismus theta replikace kontrolovaný iterony. Byly identifikovány u různých druhů gramnegativních bakterií, zejména *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Aeromonas hydrophila* a *Pseudomonas* spp. ze zvířat, člověka i prostředí (Harmer a Hall, 2015). Kombinace vlastností těchto plazmidů zahrnující široké spektrum hostitelů, multirezistentní fenotyp a efektivní přenos konjugací stojí za jejich současným úspěchem.

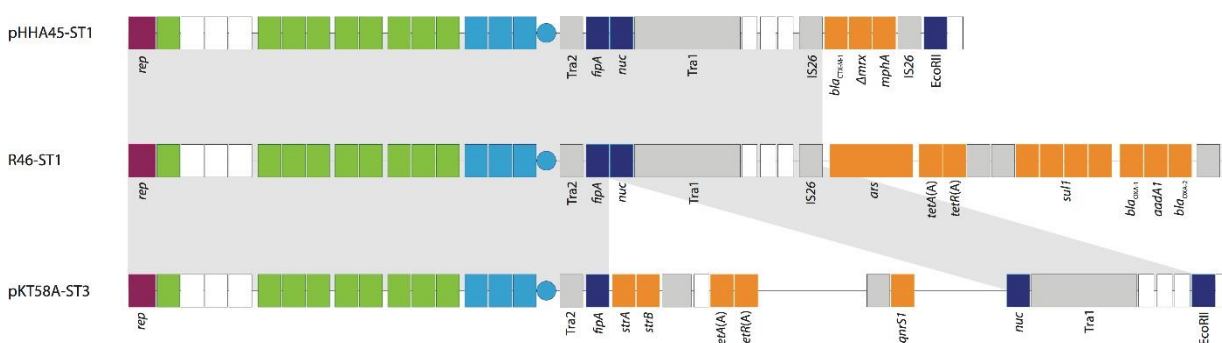
Uspořádání genů základní kostry IncA/C plazmidů je velice stabilní a celkově se tyto plazmidy vyznačují vysokou homologií primární nukleotidové sekvence (99 %). Analýza genu *repA* pro replikaci plazmidu prokázala existenci dvou linií A/C<sub>1</sub> a A/C<sub>2</sub>, k jejichž diverzifikaci došlo nejspíše před stovkami tisíc let (Carattoli *et al.*, 2006; Harmer a Hall, 2015). V kostře IncA/C plazmidů, která obsahuje geny pro zajištění základních funkcí, byly identifikovány přinejmenším tři preferenční cílová místa pro začleňování inzerčních sekvencí, tranpozonů, genů rezistence k antibiotikům a těžkým kovům, zejména ke rtuti (Harmer a Hall, 2015; McIntosh *et al.*, 2008).

V současné epidemiologii je významná linie A/C<sub>2</sub>, která je rozdělována do dvou podskupin na základě charakteristických znaků v konzervativní oblasti plazmidu (Harmer a Hall, 2015). IncA/C plazmidům je věnována pozornost díky jejich asociaci s AmpC beta-laktamázi skupiny CMY-2. Kódující gen *bla*<sub>CMY-2</sub> je vnořen do specifického místa v Tra oblasti plazmidu ve formě platformy *ISEcp1-bla*<sub>CMY-2</sub>-*blc-sugE* (Fernandez-Alarcon *et al.*, 2011). IncA/C plazmidy nesoucí *bla*<sub>CMY-2</sub> jsou kosmopolitně rozšířeny u *E. coli* a salmonel z hospodářských zvířat, v prostředí a jsou popisovány z případů humánních nozokomiálních infekcí (Bortolaia *et al.*, 2014; Carattoli, 2008; Carattoli, 2009; Guo *et al.*, 2014; Hopkins *et al.*, 2006; Mataseje *et al.*, 2010; Mulvey *et al.*, 2009).

IncA/C plazmidy se podílí na přenosu ESBL (CTX-M-2, CTX-M-3) a některých karbapenemáz (Carattoli, 2009; Randall *et al.*, 2011). Hrály také významnou úlohu v celosvětovém rozšíření metalo-beta-laktamázy NDM-1 mezi klinickými izoláty *K. pneumoniae* a *E. coli* (Carattoli, 2013; Dortet *et al.*, 2014b; Walsh *et al.*, 2011). Pro Austrálii je typická vazba genů karbapenemázy IMP-4 rodiny na plazmidy této skupiny (Dolejska *et al.*, 2016<sup>30</sup>; Espedido *et al.*, 2008). V naší recentní práci byla prokázána spojitost IncA/C plazmidů s šířením karbapenemáz VIM u klinických izolátů *K. pneumoniae* v Řecku (Papagiannitsis *et al.*, 2016<sup>32</sup>).

### 7.10.3.3 IncN s širokým spektrem hostitelů v šíření CTX-M-1

IncN plazmidy patří mezi nejrozšířenější skupiny rezistentních plazmidů u Enterobacteriaceae humánního i veterinárního původu, což souvisí jednak s jejich schopností se replikovat v širokém spektru hostitelů a také s vysokou frekvencí konjugativního přenosu. Podobně jako ostatní skupiny epidemických plazmidů také IncN disponují systémy, které zajišťují jejich stabilní udržování v hostitelské buňce. V základní kostře plazmidů byla nalezena dvě cílová místa pro integraci přenosných genetických elementů a genů rezistence, která se vyskytují mezi geny *fipA* a *nuc* a dale v blízkém okolí genů pro restriční modifikační systém EcoRII, **Obr. 59** (Carattoli *et al.*, 2010; Dolejska *et al.*, 2013b<sup>14</sup>; Eikmeyer *et al.*, 2012).

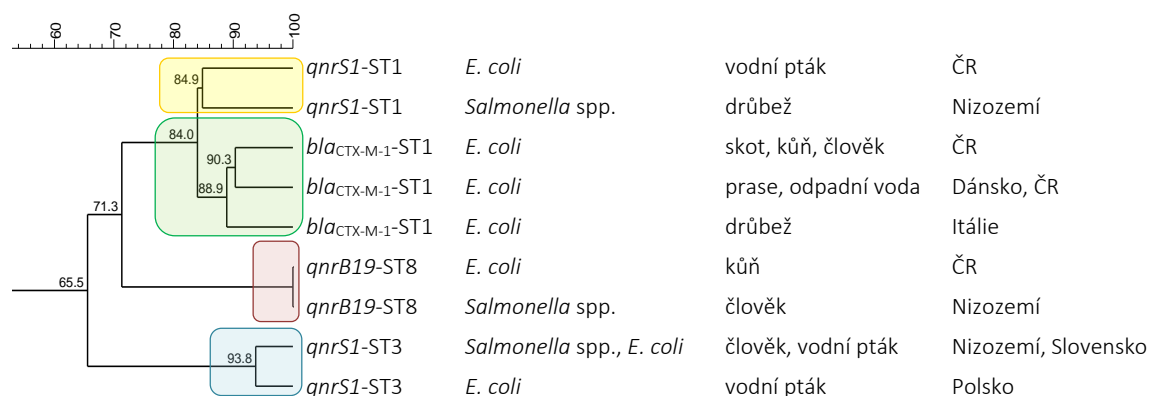


**Obr. 59:** Schematické znázornění struktury vybraných IncN plazmidů

Vytvořeno podle Dolejska *et al.*, 2013b<sup>14</sup>. Plazmid pHHA45 (GenBank, JX065630) byl izolován z *E. coli* v trusu prasat v Dánsku. Představuje epidemický IncN plazmid ST1 sdružený s *bla*<sub>CTX-M-1</sub>. R46 (AY046276) je referenčním IncN plazmidem. Plazmid pKT58A byl identifikován u *E. coli* z vodního ptáka v Polsku. Je epidemickým IncN plazmidem podskupiny ST3 sdružený s *qnrS1*. Charakteristické oblasti kostry společné pro IncN plazmidy jsou označeny barevně podle následujícího klíče: fialová – gen *rep* pro replikaci plazmidu; zelená – geny zajišťující odolnost plazmidu vůči restričním a modifikačním systémům buňky; světle modrá – geny pro stabilní propagaci plazmidu; oranžová – geny pro přenos plazmidu konjugací. Mobilní genetické elementy (inzerční sekvence, transpozony, integrony) jsou označeny šedě. Modrý kruh značí místo počátku přenosu plazmidu, *oriT*. Místa četné integrace genů rezistence do kostry IncN plazmidu (*fipA*, *nuc* a EcoRII) jsou označena tmavě modře. Oranžovou barvou jsou vyznačeny geny rezistence k antibiotikům, těžkým kovům a dezinfekčním látkám. Šedě stínování mezi jednotlivými plazmidy vyjadřuje homologické oblasti plazmidů s podobností > 99 %.

IncN plazmidy jsou sdruženy s některými variantami ESBL, AmpC beta-laktamázi a karbapenemázami, geny pro rezistenci k chinolonům, aminoglykozidům, tetracyklinu, sulfonamidům a těžkým kovům. Potravinová zvířata jsou považována za rezervoár těchto plazmidů (Carattoli, 2009, 2011; Johnson *et al.*, 2007). Jejich vysoká prevalence byla zjištěna vyšetřením běžné střevní mikroflóry zdravých kuřat (Johnson *et al.*, 2007). IncN plazmidy se významně podílí na šíření beta-laktamázy CTX-M-1 v populaci *E. coli* a *Salmonella enterica* u lidí i zvířat v řadě evropských zemí (Bortolaia *et al.*, 2010a; Bortolaia *et al.*, 2010b; Dolejska *et al.*, 2013b<sup>14</sup>; Moodley a Guardabassi, 2009). Studie v Dánsku prokázala identické IncN plazmidy nesoucí gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub> u komenzálních izolátů *E. coli* ve střevní mikroflóře prasat a pracovníků této farmy (Moodley a Guardabassi, 2009).

V roce 2011 byla publikována metoda pMLST („plasmid multilocus sequencing“) pro subtypizaci IncN založená na multilokusové sekvenční analýze tří genů přítomných v základní kostře plazmidu (Garcia-Fernandez *et al.*, 2011). Zároveň byla vytvořena veřejně dostupná databáze “Plasmid MLST Database”, která shromažďuje podrobné informace o plazmidech charakterizovaných touto metodou (<http://pubmlst.org/plasmid/>). V současné době je v ní evidováno 16 různých sekvenčních typů IncN plazmidů (ke dni 20. 2. 2016). Využití této metody pro typizaci rozsáhlých sbírek IncN plazmidů umožnila definovat specifické linie v rámci této plazmidové rodiny sdružené s určitými mechanismy rezistence (Obr. 60). Linie ST1 je v databázi zastoupena nejčastěji a je úzce vázaná na gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub>. Byla identifikována u izolátů *E. coli* a *Salmonella* spp. z hospodářských zvířat, zvířat chovaných ze záliby, člověka i prostředí v Evropě (Dolejska *et al.*, 2013b<sup>14</sup>; Dobiasova *et al.*, 2013<sup>20</sup>). Komparativní analýza plazmidů IncN-ST1 nesoucích *bla*<sub>CTX-M-1</sub> prokázala vysokou homogenitu této linie (Dolejska *et al.*, 2013b<sup>14</sup>). Geny PMQR (zejména *qnrS1*) jsou u *E. coli* a salmonel v Evropě vázány především na IncN-ST3 plazmidy, jejichž kompletní nukleotidová sekvence byla nedávno popsána (Dolejska *et al.*, 2013b<sup>14</sup>). Třetí nejvýznamnější linií je IncN-ST11 odpovědná za lokální šíření karbapenemázy VIM-1 mezi humánními klinickými izoláty v Řecku (Garcia-Fernandez *et al.*, 2011; Giakkoupi *et al.*, 2003).



**Obr. 60:** Dominantní linie IncN plazmidů v šíření genů CTX-M-1 a Qnr

Převzato z Dolejska *et al.*, 2013b<sup>14</sup>. Dendrogram sestaven na základě enzymatických restrikčních profilů plazmidové DNA.

#### 7.10.3.4 Multirezistentní IncHI plazmidy

IncHI jsou konjugativní plazmidy čeledi Enterobacteriaceae a dalších zástupců gramnegativních bakterií. Jsou charakteristické svou velikostí dosahující více než 150 kb, a vysokou plasticitou. Ačkoliv by replikace tak obrovského genetického aparátu IncHI plazmidů měla být pro buňku energetickou zátěží, bylo prokázáno, že naopak zvyšují fitness bakteriální buňky a udržují se v prostředí bez antibiotik (Dahlberg a Chao, 2003; Dionisio *et al.*, 2005).

Konjugační systém IncHI plazmidů je termosenzitivní a optimální teplota pro jejich konjugační přenos se pohybuje v rozmezí 22–30°C (Taylor a Levine, 1980). Předpokládá se tedy, že prostředí (zejména voda) hraje významnou úlohu v jejich šíření. Při teplotě 37°C může konjugační přenos probíhat, nicméně frekvence se mnohonásobně snižuje. Teplota neovlivňuje vlastní morfologii H pilu, ale významně inhibuje tvorbu konjugačního páru (Garcia *et al.*, 2007; Taylor, 2009; Taylor a Levine, 1980).

IncHI plazmidy představují vehikuly rezistence k antibiotikům. Jejich význam byl dokumentován už v 80. letech v souvislosti s globálním šířením multirezistentního fenotypu u původců břišního tyfu (Hasan *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 1985). V dnešní epidemiologii jsou skloňovány v kontextu šíření klinicky významné rezistence k cefalosporinům a karbapenemům u Enterobacteriaceae. Kromě rezistence k antibiotikům nesou genetickou informaci pro rezistenci ke kolicinu a k širokému spektru kovů (teluru, arsenu, mědi, stříbru a rtuti), které mohou napomáhat jejich udržování v prostředí zatíženém těmito látkami (Johnson *et al.*, 2006; Minh-Duy a Wain, 2008; Whelan *et al.*, 1995).

Plazmidy této rodiny se dělí do tří heterogenních podskupin HI1, HI2 a HI3. Navzdory minimální sekvenční homologii jsou vzájemně inkompatibilní pravděpodobně v důsledku vysoké podobnosti replikačního aparátu (Minh-Duy a Wain, 2008; Whiteley a Taylor, 1983). **IncHI1** plazmidy jsou dobře adaptovány na kmeny salmonel. Snížení vlastní biologické zátěže pro hostitelské buňky probíhá prostřednictvím modulace transkripce chromozomálních genů regulačními proteiny H-NS, které tyto plazmidy kódují (Doyle *et al.*, 2007). U *Salmonella* Typhi a *S. Paratyphi* jsou IncHI1 odpovědné za multirezistentní fenotyp zahrnující beta-laktamy, tetracykliny, chloramfenikol, streptomycin a sulfonamidy (Phan *et al.*, 2009). IncHI1 plazmidy byly popsány izolátů *E. coli* s produkcí CTX-M-1 z trusu koní (Dolejska *et al.*, 2011a<sup>5</sup>). Kromě genů rezistence k antibiotikům byl na plazmidech identifikován operon pro metabolismus fruktooligosacharidů (Dolejska *et al.*, 2014<sup>24</sup>). Sdružení rezistentních plazmidů s přídatnou metabolickou funkcí pravděpodobně udílí kmenům *E. coli* určitou výhodu ve střevní mikroflóře koní pod selekčním tlakem antibiotik.

**IncHI2** plazmidy přispívají k šíření beta-laktamázy CTX-M-2 a CTX-M-9 u nozokomiálních kmenů *S. enterica* a *E. coli* ve Španělsku, Francii a Belgii (Fernandez *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2005). Identické plazmidy nesoucí tyto beta-laktamázy byly zjištěny také u drůbeže, což podtrhuje jejich zoonotický potenciál (Fernandez *et al.*, 2007). Komparativní analýza sbírky IncHI2 plazmidů sdružených s genem *bla*<sub>CTX-M-2</sub> navíc prokázala jejich vysokou podobnost s plazmidy APEC kmenů z USA (Garcia *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2006). Nedávno bylo také upozorněno na souvislost mezi IncHI2 a šířením karbapenemázy IMP-4 mezi klinickými a environmentálními druhy enterobakterií v Austrálii (Dolejska *et al.*, 2016<sup>30</sup>; Sidjabat *et al.*, 2015).

### 7.10.3.5 Zoonotický potenciál IncI1 v šíření širokospektrých beta-laktamáz

Další skupinou plazmidů s významnou úlohou v šíření ESBL jsou IncI1 plazmidy. Dosahují velikosti okolo 100 kb, vyznačují se vysokou frekvencí konjugace a úzkým spektrem hostitelů v rámci čeledi Enterobacteriaceae (Carattoli, 2009). V sekvencích všech dosud popsáných IncI1 plazmidů byl identifikován soubor genů kódující pily čtvrtého typu, které jsou považovány za faktory virulence přispívající k adhezii a invazi patogenních kmenů *E. coli* (Kim a Komano, 1997). Vyšetřením rozsáhlé sbírky humánních a aviárních izolátů *E. coli* byla prokázána vyšší prevalence IncI1 plazmidů u patogenních kmenů v porovnání s komenzálními (Johnson *et al.*, 2007). Charakteristické virulenní faktory a přenášené geny rezistence k antibiotikům pravděpodobně napomáhají jejich globálnímu šíření. Experimentálně bylo také zjištěno, že nevytváří biologickou zátěž pro hostitelskou buňku a dlouhodobě perzistují a ochotně se přenáší konjugací v prostředí bez selekčního tlaku antibiotik (Handel *et al.*, 2015). V sekvencích IncI1 plazmidů se také běžně nachází geny pro produkci kolicinu, jehož produkce může zvyšovat selekční výhodu hostitelských kmenů.

Současné poznatky ukazují na kosmopolitní rozšíření IncI1 a podobně, jak bylo dokumentováno u IncN plazmidů, také na roli potravního řetězce v jejich šíření. Nesou geny pro ESBL různých typů (TEM-52, CTX-M-1, -2, -3, -9, -14, -15, -24) a AmpC beta-laktamázu CMY-2 (Carattoli, 2009). Dostupnost metodiky plazmidové MLST pro subtypizaci IncI1 plazmidů ukázala na jejich vysokou diverzitu (ke 20. 2. 2016 popsáno 217 sekvenčních typů). Zároveň odhalila dominanci některých vývojových linií (ST3, ST7, ST12) a jejich spojitost s určitými typy beta-laktamáz (Garcia-Fernandez *et al.*, 2008).

IncI1 plazmidy sdružené s *bla*<sub>CTX-M-1</sub> byly prokázány u geneticky různorodých kmenů *E. coli* a *Salmonella enterica* z různých zdrojů a geografických oblastí. Jejich přítomnost byla zjištěna ve střevě zdravých lidí, u hospodářských zvířat (prasata, drůbež, skot), zvířat chovaných ze záliby a v prostředí v Evropě, Austrálii, Africe a Severní Americe (Ben Sallem *et al.*, 2014; de Been *et al.*, 2014; Dobiasova *et al.*, 2013<sup>20</sup>; Haenni *et al.*, 2014; Klimes *et al.*, 2013<sup>18</sup>; Zurfluh *et al.*, 2014). V naprosté většině případů náleží do jedné ze dvou linií ST3 nebo ST7. Nizozemská studie prokázala geneticky příbuzné plazmidy (ST7-CTX-M-1) u humánních klinických izolátů *E. coli* a kmenů z drůbeže a drůbežního masa (Leverstein-van Hall *et al.*, 2011). Autoři poukazují na rezervoár těchto plazmidů u drůbeže a význam potravního řetězce v jejich šíření k patogenům člověka. Kosmopolitně je také rozšířen subtyp ST12 nesoucí gen *bla*<sub>CMY-2</sub> u humánních i veterinárních izolátů *E. coli* a *Salmonella enterica*, přičemž drůbež je považována za jejich pravděpodobný rezervoár (Accogli *et al.*, 2013<sup>19</sup>; Bortolaia *et al.*, 2014; Dierikx *et al.*, 2013; Folster *et al.*, 2010; Folster *et al.*, 2012; Sidjabat *et al.*, 2014; Tamang *et al.*, 2012).

### 7.10.3.6 IncL/M v globálním šíření OXA-48

Plazmidy této skupiny jsou prokazovány v souvislosti s ESBL (CTX-M-3, SHV-5) a karbapenemázami KPC, IMP, NDM a OXA-48 (Carattoli, 2008; Carattoli, 2013; Carattoli *et al.*, 2015; Woodford *et al.*, 2009). Byly odpovědné za masivní šíření CTX-M-3 v polských nemocnicích a sporadicky byly prokázány ve východní Evropě a Francii (Baraniak *et al.*, 2002; Carattoli, 2009; Golebiewski *et al.*, 2007). V Austrálii IncL/M plazmidy přenáší gen pro metalo-beta-laktamázu IMP-4 (Espedido *et al.*, 2008). V posledních letech nabyly na svém významu díky globálnímu rozšíření OXA-48. Diseminace IncL/M plazmidů sdružených s *bla*<sub>OXA-48</sub> mezi různými zástupci čeledi Enterobacteriaceae je dokumentována především v nemocnicích (Nordmann, 2014) včetně České republiky (J. Hrabák, LF UK v Plzni, osobní sdělení). Hrozí jejich postupné pronikání do zdravé lidské populace a ke zvířatům chovaným ze záliby (Stolle *et al.*, 2013; Zurfluh *et al.*, 2015). Sekvenční analýzy ukazují na vysokou homologii této plazmidové linie (Carattoli *et al.*, 2015; Poirel *et al.*, 2012b; Pérez-Vázquez, 2016).

V 70. letech byly IncL/M plazmidy děleny na dvě vzájemně kompatibilní skupiny IncL a IncM (Hedges *et al.*, 1974). Vysoká úroveň sekvenční homologie vedla později k jejich zařazení do společné inkompatibilní skupiny (Richards a Datta, 1979). Současná epidemiologie však naznačuje, že původní členění bylo správné a opětovně bylo navrženo vytvoření dvou skupin (Carattoli *et al.*, 2015). Plazmidy sdružené s OXA-48 přísluší k IncL, zatímco ty, které nesou geny pro ESBL a jiné typy karbapenemáz patří do IncM.

### 7.10.3.7 IncK v šíření CTX-M-14 a CMY-2

Na IncK plazmidy je upozorňováno v souvislosti s šířením beta-laktamázy CTX-M-14. Byly identifikovány u izolátů *E. coli* z prasat a skotu (Cottell *et al.*, 2011; Hansen *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2015; Liebana *et al.*, 2006). Ve Španělsku a Velké Británii bylo také pozorováno jejich šíření mezi humánními klinickými izoláty (Dhanji *et al.*, 2012; Valverde *et al.*, 2009). Hrají také úlohu v epidemiologii producentů CMY-2 (de Been *et al.*, 2014; Porres-Osante *et al.*, 2015).



## 8. Závěr

---

Rezistence bakterií k širokospektrým antimikrobiálním látkám ohrožuje medicínu 21. století, komplikuje léčbu infekcí, zvyšuje nemocnost a úmrtnost a má rovněž významné dopady na světovou ekonomiku. Za kritický je považován především rostoucí trend prevalence komenzálních i patogenních zástupců čeledi Enterobacteriaceae rezistentních k cefalosporinům vyšších generací, karbapenemům a fluorochinolonům, které řadíme mezi antibiotika určená k léčbě závažných a život ohrožujících infekcí. Recentní studie včetně několik původních prací našeho týmu upozorňují na podobnosti molekulárně-genetických charakteristik kmenů produkujících širokospektré beta-laktamázy izolovaných ze střeva zvířat s kmeny z kolonizovaných osob nebo z případů humánních infekcí. S ohledem na negativní dopady cefalosporinů na selekci, udržování a šíření rizikových rezistentních mechanismů je snahou regulovat a významně snížit jejich spotřebu především v chovech potravinových zvířat, k čemuž přistupuje i Česká republika. Všeobecným zájmem a cílem je zachovat klinickou účinnost antimikrobiálních látek v terapii humánních infekcí.

Genetická informace pro rezistenci ke sledovaným skupinám antibiotik je nesena mobilními genetickými elementy a vázána na úspěšné klony bakterií, které společně podporují šíření multirezistence v bakteriálních populacích. Naše recentní práce komentované v textu a doložené kopiemi publikačních výstupů upozorňují na klíčovou roli horizontálního přenosu genů rezistence k rizikovým beta-laktamům a fluorochinolonům prostřednictvím plazmidů a popisují význam četných genetických přestaveb v plazmidových sekvencích vedoucí ke zvyšování komplexnosti oblastí multirezistence. Zároveň poukazují na možnou úlohu sdružování multirezistentních konjugativních plazmidů s rezistencí k dezinfekčním látkám, těžkým kovům, virulencí, produkcí bakteriocinů a dalšími funkcemi, v obecně rostoucím charakteru antibiotické rezistence. Zdá se, že vedle rezistence k antibiotikům poskytují tyto plazmidy nesené přídatné funkce bakteriální buňce jisté benefity a navyšují její celkové fitness. Předmětem dalšího výzkumu je studium těchto sdružených funkcí a jejich vliv na udržování plazmidy determinovaných mechanismů rezistence v prostředí bez antibiotik.

Tato habilitační práce představila problematiku rezistence ke klinicky významným antibiotikům humánní i veterinární medicíny v kontextu "jednoho zdraví" zahrnující člověka, zvířata a životní prostředí. Výsledky našeho několikaletého výzkumu dokumentují zoonotický potenciál rezistentních bakterií, poukazují na sdílení multirezistentních virulentních klonů člověkem a zvířaty, popisují cesty jejich přenosu do prostředí a k volně žijícím zvířatům a v neposlední řadě dokládají zásadní význam vybraných rodin mobilních genetických elementů v diseminaci rezistentních mechanismů. Znalost epidemiologie antibiotické rezistence a schopnost jednotlivé mechanismy spolehlivě a rychle odhalit, je nezbytným předpokladem pro omezení výskytu a šíření multirezistentních bakterií.



## Seznam literatury

---

- Aarestrup, F. M., 2006, Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin: Washington, D.C., ASM Press, 441 pp.
- Aarestrup, F. M., H. Hasman, Y. Agerso, L. B. Jensen, S. Harksen, and B. Svensmark, 2006, First description of *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-carrying *Escherichia coli* isolates in Danish primary food production: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 57, p. 1258-1259.
- Abgottspon, H., K. Zurfluh, M. Nueesch-Inderbilen, H. Haechler, and R. Stephan, 2014, Quinolone resistance mechanisms in *Salmonella enterica* Serovars Hadar, Kentucky, Virchow, Schwarzengrund, and 4,5,12:i:-, isolated from humans in Switzerland, and identification of a novel *qnrD* variant, *qnrD2*, in *S. Hadar*: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, p. 3560-3563.
- Accogli, M., D. Fortini, M. Giufre, C. Graziani, M. Dolejska, A. Carattoli, and M. Cerquetti, 2013, Inc11 plasmids associated with the spread of CMY-2, CTX-M-1 and SHV-12 in *Escherichia coli* of animal and human origin: *Clinical Microbiology and Infection*, v. 19, p. E238-E240.
- Accogli, M., T. Giani, M. Monaco, M. Giufre, A. Garcia-Fernandez, V. Conte, F. D'Ancona, A. Pantosti, G. M. Rossolini, and M. Cerquetti, 2014, Emergence of *Escherichia coli* ST131 sub-clone H30 producing VIM-1 and KPC-3 carbapenemases, Italy: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, p. 2293-2296.
- Al-Ahmad, A., F. D. Daschner, and K. Kummerer, 1999, Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria: *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 37, p. 158-163.
- Albrechtová, K., M. Dolejska, A. Cizek, D. Tausova, J. Klimes, L. Bebora, and I. Literak, 2012b, Dogs of nomadic pastoralists in northern Kenya are reservoirs of plasmid-mediated cephalosporin- and quinolone-resistant *Escherichia coli*, including pandemic clone B2-O25-ST131: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, p. 4013-4017.
- Albrechtová, K., I. Literák, and A. Čížek, 2012a, Výskyt izolátů *Escherichia coli* s produkcí širokospektrých beta-laktamáz a plazmidově přenášenou rezistencí k fluorochinolonům u definovaných souborů psů a koček v České a Slovenské republice: *Veterinářství*, p. 277-282.
- Albrechtová, K., I. Papousek, H. De Nys, M. Pauly, E. Anoh, A. Mossoun, M. Dolejska, M. Masarikova, G. Metzger, E. Couacy-Hymann, C. Akouka-Koffi, R. M. Wittig, J. Klimes, A. Cizek, F. H. Leendertz, I. Literak, 2014, Low Rates of Antimicrobial-Resistant Enterobacteriaceae in Wildlife in Taï National Park, Côte d'Ivoire, Surrounded by Villages with High Prevalence of Multiresistant ESBL-Producing *Escherichia coli* in People and Domestic Animals: *PLoS One*, v. 9, p. e113548.
- Aldred, K. J., R. J. Kerns, N. Osheroff, 2014. Mechanism of Quinolone Action and Resistance: *Biochemistry*, v. 53, p. 1565-1574.
- Allen, H. K., L. A. Moe, J. Rodbumrer, A. Gaarder, and J. Handelsman, 2009, Functional metagenomics reveals diverse  $\beta$ -lactamases in a remote Alaskan soil: *ISME Journal*, v. 3, p. 243-251.
- Allmeier, H., B. Cresnar, M. Greck, and R. Schmitt, 1992, Complete nucleotide-sequence of Tn1721 : gene organization and a novel gene-product with features of a chemotaxis protein: *Gene*, v. 111, p. 11-20.
- Allocati, N., M. Masulli, M. F. Alexeyev, and C. Di Ilio, 2013, *Escherichia coli* in Europe: An overview: *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 10, p. 6235-6254.
- Altimira, F., C. Yanez, G. Bravo, M. Gonzalez, L. A. Rojas, and M. Seeger, 2012, Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile: *BMC Microbiology*, v. 12, p. 1-12.
- Alvarez, M., J. H. Tran, N. Chow, and G. A. Jacoby, 2004, Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in the United States: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 533-537.
- Alvarez-Alvarez, R., A. Rodriguez-Garcia, Y. Martinez-Burgo, V. Robles-Reglero, I. Santamarta, R. Perez-Redondo, J. F. Martin, and P. Liras, 2014, A 1.8-Mb-reduced *Streptomyces clavuligerus* genome: relevance for secondary metabolism and differentiation: *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, p. 2183-2195.
- Ambler, R. P., 1980, The structure of beta-lactamases: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, v. 289, p. 321-331.
- Amos, G. C. A., P. M. Hawkey, W. H. Gaze, and E. M. Wellington, 2014, Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, p. 1785-1791.
- Andriole, V. T., 2005, The quinolones: past, present, and future. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 41, p. S113-119.

- Applebaum, P. C., P. A. Hunter, 2000, The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives: *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 16, p. 5-15.
- Arakawa, Y., M. Murakami, K. Suzuki, H. Ito, R. Wacharotayankun, S. Ohsuka, N. Kato, and M. Ohta, 1995, A novel integron-like element carrying the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>*: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, p. 1612-1615.
- Arana, D. M., D. Saez, P. Garcia-Hierro, V. Bautista, S. Fernandez-Romero, M. Angel de la Cal, J. I. Alos, and J. Oteo, 2015, Concurrent interspecies and clonal dissemination of OXA-48 carbapenemase: *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 21, p. 148.e1-4.
- Baede, V. O., J. A. Wagenaar, E. M. Broens, B. Duim, W. Dohmen, R. Nijse, A. J. Timmerman, and J. Hordijk, 2015, Longitudinal study of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in household dogs: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, p. 3117-3124.
- Banerjee, R., and J. R. Johnson, 2014, A new clone sweeps clean: The enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, p. 4997-5004.
- Baquero, F., J.-L. Martinez, and R. Canton, 2008, Antibiotics and antibiotic resistance in water environments: *Current Opinion in Biotechnology*, v. 19, p. 260-265.
- Baraniak, A., J. Fiett, A. Sulikowska, W. Hryniewicz, and M. Gniadkowski, 2002, Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing microorganisms of the family *Enterobacteriaceae* in Poland: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, p. 151-159.
- Bardon, J., V. Husickova, M. Chroma, and M. Kolar, 2013, Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in slaughtered animals in the Czech Republic: *Journal of Food Protection*, v. 76, p. 1773-1777.
- Barker, A., and P. A. Manning, 1997, VlpA of *Vibrio cholerae* O1: the first bacterial member of the  $\alpha_2$ -microglobulin lipocalin superfamily: *Microbiology*, v. 143, p. 1805-1813.
- Barlow, M., and B. G. Hall, 2002, Origin and evolution of the AmpC  $\beta$ -lactamases of *Citrobacter freundii*: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, p. 1190-1198.
- Barnes, E. M., 1958, The effect of antibiotic supplements on the faecal streptococci (Lancefield group D) of poultry: *British Veterinary Journal*, p. 333-344.
- Bates, S., A. M. Cashmore, and B. M. Wilkins, 1998, IncP Plasmids Are unusually effective in mediating conjugation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: Involvement of the Tra2 mating system: *Journal of Bacteriology*, v. 180, p. 6538-6543.
- Batt, A. L., I. B. Bruce, and D. S. Aga, 2006, Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges: *Environmental Pollution*, v. 142, p. 295-302.
- Bauernfeind, A., J. M. Casellas, M. Goldberg, M. Holley, R. Jungwirth, P. Mangold, T. Rohnisch, S. Schweighart, and R. Wilhelm, 1992, A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*: *Infection*, v. 20, p. 158-163.
- Bauernfeind, A., H. Grimm, and S. Schweighart, 1990, A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*: *Infection*, v. 18, p. 294-298.
- Baur, B., K. Hanselmann, W. Schlimme, and B. Jenni, 1996, Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 3673-3678.
- Bean, D. C., D. M. Livermore, and L. M. C. Hall, 2009, Plasmids imparting sulfonamide resistance in *Escherichia coli*: Implications for persistence: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, p. 1088-1093.
- Belanger, L., A. Garenaux, J. Harel, M. Boulianne, E. Nadeau, and C. M. Dozois, 2011, *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*: *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 62, p. 1-10.
- Bellanger, X., S. Payot, N. Leblond-Bourget, and G. Guedon, 2014, Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity: *FEMS Microbiology Reviews*, v. 38, p. 720-760.
- Ben Sallem, R., K. Ben Slama, B. Rojo-Bezares, N. Porres-Osante, A. Jouini, N. Klibi, A. Boudabous, Y. Saenz, and C. Torres, 2014, IncI1 Plasmids Carrying *bla<sub>CTX-M-1</sub>* or *bla<sub>CMY-2</sub>* Genes in *Escherichia coli* from healthy humans and animals in Tunisia: *Microbial Drug Resistance*, v. 20, p. 495-500.
- Ben-Ami, R., M. J. Schwaber, S. Navon-Venezia, D. Schwartz, M. Giladi, I. Chmelnitsky, A. Leavitt, and Y. Carmeli, 2006, Influx of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing enterobacteriaceae into the hospital: *Clinical Infectious Diseases*, v. 42, p. 925-934.
- Benvenis, R., and J. Davies, 1973, Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in Actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 70, p. 2276-2280.

- Bergquist, P. L., H. E. D. Lane, L. Malcolm, and R. A. Downard, 1982, Molecular homology and incompatibility in the IncFI plasmid Group: *Journal of General Microbiology*, v. 128, p. 223-238.
- Bergquist, P. L., S. Saadi, and W. K. Maas, 1986, Distribution of basic replicons having homology with RepFIA, RepFIB, and RepFIC among IncF group plasmids: *Plasmid*, v. 15, p. 19-34.
- Berrazeg, M., S. M. Diene, L. Medjahed, P. Parola, M. Drissi, D. Raoult, and J. M. Rolain, 2014, New Delhi metallo-beta-lactamase around the world: An eReview using Google Maps: *Eurosurveillance*, v. 19, p. 2-15.
- Bharagava, R. N., S. Yadav, and R. Chandra, 2014, Antibiotic and heavy metal resistance properties of bacteria isolated from the aeration lagoons of common effluent treatment plant (CETP) of tannery industries (Unnao, India): *Indian Journal of Biotechnology*, v. 13, p. 514-519.
- Bhullar, K., N. Waglechner, A. Pawlowski, K. Koteva, E. D. Banks, M. D. Johnston, H. A. Barton, G. D. Wright, 2012, Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome: *PLoS ONE*, v. 7, p. e34953.
- Bi, D., Z. Xu, E. M. Harrison, C. Tai, Y. Wei, X. He, S. Jia, Z. Deng, K. Rajakumar, and H.-Y. Ou, 2012, ICEberg: a web-based resource for integrative and conjugative elements found in Bacteria: *Nucleic Acids Research*, v. 40, p. D621-D626.
- Biju, C., A. Befekadu, S. Reji, K. Afework, W. Lan, and J. John, 2012, Entero-aggregative- haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC) serotype O104:H4 -The evolving "Superbug", *Bangladesh Journal of Medical Sciences*, p. 4-11.
- Kim, B., H., M. Wang, C. H. Park, E.-C. Kim, G. A. Jacoby, and D. C. Hooper, 2009, *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, p. 3582-3584.
- Bishop, R. E., and J. H. Weiner, 1992, Coordinate Regulation of murein peptidase activity and Amp<sup>c</sup>  $\beta$ -lactamase synthesis in *Escherichia coli*: *FEBS Letters*, v. 304, p. 103-108.
- Bissonnette, L., S. Champetier, J. P. Buisson, and P. H. Roy, 1991, Characterization of the nonenzymatic chloramphenicol resistance (*cmIA*) gene of the In4 integron of Tn1696 - Similarity of the product to transmembrane transport proteins: *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 4493-4502.
- Blaak, H., P. de Kruijf, R. A. Hamidjaja, A. H. A. M. van Hoek, A. M. d. R. Husman, and F. M. Schets, 2014a, Prevalence and characteristics of ESBL-producing *E. coli* in Dutch recreational waters influenced by wastewater treatment plants: *Veterinary Microbiology*, v. 171, p. 448-459.
- Blaak, H., R. A. Hamidjaja, A. H. A. M. van Hoek, L. de Heer, A. M. d. R. Husman, and F. M. Schets, 2014b, Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* on flies at poultry farms: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, p. 239-246.
- Blaak, H., G. Lynch, R. Italiaander, R. A. Hamidjaja, F. M. Schets, and A. M. d. R. Husman, 2015, Multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch surface water and wastewater: *PLOS ONE*, v. 10, p. 1-16.
- Blanc, V., R. Mesa, M. Saco, S. Lavilla, G. Prats, E. Miro, F. Navarro, P. Cortes, and M. Llagostera, 2006, ESBL- and plasmidic class C  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms: *Veterinary Microbiology*, v. 118, p. 299-304.
- Blondeau, J. M., 2009, New concepts in antimicrobial susceptibility testing: the mutant prevention concentration and mutant selection window approach: *Veterinary Dermatology*, v. 20, p. 383-396.
- Bobrowski, M. M., M. Matthew, P. T. Barth, N. Datta, N. J. Grinter, A. E. Jacob, P. Kontomichalou, J. W. Dale, and J. T. Smith, 1976, Plasmid-determined  $\beta$ -lactamase indistinguishable from the chromosomal  $\beta$ -lactamase of *Escherichia coli*: *Journal of Bacteriology*, v. 125, p. 149-157.
- Bogaerts, P., T.-D. Huang, W. Bouchahrouf, C. Bauraing, C. Berhin, F. El Garch, Y. Glupczynski, and G. ComPath Study, 2015, Characterization of ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* from diseased companion animals in Europe: *Microbial Drug Resistance*, v. 21, p. 643-650.
- Bogaerts, P., A. M. Hujer, T. Naas, R. R. de Castro, A. Endimiani, P. Nordmann, Y. Glupczynski, and R. A. Bonomo, 2011, Multicenter evaluation of a new DNA microarray for rapid detection of clinically relevant *bla* genes from  $\beta$ -lactam-resistant gram-negative bacteria: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, p. 4457-4460.
- Bojer, M. S., C. Struve, H. Ingmer, D. S. Hansen, and K. A. Krogfelt, 2010, Heat Resistance mediated by a new plasmid encoded Clp ATPase, ClpK, as a possible novel mechanism for nosocomial persistence of *Klebsiella pneumoniae*: *PLOS One*, v. 5, p. 1-9.
- Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, H. W. Boyer, J. H. Crosa, and S. Falkow, 1977, Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system: *Gene*, v. 2, p. 95-113.

- Bonelli, R. R., B. M. Moreira, and R. C. Picao, 2014, Antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae* in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors: *Drug Resistance Updates*, v. 17, p. 24-36.
- Bonnedahl, J., J. Hernandez, J. Stedt, J. Waldenstrom, B. Olsen, and M. Drobni, 2014, Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in gulls, Alaska, USA: *Emerging Infectious Diseases*, v. 20, p. 897-899.
- Bonnet, R., 2004, Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: The CTX-M enzymes: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 1-14.
- Bortolaia, V., L. Guardabassi, M. Bisgaard, J. Larsen, and A. M. Bojesen, 2010a, *Escherichia coli* producing CTX-M-1,-2, and-9 group  $\beta$ -lactamases in organic chicken egg production: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, p. 3527-3528.
- Bortolaia, V., L. Guardabassi, M. Trevisani, M. Bisgaard, L. Venturi, and A. M. Bojesen, 2010b, High diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* isolates from Italian broiler flocks: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, p. 1623-1626.
- Bortolaia, V., K. H. Hansen, C. A. Nielsen, T. R. Fritsche, and L. Guardabassi, 2014, High diversity of plasmids harbouring *bla*<sub>CMY-2</sub> among clinical *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in the upper Midwestern USA: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, p. 1492-1496.
- Boucher, Y., C. L. Nesbo, M. J. Joss, A. Robinson, B. C. Mabbutt, M. R. Gillings, W. F. Doolittle, and H. W. Stokes, 2006, Recovery and evolutionary analysis of complete integron gene cassette arrays from *Vibrio*: *BMC Evolutionary Biology*, v. 6, p. 1-14.
- Bouet, J.-Y., K. Nordstrom, and D. Lane, 2007, Plasmid partition and incompatibility - the focus shifts: *Molecular Microbiology*, v. 65, p. 1405-1414.
- Bousquet, A., S. Henquet, F. Compain, N. Genel, G. Arlet, and D. Decre, 2015, Partition locus-based classification of selected plasmids in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* spp.: An additional tool: *Journal of Microbiological Methods*, v. 110, p. 85-91.
- Boxall, A. B. A., P. Johnson, E. J. Smith, C. J. Sinclair, E. Stutt, and L. S. Levy, 2006, Uptake of veterinary medicines from soils into plants: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 2288-2297.
- Boyd, D. A., and M. R. Mulvey, 2013, The VanE operon in *Enterococcus faecalis* N00-410 is found on a putative integrative and conjugative element, Tn6202: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 294-299.
- Boyd, D. A., G. A. Peters, L. K. Ng, and M. R. Mulvey, 2000, Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104: *FEMS Microbiology Letters*, v. 189, p. 285-291.
- Bradford, P. A., 2001, Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat: *Clinical Microbiology Reviews*, v. 14, p. 933-951.
- Brigante, G., F. Luzzaro, M. Perilli, G. Lombardi, A. Coli, G. M. Rossolini, G. Amicosante, and A. Toniolo, 2005, Evolution of CTX-M-type  $\beta$ -lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients: *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 25, p. 157-162.
- Brinas, L., M. A. Moreno, T. Teshager, Y. Saenz, M. C. Porrero, L. Dominguez, and C. Torres, 2005, Monitoring and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 1262-1264.
- Brinas, L., M. A. Moreno, M. Zarazaga, C. Porrero, Y. Saenz, M. Garcia, L. Dominguez, and C. Torres, 2003, Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 2056-2058.
- Brouwer, M. S. M., A. Bossers, F. Harders, A. van Essen-Zandbergen, D. J. Mevius, and H. E. Smith, 2014, Complete genome sequences of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes: *Genome announcements*, v. 2, p. 1-2.
- Brown-Jaque, M., W. Calero-Caceres, and M. Muniesa, 2015, Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements: *Plasmid*, v. 79, p. 1-7.
- Bryskier, 2005, *Antimicrobial agents: Antibacterials and Antifungals*, Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 1426 pp.
- Burland, V., Y. Shao, N. T. Perna, G. Plunkett, H. J. Sofia, and F. R. Blattner, 1998, The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157 : H7: *Nucleic Acids Research*, v. 26, p. 4196-4204.
- Burman, L. G., 1977, Apparent absence of transferable resistance to nalidixic-acid in pathogenic Gram-negative bacteria: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 3, p. 509-516.
- Burrus, V., G. Pavlovic, B. Decaris, and G. Guedon, 2002, Conjugative transposons: the tip of the iceberg: *Molecular Microbiology*, v. 46, p. 601-610.

- Bush, K., 2010, Alarming  $\beta$ -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: Current Opinion in Microbiology, v. 13, p. 558-564.
- Bush, K., 2013, The ABCD's of  $\beta$ -lactamase nomenclature: Journal of Infection and Chemotherapy, v. 19, p. 549-559.
- Bush, K., and G. A. Jacoby, 2010, Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 54, p. 969-976.
- Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros, 1995, A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular-structure: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 39, p. 1211-1233.
- Calero-Caceres, W., A. Melgarejo, M. Colomer-Lluch, C. Stoll, F. Lucena, J. Jofre, and M. Muniesa, 2014, Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions: Environmental Science & Technology, v. 48, p. 7602-7611.
- Cambau, E., C. Lascols, W. Sougakoff, C. Bebear, R. Bonnet, J. D. Cavallo, L. Gutmann, M. C. Ploy, V. Jarlier, C. J. Soussy, and J. Robert, 2006, Occurrence of *qnrA*-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002-2005: Clinical Microbiology and Infection, v. 12, p. 1013-1020.
- Campbell, A., D. E. Berg, E. M. Lederberg, P. Starlinger, D. Botstein, R. P. Novick, and W. Szybalski, 1979, Nomenclature of transposable elements in prokaryotes: Plasmid, v. 2, p. 466-473.
- Canton, R., M. Akova, Y. Carmeli, C. G. Giske, Y. Glupczynski, M. Gniadkowski, D. M. Livermore, V. Miriagou, T. Naas, G. M. Rossolini, O. Samuelsen, H. Seifert, N. Woodford, P. Nordmann, and C. European Network, 2012a, Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe: Clinical Microbiology and Infection, v. 18, p. 413-431.
- Canton, R., and T. M. Coque, 2006, The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic: Current Opinion in Microbiology, v. 9, p. 466-475.
- Canton, R., J. Maria Gonzalez-Alba, and J. Carlos Galan, 2012b, CTX-M enzymes: origin and diffusion: Frontiers in Microbiology, v. 3, p. 1-19.
- Canton, R., and M.-I. Morosini, 2011, Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics: FEMS Microbiology Reviews, v. 35, p. 977-991.
- Canton, R., A. Novais, A. Valverde, E. Machado, L. Peixe, F. Baquero, and T. M. Coque, 2008, Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: Clinical Microbiology and Infection, v. 14, p. 144-153.
- Canton, R., and P. Ruiz-Garbajosa, 2011, Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes: Current Opinion in Pharmacology, v. 11, p. 477-485.
- Carattoli, A., 2001, Importance of integrons in the diffusion of resistance: Veterinary Research, v. 32, p. 243-259.
- Carattoli, A., 2008, Animal reservoirs for extended spectrum  $\beta$ -lactamase producers: Clinical Microbiology and Infection, v. 14, p. 117-123.
- Carattoli, A., 2009, Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 53, p. 2227-2238.
- Carattoli, A., 2011, Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids: International Journal of Medical Microbiology, v. 301, p. 654-658.
- Carattoli, A., 2013, Plasmids and the spread of resistance: International Journal of Medical Microbiology, v. 303, p. 298-304.
- Carattoli, A., R. Aschbacher, A. March, C. Larcher, D. M. Livermore, and N. Woodford, 2010, Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid pKOX105 encoding VIM-1, QnrS1 and SHV-12 proteins in *Enterobacteriaceae* from Bolzano, Italy compared with IncN plasmids encoding KPC enzymes in the USA: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 65, p. 2070-2075.
- Carattoli, A., A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K. L. Hopkins, and E. J. Threlfall, 2005a, Identification of plasmids by PCR-based replicon typing: Journal of Microbiological Methods, v. 63, p. 219-228.
- Carattoli, A., S. Lovari, A. Franco, G. Cordaro, P. Di Matteo, and A. Battisti, 2005b, Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 49, p. 833-835.
- Carattoli, A., V. Miriagou, A. Bertini, A. Loli, C. Colinson, L. Villa, J. M. Whichard, and G. M. Rossolini, 2006, Replicon Typing of plasmids encoding resistance to newer  $\beta$ -lactams: Emerging Infectious Diseases, v. 12, p. 1145-1148.
- Carattoli, A., S. N. Seiffert, S. Schwendener, V. Perreten, and A. Endimiani, 2015, Differentiation of IncL and IncM plasmids associated with the spread of clinically relevant antimicrobial resistance: PLOS One, v. 10, p. 1-14.
- Carattoli, A., F. Tosini, W. P. Giles, M. E. Rupp, S. H. Hinrichs, F. J. Angulo, T. J. Barrett, and P. D. Fey, 2002, Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella*

- strains isolated in the United States between 1996 and 1998: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, p. 1269-1272.
- Carattoli, A., E. Zankari, A. Garcia-Fernandez, M. V. Larsen, O. Lund, L. Villa, F. M. Aarestrup, and H. Hasman, 2014, *In Silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, p. 3895-3903.
- Cartelle, M., M. D. Tomas, F. Molina, R. Moure, R. Villanueva, and G. Bou, 2004, High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 2308-2313.
- Castanheira, M., M. A. Toleman, R. N. Jones, F. J. Schmidt, and T. R. Walsh, 2004, Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>GIM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 4654-4661.
- Castillo Garcia, F. J., C. Seral Garcia, M. Pardos De la Gandara, M. I. Millan Lou, and C. Pitart Ferre, 2007, Prevalence of fecal carriage of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in hospitalized and ambulatory patients during two non-outbreak periods: *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 26, p. 77-8.
- Cattoir, V., P. Nordmann, J. Silva-Sanchez, P. Espinal, and L. Poirel, 2008a, *ISEcp1*-mediated transposition of *qnrB*-like gene in *Escherichia coli*: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, p. 2929-2932.
- Cattoir, V., L. Poirel, C. Aubert, C.-J. Soussy, and P. Nordmann, 2008b, Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp: *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, p. 231-237.
- Cattoir, V., L. Poirel, D. Mazel, C.-J. Soussy, and P. Nordmann, 2007, *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated Qnrs-like quinolone resistance determinants: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, p. 2650-2651.
- Cattoir, V., L. Poirel, and P. Nordmann, 2008c, Plasmid-mediated quinolone resistance pump Qepa2 in an *Escherichia coli* isolate from France: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, p. 3801-3804.
- Cavaco, L. M., E. Abatih, F. M. Aarestrup, and L. Guardabassi, 2008, Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cequinome: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, p. 3612-3616.
- Cavaco, L. M., H. Hasman, S. Xia, and F. M. Aarestrup, 2009, *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, p. 603-608.
- Cekanova, L., M. Kolar, M. Chroma, P. Sauer, M. Sedlackova, and D. Koukalova, 2009, Prevalence of ESBL-positive bacteria in the community in the Czech Republic: *Medical Science Monitor*, v. 15, p. BR202-BR206.
- Cerin, H., and J. Hackett, 1993, The *parVP* region of the *Salmonella-Typhimurium* virulence plasmid pSLT contains four loci required for incompatibility and partition: *Plasmid*, v. 30, p. 30-38.
- Chandler, M., and J. Mahillon, 2000, Insertion sequence nomenclature: *ASM News*, v. 66, p. 324-324.
- Chen, Y.-T., T.-L. Liao, Y.-M. Liu, T.-L. Lauderdale, J.-J. Yan, and S.-F. Tsai, 2009, Mobilization of *qnrB2* and *ISCR1* in plasmids: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, p. 1235-1237.
- Cheng, W., J. Li, Y. Wu, C. Su, Y. Qian, Y. G. Zhu, H. Chen, 2016, Behavior of antibiotics and antibiotic resistance genes in eco-agricultural system: A case study: *Journal of Hazardous Materials*, v. 304, p. 18-25.
- Ciesielczuk, H., M. Hornsey, V. Choi, N. Woodford, and D. W. Wareham, 2013, Development and evaluation of a multiplex PCR for eight plasmid-mediated quinolone-resistance determinants: *Journal of Medical Microbiology*, v. 62, p. 1823-1827.
- CLSI, 2013, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-third informational supplement M100-S23, Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI, 2015, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-third informational supplement M100-S25, Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cohen, S., and H. M. Sweeney, 1970, Transduction of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* dependent on an unusual specificity of recipient strain: *Journal of Bacteriology*, v. 104, p. 1158-1167.
- Cole, J. M., A. N. Schuetz, C. E. Hill, and F. S. Nolte, 2009, Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes: *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, p. 322-326.
- Collis, C. M., and R. M. Hall, 1992, Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles: *Molecular Microbiology*, v. 6, p. 2875-2885.
- Collis, C. M., and R. M. Hall, 1995, Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, p. 155-162.
- Collis, C. M., M. J. Kim, S. R. Partridge, H. W. Stokes, and R. M. Hall, 2002, Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines: *Journal of Bacteriology*, v. 184, p. 3017-3026.



- Colomer-Lluch, M., L. Imamovic, J. Jofre, and M. Muniesa, 2011a, Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, p. 4908-4911.
- Colomer-Lluch, M., J. Jofre, and M. Muniesa, 2011b, Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples: *PLOS One*, v. 6., p. 1-11.
- Colomer-Lluch, M., J. Jofre, and M. Muniesa, 2014, Quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, p. 1265-1274.
- Compain, F., A. Poisson, S. Le Hello, C. Branger, F.-X. Weill, G. Arlet, and D. Decre, 2014, Targeting relaxase genes for classification of the predominant plasmids in Enterobacteriaceae: *International Journal of Medical Microbiology*, v. 304, p. 236-242.
- Correia, M., F. Boavida, F. Grosso, M. J. Salgado, L. M. Lito, J. M. Cristino, S. Mendo, and A. Duarte, 2003, Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 2838-2843.
- Cortes, P., V. Blanc, A. Mora, G. Dahbi, J. E. Blanco, M. Blanco, C. Lopez, A. Andreu, F. Navarro, M. Pilar Alonso, G. Bou, J. Blanco, and M. Llagostera, 2010, Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, p. 2799-2805.
- Costa, D., P. Poeta, L. Brinas, Y. Saenz, J. Rodrigues, and C. Torres, 2004, Detection of CTX-M-1 and TEM-52  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 54, p. 960-961.
- Costa, D., P. Poeta, Y. Saenz, L. Vinue, B. Rojo-Bezares, A. Jouini, M. Zarazaga, J. Rodrigues, and C. Torres, 2006, Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 58, p. 1311-1312.
- Cottell, J. L., M. A. Webber, N. G. Coldham, D. L. Taylor, A. M. Cerdeno-Tarraga, H. Hauser, N. R. Thomson, M. J. Woodward, and L. J. V. Piddock, 2011, Complete sequence and molecular epidemiology of IncK epidemic plasmid encoding *bla*<sub>CTX-M-14</sub>: *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, p. 645-652.
- Couturier, M., F. Bex, P. L. Bergquist, and W. K. Maas, 1988, Identification and classification of bacterial plasmids: *Microbiological Reviews*, v. 52, p. 375-395.
- Crozat, E., F. Fournes, F. Cornet, B. Hallet, and P. Rousseau, 2014, Resolution of multimeric forms of circular plasmids and chromosomes: *Microbiology spectrum*, v. 2, p. 1-16.
- Cuzon, G., J. Ouanich, R. Gondret, T. Naas, and P. Nordmann, 2011, Outbreak of OXA-48-Positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in France: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, p. 2420-2423.
- D'Andrea, M. M., F. Arena, L. Pallecchi, and G. M. Rossolini, 2013, CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: A successful story of antibiotic resistance: *International Journal of Medical Microbiology*, v. 303, p. 305-317.
- D'Costa, V. M., C. E. King, L. Kalan, M. Morar, W. W. L. Sung, C. Schwarz, D. Froese, G. Zazula, F. Calmels, R. Debruyne, G. B. Golding, H. N. Poinar, 2011, Antibiotic resistance is ancient: *Nature*, v. 477, p. 457-461.
- D'Costa, V. M., K. M. McGrann, D. W. Hughes, and G. D. Wright, 2006, Sampling the antibiotic resistome: *Science*, v. 311, p. 374-377.
- da Costa, P. M., L. Loureiro, and A. J. F. Matos, 2013, Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: The Interface Between Humans, Animals and the Environment: *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 10, p. 278-294.
- da Costa, P. M., P. Vaz-Pires, and F. Bernardo, 2008, Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated in wastewater and sludge from poultry slaughterhouse wastewater plants: *Journal of Environmental Health*, v. 70, p. 40-45.
- da Fonseca, E. L., and A. C. P. Vicente, 2012, Functional characterization of a cassette-specific promoter in the class 1 integron-associated *qnrVC1* gene: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, p. 3392-3394.
- Dahlberg, C., and L. Chao, 2003, Amelioration of the cost of conjugative plasmid carriage in *Escherichia coli* K12: *Genetics*, v. 165, p. 1641-1649.
- Dale, J. W., and S. F. Park, 2004, *Molecular genetics of bacteria*, 4th ed. , West Sussex, John Wiley & Sons, 358 pp.
- Damborg, P., P. Marskar, K. E. Baptiste, and L. Guardabassi, 2012, Faecal shedding of CTX-M-producing *Escherichia coli* in horses receiving broad-spectrum antimicrobial prophylaxis after hospital admission: *Veterinary Microbiology*, v. 154, p. 298-304.
- Dao-Thi, M. H., L. Van Melderren, E. De Genst, H. Afif, L. Buts, L. Wyns, and R. Loris, 2005, Molecular basis of gyrase poisoning by the addiction toxin CcdB: *Journal of Molecular Biology*, v. 348, p. 1091-1102.

- Datta, N., S. Dacey, V. Hughes, S. Knight, H. Richards, G. Williams, M. Casewell, and K. P. Shannon, 1980, Distribution of genes for trimethoprim and gentamicin resistance in bacteria and their plasmids in a general hospital: *Journal of General Microbiology*, v. 118, p. 495-508.
- Datta, N., and V. M. Hughes, 1983, Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics: *Nature*, v. 306, p. 616-617.
- Datta, N., and P. Kontomichalou, 1965, Penicillinase synthesis controlled by infectious *R* factors in Enterobacteriaceae: *Nature*, v. 208, p. 239-&.
- Dautzenberg, M. J., J. M. Ossewaarde, M. E. de Kraker, A. van der Zee, S. van Burgh, S. C. de Greeff, H. A. Bijlmer, H. Grundmann, J. W. C. Stuart, A. C. Fluit, A. Troelstra, and M. J. Bonten, 2014, Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing Enterobacteriaceae in the Netherlands, 2009 to 2011: *Eurosurveillance*, v. 19, p. 30-41.
- de Been, M., V. F. Lanza, M. de Toro, J. Scharringa, W. Dohmen, Y. Du, J. Hu, Y. Lei, N. Li, A. Tooming-Klunderud, D. J. J. Heederik, A. C. Fluit, M. J. M. Bonten, R. J. L. Willems, F. de la Cruz, and W. van Schaik, 2014, Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages: *PLOS Genetics*, v. 10, p. 1-17.
- De Boeck, H., B. Miwanda, O. Lunguya-Metila, J.-J. Muyembe-Tamfum, E. Stobberingh, Y. Glupczynski, and J. Jacobs, 2012, ESBL-positive Enterobacteria isolates in drinking water: *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, p. 1019-1020.
- De Rycke, J., A. Milon, and E. Oswald, 1999, Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens: *Veterinary Research*, v. 30, p. 221-233.
- Decousser, J. W., L. Poirel, and P. Nordmann, 2001, Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A  $\beta$ -lactamase from *Kluyvera cryocrescens*: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 3595-3598.
- Deng, Y., X. Bao, L. Ji, L. Chen, J. Liu, J. Miao, D. Chen, H. Bian, Y. Li, and G. Yu, 2015, Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons: *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 14, p. 1-11.
- Denisuik, A. J., P. R. S. Lagace-Wiens, J. D. Pitout, M. R. Mulvey, P. J. Simner, F. Taylor, J. A. Karlowsky, D. J. Hoban, H. J. Adam, G. G. Zhanel, and Cara, 2013, Molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-, AmpC  $\beta$ -lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: *CANWARD 2007-11: Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. i57-i65.
- Dhanji, H., P. Khan, J. L. Cottell, L. J. V. Piddock, J. Zhang, D. M. Livermore, and N. Woodford, 2012, Dissemination of pCT-like IncK plasmids harboring CTX-M-14 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase among clinical *Escherichia coli* isolates in the United Kingdom: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, p. 3376-3377.
- Dhanji, H., R. Patel, R. Wall, M. Doumith, B. Patel, R. Hope, D. M. Livermore, and N. Woodford, 2011, Variation in the genetic environments of *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in *Escherichia coli* from the faeces of travellers returning to the United Kingdom: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, p. 1005-1012.
- Diancourt, L., V. Passet, J. Verhoef, P. A. D. Grimont, and S. Brisse, 2005, Multilocus Sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates: *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 4178-4182.
- Diaz, M. A., J. R. Hernandez-Bello, J. Rodriguez-Bano, L. Martinez-Martinez, J. Calvo, J. Blanco, A. Pascual, and I. Spanish Grp Nosocomial, 2010, Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Spain: Second Nationwide Study: *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, p. 2840-2845.
- Dibner, J. J., and J. D. Richards, 2005, Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action: *Poultry Science*, v. 84, p. 634-643.
- Dierikx, C., J. van der Goot, T. Fabri, A. van Essen-Zandbergen, H. Smith, and D. Mevius, 2013, Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase- and AmpC- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 60-67.
- Dierikx, C. M., E. van Duijkeren, A. H. W. Schoormans, A. van Essen-Zandbergen, K. Veldman, A. Kant, X. W. Huijsdens, K. van der Zwaluw, J. A. Wagenaar, and D. J. Mevius, 2012, Occurrence and characteristics of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, p. 1368-1374.
- Ding, H., and M. F. Hynes, 2009, Plasmid transfer systems in the rhizobia: *Canadian Journal of Microbiology*, v. 55, p. 917-927.
- Dionisio, F., I. C. Conceicao, A. C. R. Marques, L. Fernandes, and I. Gordo, 2005, The evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness: *Biology Letters*, v. 1, p. 250-252.
- Dobiasova, H., M. Dolejska, 2016, Prevalence and diversity of IncX plasmids carrying fluoroquinolone and  $\beta$ -lactam resistance genes in *Escherichia coli* originating from diverse sources and geographical areas: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v tisku.

- Dobiasova, H., M. Dolejska, I. Jamborova, E. Brhelova, L. Blazkova, I. Papousek, M. Kozlova, J. Klimes, A. Cizek, and I. Literak, 2013, Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic: FEMS Microbiology Ecology, v. 85, p. 604-611.
- Dobiasova, H., I. Kutilova, V. Piackova, T. Vesely, A. Cizek, and M. Dolejska, 2014, Ornamental fish as a source of plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic resistance plasmids: Veterinary Microbiology, v. 171, p. 413-421.
- Dobiasova, H., P. Videnska, and M. Dolejska, 2015, Complete sequences of IncU plasmids harboring quinolone resistance genes *qnrS2* and *aac(6')-Ib-cr* in *Aeromonas* spp. from ornamental fish: Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 60, p. 653-7.
- Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel, and J. Hacker, 2004, Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms: Nature Reviews Microbiology, v. 2, p. 414-424.
- Dodd, M. C., 2012, Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment: Journal of Environmental Monitoring, v. 14, p. 1754-1771.
- Dolejska, M., B. Bierosova, L. Kohoutova, I. Literak, and A. Cizek, 2009, Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls: Journal of Applied Microbiology, v. 106, p. 1941-1950.
- Dolejska, M., E. Brhelova, H. Dobiasova, J. Krivdova, J. Jurankova, A. Sevcikova, L. Dubska, I. Literak, A. Cizek, M. Vavrina, L. Kutnikova, and J. Sterba, 2012, Dissemination of IncFII<sub>K</sub>-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates from children in hospital paediatric oncology wards: International Journal of Antimicrobial Agents, v. 40, p. 510-515.
- Dolejska, M., E. Duskova, J. Rybarikova, D. Janoszowska, E. Roubalova, K. Dibdakova, G. Maceckova, L. Kohoutova, I. Literak, J. Smola, and A. Cizek, 2011a, Plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 66, p. 757-764.
- Dolejska, M., P. Frolkova, M. Florek, I. Jamborova, M. Purgertova, I. Kutilova, A. Cizek, S. Guenther, and I. Literak, 2011b, CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 66, p. 2784-2790.
- Dolejska, M., Z. Jurcickova, I. Literak, L. Pokludova, J. Bures, A. Hera, L. Kohoutova, J. Smola, and A. Cizek, 2011c, IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> in *Escherichia coli* isolates on a dairy farm: Veterinary Microbiology, v. 149, p. 513-516.
- Dolejska, M., M. Masarikova, H. Dobiasova, I. Jamborova, R. Karpiskova, M. Havlicek, N. Carlile, D. Priddel, A. Cizek, and I. Literak, 2016, High prevalence of *Salmonella* and IMP-4-producing Enterobacteriaceae in the silver gull on Five Islands, Australia: The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 71, p. 63-70.
- Dolejska, M., M. Matulova, L. Kohoutova, I. Literak, J. Bardon, and A. Cizek, 2011d, Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in turkey meat production farms in the Czech Republic: National survey reveals widespread isolates with *bla*<sub>SHV-12</sub> genes on IncFII plasmids: Letters in Applied Microbiology, v. 53, p. 271-277.
- Dolejska, M., L. Villa, H. Dobiasova, D. Fortini, C. Feudi, and A. Carattoli, 2013a, Plasmid content of a clinically relevant *Klebsiella pneumoniae* clone from the Czech Republic producing CTX-M-15 and QnrB1: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 57, p. 1073-1076.
- Dolejska, M., L. Villa, H. Hasman, L. Hansen, and A. Carattoli, 2013b, Characterization of IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnr* genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 68, p. 333-339.
- Dolejska, M., L. Villa, M. Minoia, L. Guardabassi, and A. Carattoli, 2014, Complete sequences of IncHI1 plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnrS1* in equine *Escherichia coli* provide new insights into plasmid evolution: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 69, p. 2388-2393.
- Dolejska, M., L. Villa, L. Poirel, P. Nordmann, and A. Carattoli, 2013c, Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance-nodulation-cell division/multidrug efflux pump: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 68, p. 34-39.
- Domingues, S., G. J. Da Silva, and K. M. Nielsen, 2012a, Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria: Mobile Genetic Elements, v. 2, p. 211-223.
- Domingues, S., K. Harms, W. F. Fricke, P. J. Johnsen, G. J. da Silva, and K. M. Nielsen, 2012b, Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes between bacterial species: PLOS Pathogens, v. 8, p. 1-15.

- Donaldson, S. C., B. A. Straley, N. V. Hegde, A. A. Sawant, C. DebRoy, and B. M. Jayarao, 2006, Molecular epidemiology of ceftiofur-resistant *Escherichia coli* isolates from dairy calves: Applied and Environmental Microbiology, v. 72, p. 3940-3948.
- Donneberg, M. S., 2013, *Escherichia coli*: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen: San Diego, CA, Academic Press, 417 pp.
- Dortet, L., L. Brechard, L. Poirel, and P. Nordmann, 2014a, Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from blood cultures: Clinical Microbiology and Infection, v. 20, p. 340-344.
- Dortet, L., L. Poirel, and P. Nordmann, 2012, Rapid detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas* spp: Journal of Clinical Microbiology, v. 50, p. 3773-3776.
- Dortet, L., L. Poirel, and P. Nordmann, 2014b, Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria: Biomed Research International, v. 2014, p.1-12.
- Doss, S. A., G. S. Tillotson, N. L. Barg, and S. G. B. Amyes, 1995, In-vitro and in-vivo selection of *Staphylococcus aureus* mutants resistant to ciprofloxacin: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 35, p. 95-102.
- Dougan, G., J. H. Crosa, and S. Falkow, 1978, Mobilization of *Escherichia coli* plasmid ColE1 (colicin E1) and ColE1 vectors used in recombinant DNA experiments: Journal of Infectious Diseases, v. 137, p. 676-680.
- Doumith, M., H. Dhanji, M. J. Ellington, P. Hawkey, and N. Woodford, 2012, Characterization of plasmids encoding extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and their addiction systems circulating among *Escherichia coli* clinical isolates in the UK: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 67, p. 878-885.
- Dowell, C. E., and E. D. Rosenblum, 1962, Staphylococcal transducing particle: Journal of Bacteriology, v. 84, p. 1076-1079.
- Doyle, M., M. Fookes, A. Ivens, M. W. Mangan, J. Wain, and C. J. Dorman, 2007, An H-NS-like stealth protein aids horizontal DNA transmission in bacteria: Science, v. 315, p. 251-252.
- Drago, L., L. Nicola, R. Mattina, and E. De Vecchi, 2010, In vitro selection of resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. at *in vivo* fluoroquinolone concentrations: BMC Microbiology, v. 10, p. 1-7.
- Dunne, E. F., P. D. Fey, P. Kludt, R. Reporter, F. Mostashari, P. Shillam, J. Wicklund, C. Miller, B. Holland, E. Stamey, T. J. Barrett, J. K. Rasheed, F. C. Tenover, E. M. Ribot, and F. J. Angulo, 2000, Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections associated with AmpC  $\beta$ -lactamase: JAMA-The Journal of the American Medical Association, v. 284, p. 3151-3156.
- EFSA, 2011, Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food-producing animals, European Food Safety Authority, EFSA Journal, p. 2322
- EFSA, 2013, Scientific Opinion on carbapenem resistance in food animal ecosystems, European Food Safety Authority, EFSA Journal, p. 3501.
- EFSA, 2016, The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014, European Food Safety Authority, EFSA Journal, p. 4380.
- Eikmeyer, F., A. Hadiati, R. Szczepanowski, D. Wibberg, S. Schneiker-Bekel, L. M. Rogers, C. J. Brown, E. M. Top, A. Puehler, and A. Schlueter, 2012, The complete genome sequences of four new IncN plasmids from wastewater treatment plant effluent provide new insights into IncN plasmid diversity and evolution: Plasmid, v. 68, p. 13-24.
- Eisner, A., E. J. Fagan, G. Feierl, H. H. Kessler, E. Marth, D. M. Livermore, and N. Woodford, 2006, Emergence of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in Austria: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 50, p. 785-787.
- Ellington, M. J., and N. Woodford, 2006, Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction systems: self-imposed selection pressure?: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 57, p. 1026-1029.
- Elliott, S. D., and E. M. Barnes, 1959, Changes in serological type and antibiotic resistance of Lancefield group D streptococci in chickens receiving dietary chlortetracycline: Journal of General Microbiology, v. 20, p. 426-433.
- EMA, 2012, Sales of veterinary antimicrobial agents in 19 EU/EEA countries in 2010: Second ESCAV report, EMA/88728/2012, European Medicines Agency.
- EMA, 2013, Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2013: Fifth ESCVAC report, EMA/38934/2015, European Medicines Agency.
- Empel, J., A. Baraniak, E. Literacka, A. Mrowka, J. Fiett, E. Sadowy, W. Hryniewicz, M. Gniadkowski, and P. L. S. G. Beta, 2008, Molecular Survey of  $\beta$ -lactamases conferring resistance to newer  $\beta$ -lactams in *Enterobacteriaceae* isolates from Polish hospitals: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 52, p. 2449-2454.

- Endimiani, A., A. Rossano, D. Kunz, G. Overesch, and V. Perreten, 2012, First countrywide survey of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from broilers, swine, and cattle in Switzerland: Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 73, p. 31-38.
- Engler, G., M. Holsters, M. Vanmontagu, J. Schell, J. P. Hernalsteens, and R. Schilperoort, 1975, Agrocin 84 sensitivity - A plasmid determined property in *Agrobacterium tumefaciens*: Molecular and General Genetics, v. 138, p. 345-349.
- Espedido, B. A., S. R. Partridge, and J. R. Iredell, 2008, *bla*<sub>IMP-4</sub> in different genetic contexts in *Enterobacteriaceae* isolates from Australia: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 52, p. 2984-2987.
- EUCAST, 2016, European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 6.0, valid from 2016-01-01, p. 91.
- Ewers, C., A. Bethe, T. Semmler, S. Guenther, and L. H. Wieler, 2012, Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective: Clinical Microbiology and Infection, v. 18, p. 646-655.
- Ewers, C., A. Bethe, I. Stamm, M. Grobbel, P. A. Kopp, B. Guerra, M. Stubbe, Y. Doi, Z. Zong, A. Kola, K. Schaufler, T. Semmler, A. Fruth, L. H. Wieler, and S. Guenther, 2014, CTX-M-15-D-ST648 *Escherichia coli* from companion animals and horses: another pandemic clone combining multiresistance and extraintestinal virulence?: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 69, p. 1224-1230.
- Ewers, C., M. Grobbel, I. Stamm, P. A. Kopp, I. Diehl, T. Semmler, A. Fruth, J. Beutlich, B. Guerra, L. H. Wieler, and S. Guenther, 2010, Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 65, p. 651-660.
- Fajardo, A., J. L. Martinez, 2008, Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses: Current Opinion in Microbiology, v. 11, p. 161-167.
- Fancello, L., C. Desnues, D. Raoult, and J. M. Rolain, 2011, Bacteriophages and diffusion of genes encoding antimicrobial resistance in cystic fibrosis sputum microbiota: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 66, p. 2448-2454.
- Farmer, J. J., G. R. Fanning, G. P. Huntley Carter, B. Holmes, F. W. Hickman, C. Richard, and D. J. Brenner, 1981, *Kluyvera*, a new (redefined) genus in the family *Enterobacteriaceae*: identification of *Kluyvera ascorbata* sp. nov and *Kluyvera cryocrescens* sp.-nov. in clinical specimens: Journal of Clinical Microbiology, v. 13, p. 919-933.
- Fekete, P. Z., J. Gerardin, E. Jacquemin, J. G. Mainil, and B. Nagy, 2002, Replicon typing of F18 fimbriae encoding plasmids of enterotoxigenic, and verotoxigenic *Escherichia coli* strains from porcine postweaning diarrhoea and oedema disease: Veterinary Microbiology, v. 85, p. 275-284.
- Feria, C., E. Ferreira, J. D. Correia, J. Goncalves, and M. Canica, 2002, Patterns and mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs in Portugal: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 49, p. 77-85.
- Fernandez, A. G., A. Cloeckaert, A. Bertini, K. Praud, B. Doublet, F.-X. Weill, and A. Carattolil, 2007, Comparative analysis of IncHI2 plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-2</sub> or *bla*<sub>CTX-M-9</sub> from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains isolated from poultry and humans: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 51, p. 4177-4180.
- Fernandez-Alarcon, C., R. S. Singer, and T. J. Johnson, 2011, Comparative genomics of multidrug resistance-encoding IncA/C plasmids from commensal and pathogenic *Escherichia coli* from Multiple animal sources: PLOS One, v. 6, p. 1-9.
- Finch, R. G., D. Greenwood, S. R. Norrby, and R. J. Whitley, 2003, Antibiotic and chemotherapy, Livingstone, Edinburgh, UK, Eds. Churchill Livingstone, 1000 pp.
- Fischer, J., I. Rodriguez, B. Baumann, E. Guiral, L. Beutin, A. Schroeter, A. Kaesbohrer, Y. Pfeifer, R. Helmuth, and B. Guerra, 2014, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-carrying *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from livestock and food in Germany: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 69, p. 2951-2958.
- Fischer, J., I. Rodriguez, S. Schmoger, A. Friese, U. Roesler, R. Helmuth, and B. Guerra, 2012, *Escherichia coli* producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 67, p. 1793-1795.
- Fischer, J., I. Rodriguez, S. Schmoger, A. Friese, U. Roesler, R. Helmuth, and B. Guerra, 2013a, *Salmonella enterica* subsp *enterica* producing VIM-1 carbapenemase isolated from livestock farms: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 68, p. 478-480.
- Fischer, J., S. Schmoger, S. Jahn, R. Helmuth, and B. Guerra, 2013b, NDM-1 carbapenemase-producing *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Corvallis isolated from a wild bird in Germany: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 68, p. 2954-2956.

- Fluit, A. C., 2005, Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*?: FEMS Immunology and Medical Microbiology, v. 43, p. 1-11.
- Folster, J. P., G. Pecic, S. Bolcen, L. Theobald, K. Hise, A. Carattoli, S. Zhao, P. F. McDermott, and J. M. Whichard, 2010, Characterization of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from humans in the United States: Foodborne Pathogens and Disease, v. 7, p. 181-187.
- Folster, J. P., G. Pecic, A. Singh, B. Duval, R. Rickert, S. Ayers, J. Abbott, B. McGlinchey, J. Bauer-Turpin, J. Haro, K. Hise, S. Zhao, P. J. Fedorka-Cray, J. Whichard, and P. F. McDermott, 2012, Characterization of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from food animals, retail meat, and humans in the United States 2009: Foodborne Pathogens and Disease, v. 9, p. 638-645.
- Fonseca, E. L., F. Dos Santos Freitas, V. V. Vieira, and A. C. P. Vicente, 2008, New *qnr* gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1: Emerging infectious diseases, v. 14, p. 1129-31.
- Fonseca, E. L., and A. C. P. Vicente, 2013, Epidemiology of *qnrVC* alleles and emergence out of the *Vibrionaceae* family: Journal of Medical Microbiology, v. 62, p. 1628-1630.
- Francia, M. V., A. Varsaki, M. P. Garcillan-Barcia, A. Latorre, C. Drainas, and F. de la Cruz, 2004, A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids: FEMS Microbiology Reviews, v. 28, p. 79-100.
- Franke, A. E., and D. B. Clewell, 1981, Evidence for conjugal transfer of a *Streptococcus faecalis* transposon (Tn916) from a chromosomal site in the absence of plasmid DNA: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, v. 45 Pt 1, p. 77-80.
- Franz, E., C. Veenman, A. H. A. M. van Hoek, A. d. R. Husman, and H. Blaak, 2015, Pathogenic *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases isolated from surface water and wastewater: Scientific Reports, v. 5, p. 1-9.
- Funnel, B. E., and G. J. Phillips, 2004, Plasmid biology: Washington, D. C., ASM Press, 638 pp.
- Gaastra, W., and A. M. Svennerholm, 1996, Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): Trends in Microbiology, v. 4, p. 444-452.
- Galler, H., G. Feierl, C. Petternel, F. F. Reinthaler, D. Haas, A. J. Grisold, J. Luxner, and G. Zarfel, 2014, KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harboring Enterobacteriaceae detected in an Austrian wastewater treatment plant: Clinical Microbiology and Infection, v. 20, p. O132-O134.
- Gao, L., J. Hu, X. Zhang, R. Ma, J. Gao, S. Li, M. Zhao, Z. Miao, and T. Chai, 2014, Dissemination of ESBL-producing *Escherichia coli* of chicken origin to the nearby river water: Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, v. 24, p. 279-285.
- Garcia, A., F. Navarro, E. Miro, B. Mirelis, S. Campoy, and P. Coll, 2005, Characterization of the highly variable region surrounding the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 56, p. 819-826.
- Garcia, A., F. Navarro, E. Miro, L. Villa, B. Mirelis, P. Coll, and A. Carattoli, 2007, Acquisition and diffusion of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene by R478-IncHI2 derivative plasmids: FEMS Microbiology Letters, v. 271, p. 71-77.
- Garcia-Fernandez, A., G. Chiaretto, A. Bertini, L. Villa, D. Fortini, A. Ricci, and A. Carattoli, 2008, Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 61, p. 1229-1233.
- Garcia-Fernandez, A., L. Villa, C. Carta, C. Venditti, A. Giordano, M. Venditti, C. Mancini, and A. Carattoli, 2012, *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 56, p. 2143-2145.
- Garcia-Fernandez, A., L. Villa, A. Moodley, H. Hasman, V. Miriagou, L. Guardabassi, and A. Carattoli, 2011, Multilocus sequence typing of IncN plasmids: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 66, p. 1987-1991.
- Garcillan-Barcia, M. P., M. V. Francia, and F. de la Cruz, 2009, The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification: FEMS Microbiology Reviews, v. 33, p. 657-687.
- Garrido, A., C. Seral, M. Jose Gude, C. Casado, M. Gonzalez-Dominguez, Y. Saenz, and F. Javier Castillo, 2014, Characterization of plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases in fecal colonizing patients in the hospital and community setting in Spain: Microbial Drug Resistance, v. 20, p. 301-304.
- Geser, N., R. Stephan, B. M. Korczak, L. Beutin, and H. Haechler, 2012, Molecular identification of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase genes from *Enterobacteriaceae* isolated from healthy human carriers in Switzerland: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 56, p. 1609-1612.
- Giakkoupi, P., A. Xanthaki, M. Kanelopoulou, A. Vlahaki, V. Miriagou, S. Kontou, E. Papafraggas, H. Malamou-Lada, L. S. Tzouveleki, N. J. Legakis, and A. C. Vatopoulos, 2003, VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals: Journal of Clinical Microbiology, v. 41, p. 3893-3896.
- Gibson, J. S., J. M. Morton, R. N. Cobbold, H. E. Sidjabat, L. J. Philippich, and D. J. Trott, 2008, Multidrug-resistant *E. coli* and *Enterobacter* extraintestinal infection in 37 dogs: Journal of Veterinary Internal Medicine, v. 22, p. 844-850.

- Giguère, S., J. F. Prescott, P. M. Dowling (eds.), 2013, Antimicrobial therapy in veterinary medicine: USA, John Wiley & Sons, Inc.
- Gilling, M. R., 2013, Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome: *Frontiers in Microbiology*, v. 4.
- Girlich, D., L. Poirel, A. Carattoli, I. Kempf, M.-F. Lartigue, A. Bertini, and P. Nordmann, 2007, Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 4681-4685.
- Giske, C. G., L. Gezelius, O. Samuelsen, M. Warner, A. Sundsfjord, and N. Woodford, 2011, A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin: *Clinical Microbiology and Infection*, v. 17, p. 552-556.
- Giufre, M., C. Graziani, M. Accogli, I. Luzzi, L. Busani, M. Cerquetti on behalf of the *Escherichia coli* Study Group, 2012, *Escherichia coli* of human and avian origin: detection of clonal groups associated with fluoroquinolone and multidrug resistance in Italy: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, p. 860-867.
- Gniadkowski, M., A. Palucha, P. Grzesiowski, and W. Hryniewicz, 1998, Outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric hospital in Warsaw, Poland: Clonal spread of the TEM-47 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing strain and transfer of a plasmid carrying the SHV5-like ESBL-encoding gene: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, p. 3079-3085.
- Gobel, A., A. Thomsen, C. S. McArdell, A. C. Alder, W. Giger, N. Theiss, D. Löffler, and T. A. Ternes, 2005, Extraction and determination of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in sewage sludge: *Journal of Chromatography A*, v. 1085, p. 179-189.
- Golebiewski, M., I. Kern-Zdanowicz, M. Zienkiewicz, M. Adamczyk, J. Zylinska, A. Baraniak, M. Gniadkowski, J. Bardowski, and P. Ceglowski, 2007, Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>CTX-M-3</sub>: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, p. 3789-3795.
- Golet, E. M., A. Strehler, A. C. Alder, and W. Giger, 2002, Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction: *Analytical Chemistry*, v. 74, p. 5455-5462.
- Gomez-Gomez, J. M., J. Blazquez, L. E. E. DelosMonteros, M. R. Baquero, F. Baquero, and J. L. Martinez, 1997, In vitro plasmid-encoded resistance to quinolones: *FEMS Microbiology Letters*, v. 154, p. 271-276.
- Gottlieb, S., D. I. Wigney, P. A. Martin, J. M. Norris, R. Malik, and M. Govendir, 2008, Susceptibility of canine and feline *Escherichia coli* and canine *Staphylococcus intermedius* isolates to fluoroquinolones: *Australian Veterinary Journal*, v. 86, p. 147-152.
- Gotz, A., R. Pukall, E. Smit, E. Tietze, R. Prager, H. Tschape, J. D. vanElsas, and K. Smalla, 1996, Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 2621-2628.
- Griffith, F., 1928, The significance of pneumococcal types: *The Journal of Hygiene*, v. 27, p. 113-59.
- Guardabassi, L., L. B. Jensen, and H. Kruse, 2008, *Antimicrobial use in animals.*, Oxford, UK., Blackwell Publishing, 240 pp.
- Gudeta, D. D., V. Bortolaia, A. Jayol, L. Poirel, P. Nordmann, and L. Guardabassi, 2016, *Chromobacterium* spp. harbour Ambler class A  $\beta$ -lactamases showing high identity with KPC: *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Guenther, S., K. Aschenbrenner, I. Stamm, A. Bethe, T. Semmler, A. Stubbe, M. Stubbe, N. Batsajkhan, Y. Glupczynski, L. H. Wieler, and C. Ewers, 2012a, Comparable high rates of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in birds of prey from Germany and Mongolia: *PLOS One*, v. 7, p. 1-6.
- Guenther, S., A. Bethe, A. Fruth, T. Semmler, R. G. Ulrich, L. H. Wieler, and C. Ewers, 2012b, Frequent combination of antimicrobial multiresistance and extraintestinal pathogenicity in *Escherichia coli* isolates from urban rats (*Rattus norvegicus*) in Berlin, Germany: *PLOS One*, v. 7, p. 1-10.
- Guenther, S., C. Ewers, and L. H. Wieler, 2011, Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution?: *Frontiers in Microbiology*, v. 2, p. 1-13.
- Guerin, E., G. Cambray, N. Sanchez-Alberola, S. Campoy, I. Erill, S. Da Re, B. Gonzalez-Zorn, J. Barbe, M.-C. Ploy, and D. Mazel, 2009, The SOS response controls integron recombination: *Science*, v. 324, p. 1034-1034.
- Guillard, T., A. Grillon, C. de Champs, C. Cartier, J. Madoux, B. Bercot, A.-L. Lebreil, A. Lozniewski, J. Riahi, V. Vernet-Garnier, and E. Cambau, 2014, Mobile insertion cassette elements found in small non-transmissible plasmids in *Proteaeae* may explain *qnrD* mobilization: *PLOS One*, v. 9, p. 1-8.

- Guo, Y.-F., W.-H. Zhang, S.-Q. Ren, L. Yang, D.-H. Lu, Z.-L. Zeng, Y.-H. Liu, and H.-X. Jiang, 2014, IncA/C plasmid-mediated spread of CMY-2 in multidrug-resistant *Escherichia coli* from food animals in China: PLOS One, v. 9, p. 1-7.
- Gupta, V., S. Sidhu, and J. Chander, 2012, Metallo- $\beta$ -lactamase producing nonfermentative gram-negative bacteria: An increasing clinical threat among hospitalized patients: Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, v. 5, p. 718-721.
- Gyles, C., and P. Boerlin, 2014, Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease: Veterinary Pathology, v. 51, p. 328-340.
- Hacker, J., L. Bender, M. Ott, J. Wingender, B. Lund, R. Marre, and W. Goebel, 1990, Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur *in vitro* and *in vivo* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates: Microbial Pathogenesis, v. 8, p. 213-225.
- Haenni, M., E. Saras, V. Metayer, C. Medaille, and J.-Y. Madec, 2014, High Prevalence of *bla*<sub>CTX-M-1</sub>/Inc11/ST3 and *bla*<sub>CMY-2</sub>/Inc11/ST2 plasmids in healthy urban dogs in France: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 58, p. 5358-5362.
- Hall, R. M., D. E. Brookes, and H. W. Stokes, 1991, Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point: Molecular Microbiology, v. 5, p. 1941-1959.
- Hall, R. M., and C. M. Collis, 1998, Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons: Drug Resistance Updates, v. 1, p. 109-119.
- Halova, D., I. Papousek, I. Jamborova, M. Masarikova, A. Cizek, N. Janecko, V. Oravcova, L. Zurek, A. B. Clark, A. Townsend, J. C. Ellis, and I. Literak, 2014, Plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Enterobacteriaceae* from American crows: High Prevalence of Bacteria with Variable *qnrB* Genes: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 58, p. 1257-1258.
- Hammerum, A. M., O. E. Heuer, H. D. Emborg, L. Bagger-Skjøt, V. F. Jensen, A. M. Rogues, R. L. Skov, Y. Agersø, C. T. Brandt, A. M. Seyfarth, A. Muller, K. Hovgaard, J. Ajufo, F. Bager, F. M. Aarestrup, N. Frimodt-Møller, H. C. Wegener, D. L. Monnet, 2007: Emerging Infectious Diseases, v. 13, p. 1632-1639.
- Hammerum, A. M., J. Larsen, V. D. Andersen, C. H. Lester, T. S. S. Skytte, F. Hansen, S. S. Olsen, H. Mordhorst, R. L. Skov, F. M. Aarestrup, and Y. Agerso, 2014, Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third-or fourth-generation cephalosporins: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 69, p. 2650-2657.
- Handel, N., S. Otte, M. Jonker, S. Brul, and B. H. ter Kuile, 2015, Factors That Affect Transfer of the Inc11  $\beta$ -lactam resistance plasmid pESBL-283 between *E-coli* strains: PLOS One, v. 10, p. 1-17.
- Hansen, K. H., V. Bortolaia, P. Damborg, and L. Guardabassi, 2014, Strain Diversity of CTX-M-producing *Enterobacteriaceae* in individual pigs: insights into the dynamics of shedding during the production cycle: Applied and Environmental Microbiology, v. 80, p. 6620-6626.
- Hansen, L. H., L. B. Jensen, H. I. Sorensen, and S. J. Sorensen, 2007, Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 60, p. 145-147.
- Hansen, L. H., E. Johannesen, M. Burmolle, A. H. Sorensen, and S. J. Sorensen, 2004, Plasmid-Encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 48, p. 3332-3337.
- Hanson, N. D., 2003, AmpC  $\beta$ -lactamases: what do we need to know for the future?: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 52, p. 2-4.
- Harmer, C. J., and R. M. Hall, 2015, The A to Z of A/C plasmids: Plasmid, v. 80, p. 63-82.
- Hasan, R., F. J. Cooke, S. Nair, B. N. Harish, and J. Wain, 2005, Typhoid and paratyphoid fever: Lancet, v. 366, p. 1603-1604.
- Hata, M., M. Suzuki, M. Matsumoto, M. Takahashi, K. Sato, S. Ibe, and K. Sakae, 2005, Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 49, p. 801-803.
- He, D., S. R. Partridge, J. Shen, Z. Zeng, L. Liu, L. Rao, L. Lv, and J.-H. Liu, 2013, CTX-M-123, a novel hybrid of the CTX-M-1 and CTX-M-9 group  $\beta$ -Lactamases recovered from *Escherichia coli* isolates in China: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 57, p. 4068-4071.
- Heck, K., E. G. De Marco, M. W. Duarte, S. P. Salamoni, and S. Van der Sand, 2015, Pattern of multiresistant to antimicrobials and heavy metal tolerance in bacteria isolated from sewage sludge samples from a composting process at a recycling plant in southern Brazil: Environmental Monitoring and Assessment, v. 187, p. 1-11.



- Hedges, R. W., N. Datta, Kontomic, P., and J. T. Smith, 1974, Molecular specificities of R factor-determined beta-lactamases: Correlation with plasmid compatibility: *Journal of Bacteriology*, v. 117, p. 56-62.
- Hering, J., K. Hille, C. Froemke, C. von Muenchhausen, M. Hartmann, B. Schneider, A. Friese, U. Roesler, R. Merle, and L. Kreienbrock, 2014, Prevalence and potential risk factors for the occurrence of cefotaxime resistant *Escherichia coli* in German fattening pig farms-A cross-sectional study: *Preventive Veterinary Medicine*, v. 116, p. 129-137.
- Hernandez, J., J. Bonnedahl, I. Eliasson, A. Wallensten, P. Comstedt, A. Johansson, S. Granholm, A. Melhus, B. Olsen, and M. Drobni, 2010, Globally disseminated human pathogenic *Escherichia coli* of O25b-ST131 clone, harbouring *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, found in Glaucous-winged gull at remote Commander Islands, Russia: *Environmental Microbiology Reports*, v. 2, p. 329-332.
- Hernandez, J., A. Johansson, J. Stedt, S. Bengtsson, A. Porczak, S. Granholm, D. Gonzalez-Acuna, B. Olsen, J. Bonnedahl, and M. Drobni, 2013, Characterization and comparison of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) resistance genotypes and population structure of *Escherichia coli* isolated from Franklin's gulls (*Leucophaeus pipixcan*) and humans in Chile: *PLOS One*, v. 8, p. 1-9.
- Ho, P.-L., W.-U. Lo, E. L. Lai, P. Y. Law, S. M. Leung, Y. Wang, and K.-H. Chow, 2015, Clonal diversity of CTX-M-producing, multidrug-resistant *Escherichia coli* from rodents: *Journal of Medical Microbiology*, v. 64, p. 185-190.
- Hobman, J. L., A. M. M. Essa, and N. L. Brown, 2002, Mercury resistance (*mer*) operons in enterobacteria: *Biochemical Society Transactions*, v. 30, p. 719-722.
- Hooper, D. C., 2000, Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones: *Clinical Infectious Diseases*, v. 31, p. S24-S28.
- Hooper, D. C., and E. Rubinstein, 2003, *Quinolone antimicrobial agents*: Washington, D. C., ASM Press, 485 pp.
- Hopkins, K. L., M. J. Batchelor, E. Liebana, A. P. Deheer-Graham, and E. J. Threlfall, 2006, Characterisation of CTX-M and *AmpC* genes in human isolates of *Escherichia coli* identified between 1995 and 2003 in England and Wales: *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 28, p. 180-192.
- Hordijk, J., A. Schoormans, M. Kwakernaak, B. Duim, E. Broens, C. Dierikx, D. Mevius, and J. A. Wagenaar, 2013, High prevalence of fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase/*AmpC*-producing *Enterobacteriaceae* in cats and dogs: *Frontiers in Microbiology*, v. 4, p. 1-5.
- Hornish, R. E., and S. F. Kotarski, 2002, Cephalosporins in veterinary medicine - Ceftiofur use in food animals: *Current topics in medicinal chemistry*, v. 2, p. 717-31.
- Hornsey, M., L. Phee, and D. W. Wareham, 2011, A novel variant, NDM-5, of the New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST648 isolate recovered from a patient in the United Kingdom: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, p. 5952-5954.
- Hrabak, J., 2007, Clinically important  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria: *AmpC: Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie : Casopis Spolecnosti pro epidemiologii a mikrobiologii Ceske lekarske spolecnosti J.E. Purkyne*, v. 56, p. 155-65.
- Hrabak, J., V. Studentova, V. Jakubu, V. Adamkova, L. Dvorakova, M. Balejova, T. Bergerova, E. Chmelarova, P. Jezek, P. Kabelikova, M. Kolar, P. Paterova, R. Tejkalova, C. Papagiannitsis, and H. Zemlickova, 2015, Prevalence study on carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Czech hospitals - results from Czech Part of European Survey on Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): *Epidemiologie Mikrobiologie Imunologie*, v. 64, p. 87-91.
- Hrabak, J., R. Walkova, V. Studentova, E. Chudackova, and T. Bergerova, 2011a, Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-Time of flight Mass spectrometry: *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, p. 3222-3227.
- Hrabak, J., H. Zemlickova, T. Bergerova, and P. Urbaskova, 2011b, Interpretation of the susceptibility test results in enterobacteria producing 3rd-and 4th-generation cephalosporin- or carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases: *Epidemiologie Mikrobiologie Imunologie*, v. 60, p. 4-9.
- Hrabák J., B.T. Bergerová, H. Žemličková, P. Urbášková, 2009, Detekce širokospektrých  $\beta$ -laktamáz (ESBL),  $\beta$ -laktamáz *AmpC*, metalo- $\beta$ -laktamáz (MBL) a karbapenemáz KPC u gramnegativních tyček, *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ, PRAHA)*, p. 100-106.
- Huang, T.-W., T.-L. Chen, Y.-T. Chen, T.-L. Lauderdale, T.-L. Liao, Y.-T. Lee, C.-P. Chen, Y.-M. Liu, A.-C. Lin, Y.-H. Chang, K.-M. Wu, R. Kirby, J.-F. Lai, M.-C. Tan, L.-K. Siu, C.-M. Chang, C.-P. Fung, and S.-F. Tsai, 2013, Copy number change of the NDM-1 sequence in a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate: *PLOS One*, v. 8, p. 1-12.
- Humeniuk, C., G. Arlet, V. Gautier, P. Grimont, R. Labia, and A. Philippon, 2002,  $\beta$ -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M Types: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, p. 3045-3049.

- Hunter, P. A., S. Dawson, G. L. French, H. Goossens, P. M. Hawkey, E. J. Kuijper, D. Nathwani, D. J. Taylor, C. J. Teale, R. E. Warren, M. H. Wilcox, N. Woodford, M. W. Wulf, and L. J. V. Piddock, 2010, Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, p. 13-117.
- Husickova, V., L. Cekanova, M. Chroma, M. Htoutou-Sedlakova, K. Hricova, and M. Kolar, 2012, Carriage of ESBL- and AmpC-positive *Enterobacteriaceae* in the gastrointestinal tract of community subjects and hospitalized patients in the Czech Republic: *Biomedical Papers-Olomouc*, v. 156, p. 348-353.
- Iaconis, J. P., and C. C. Sanders, 1990, Purification and characterization of inducible  $\beta$ -lactamases in *Aeromonas* spp: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 34, p. 44-51.
- Ito, H., Y. Arakawa, S. Ohsuka, R. Wacharotayankun, N. Kato, and M. Ohta, 1995, Plasmid-mediated dissemination of the metallo- $\beta$  -lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>* among clinically isolated strains of *Serratia. marcescens*: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, p. 824-829.
- Izdebski, R., A. Baraniak, J. Fiett, A. Adler, M. Kazma, J. Salomon, C. Lawrence, A. Rossini, A. Salvia, J. Vidal Samsó, J. Fierro, M. Paul, Y. Lerman, S. Malhotra-Kumar, C. Lammens, H. Goossens, W. Hryniewicz, C. Brun-Buisson, Y. Carmeli, M. Gniadkowski, on behalf of the MOSAR WP2 and WP5 Study Groups , 2013, Clonal structure, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, and acquired AmpC-Type cephalosporinases of *Escherichia coli* populations colonizing patients in rehabilitation centers in four countries: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, p. 309-316.
- Jacoby, G., V. Cattoir, D. Hooper, L. Martinez-Martinez, P. Nordmann, A. Pascual, L. Poirel, and M. Wang, 2008, *qnr* gene nomenclature: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, p. 2297-2299.
- Jacoby, G. A., 2009, AmpC  $\beta$ -lactamases: *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, p. 161-182.
- Jacoby, G. A., C. M. Griffin, and D. C. Hooper, 2011, *Citrobacter* spp. as a source of *qnrB* alleles: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, p. 4979-4984.
- Jacoby, G. A., J. Strahilevitz, and D. C. Hooper, 2014, Plasmid-mediated quinolone resistance: *Microbiology spectrum*, v. 2, p. 1-24.
- Jacoby, G. A., K. E. Walsh, D. M. Mills, V. J. Walker, H. Oh, A. Robicsek, and D. C. Hooper, 2006, *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 1178-1182.
- Jamborova, I., M. Dolejska, J. Vojtech, S. Guenther, R. Uricariu, J. Drozdowska, I. Papousek, K. Pasekova, W. Meissner, J. Hordowski, A. Cizek, and I. Literak, 2015, Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and fluoroquinolones in various *Escherichia coli* sequence types isolated from rooks wintering in Europe: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, p. 648-657.
- Janatova, M., K. Albrechtova, K. J. Petrzekova, M. Dolejska, I. Papousek, M. Masarikova, A. Cizek, A. Todd, K. Shutt, B. Kalousova, I Profousova, D. Modry, I. Literak, 2014, Antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae from humans and wildlife in Dzanga-Sangha Protected Area, Central African Republic: *Veterinary Microbiology*, v. 171, p. 422-431.
- Jezirowski, A., and D. M. Gordon, 2007, Evolution of microcin V and colicin Ia plasmids in *Escherichia coli*: *Journal of Bacteriology*, v. 189, p. 7045-7052.
- Johnson, J. R., and T. A. Russo, 2002a, Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E coli*": *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 139, p. 155-162.
- Johnson, J. R., and T. A. Russo, 2002b, Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections: *Journal of Infectious Diseases*, v. 186, p. 859-864.
- Johnson, J. R., V. Tchesnokova, B. Johnston, C. Clabots, P. L. Roberts, M. Billig, K. Riddell, P. Rogers, X. Qin, S. Butler-Wu, L. B. Price, M. Aziz, M.-H. Nicolas-Chanoine, C. DebRoy, A. Robicsek, G. Hansen, C. Urban, J. Platell, D. J. Trott, G. Zhanel, S. J. Weissman, B. T. Cookson, F. C. Fang, A. P. Limaye, D. Scholes, S. Chattopadhyay, D. C. Hooper, and E. V. Sokurenko, 2013a, Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*: *Journal of Infectious Diseases*, v. 207, p. 919-928.
- Johnson, J. W., J. F. Fisher, and S. Mobashery, 2013b, Bacterial cell-wall recycling: *Antimicrobial Therapeutics Reviews: Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1277, p. 54-75.
- Johnson, T. J., E. M. Bielak, D. Fortini, L. H. Hansen, H. Hasman, C. Debroy, L. K. Nolan, and A. Carattoli, 2012a, Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant *Enterobacteriaceae*: *Plasmid*, v. 68, p. 43-50.
- Johnson, T. J., C. M. Logue, J. R. Johnson, M. A. Kuskowski, J. S. Sherwood, H. J. Barnes, C. DebRoy, Y. M. Wannemuehler, M. Obata-Yasuoka, L. Spanjaard, and L. K. Nolan, 2012b, Associations between multidrug resistance, plasmid content, and virulence potential among extraintestinal pathogenic and commensal *Escherichia coli* from humans and poultry: *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 9, p. 37-46.
- Johnson, T. J., and L. K. Nolan, 2009, Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 73, p. 750-774.

- Johnson, T. J., J. Skyberg, and L. K. Nolan, 2004, Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from an *Escherichia coli* isolate incriminated in Avian colibacillosis: *Avian Diseases*, v. 48, p. 351-360.
- Johnson, T. J., Y. M. Wannemuehler, J. A. Scaccianoce, S. J. Johnson, and L. K. Nolan, 2006, Complete DNA sequence comparative genomics, and prevalence of an IncHI2 plasmid occurring among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 3929-3933.
- Johnson, T. J., Y. M. Wannemuehler, S. J. Johnson, C. M. Logue, D. G. White, C. Doetkott, and L. K. Nolan, 2007, Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 1976-1983.
- Jones-Dias, D., V. Manageiro, A. P. Francisco, A. P. Martins, G. Domingues, D. Louro, E. Ferreira, and M. Canica, 2013, Assessing the molecular basis of transferable quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from food-producing animals and food products: *Veterinary Microbiology*, v. 167, p. 523-531.
- Jorgensen, T. S., A. S. Kiil, M. A. Hansen, S. J. Sorensen, and L. H. Hansen, 2015, Current strategies for mobilome research: *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 1-6.
- Jukes, T. H., E. L. R. Stokstad, R. R. Taylor, T. J. Cunha, H. M. Edwards, and G. B. Meadows, 1950, Growth-promoting effect of aureomycin on pigs: *Archives of Biochemistry*, v. 26, p. 324-325.
- Kasap, M., S. Torol, F. Kolayli, D. Dundar, and H. Vahaboglu, 2013, OXA-162, a novel variant of OXA-48 displays extended hydrolytic activity towards imipenem, meropenem and doripenem: *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 28, p. 990-996.
- Kayama, S., N. Shigemoto, R. Kuwahara, K. Oshima, H. Hirakawa, J. Hisatsune, T. Jove, H. Nishio, K. Yamasaki, Y. Wada, T. Ueshimo, T. Miura, T. Sueda, M. Onodera, M. Yokozaki, M. Hattori, H. Ohge, and M. Sugai, 2015, Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid encoding IMP-6 and CTX-M-2 from emerging carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in Japan: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, p. 1356-1359.
- Khan, S. A., 1997, Rolling-circle replication of bacterial plasmids: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, p. 442-455.
- Khan, S. A., 2000, Plasmid rolling-circle replication: recent developments: *Molecular Microbiology*, v. 37, p. 477-484.
- Kieser T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, D. A. Hopwood, 2000, *Practical streptomyces genetics*: Norwich: John Innes Foundation, 613 pp.
- Kim, S. R., and T. Komano, 1997, The plasmid R64 thin pilus identified as a type IV pilus: *Journal of Bacteriology*, v. 179, p. 3594-3603.
- Kliebe, C., B. A. Nies, J. F. Meyer, R. M. Tolxdorffneutzling, and B. Wiedemann, 1985, Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 28, p. 302-307.
- Klimes, J., M. Machalkova, M. Dolejska, A. Cizek, D. Janoszowska, P. Alexa, K. Albrechtova, J. Vojtech, I. Literak, 2013, *Escherichia coli*-producing extended-spectrum beta-lactamases CTX-M-15 in a captive South American tapir (*Tapirus terrestris*): *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 44, p. 173-175.
- Kobayashi, I., 2001, Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution: *Nucleic Acids Research*, v. 29, p. 3742-3756.
- Koch, A. L., 2003, Bacterial wall as target for attack: Past, present, and future research: *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, p. 673-687.
- Koenig, J. E., Y. Boucher, R. L. Charlebois, C. Nesbo, O. Zhaxybayeva, E. Baptiste, M. Spencer, M. J. Joss, H. W. Stokes, and W. F. Doolittle, 2008, Integron-associated gene cassettes in Halifax Harbour: assessment of a mobile gene pool in marine sediments: *Environmental Microbiology*, v. 10, p. 1024-1038.
- Kojima, A., Y. Ishii, K. Ishihara, H. Esaki, T. Asai, C. Oda, Y. Tamura, T. Takahashi, and K. Yamaguchi, 2005, Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia Coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: Report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring program: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 3533-3537.
- Kola, A., B. Piening, U.-F. Pape, W. Veltzke-Schlieker, M. Kaase, C. Geffers, B. Wiedenmann, and P. Gastmeier, 2015, An outbreak of carbapenem-resistant OXA-48 - producing *Klebsiella pneumonia* associated to duodenoscopy: *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, v. 4, p. 1-8.
- Kolar, M., J. Bardon, M. Chroma, K. Hricova, T. Stosova, P. Sauer, and D. Koukalova, 2010, ESBL and AmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in poultry in the Czech Republic, *Veterinarni Medicina*, v. 55, p. 119-124.
- Kolenda, R., M. Burdukiewicz, and P. Schierack, 2015, A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 5, p. 1-12.

- Komp Lindgren, P., A. Karlsson, and D. Hughes, 2003, Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections: Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 47, p. 3222-3232.
- Kuemmerer, K., 2009a, Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I: Chemosphere, v. 75, p. 417-434.
- Kuemmerer, K., 2009b, Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II: Chemosphere, v. 75, p. 435-441.
- Kumar, A., and H. P. Schweizer, 2005, Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake: Advanced Drug Delivery Reviews, v. 57, p. 1486-1513.
- Kummerer, K., and A. Henninger, 2003, Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent: Clinical Microbiology and Infection, v. 9, p. 1203-1214.
- Lartigue, M. F., L. Poirel, D. Aubert, and P. Nordmann, 2006, In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring  $\beta$ -Lactamase Gene *bla*<sub>CTX-M</sub> of *Kluyvera ascorbata*: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 50, p. 1282-1286.
- Lascols, C., I. Podglajen, C. Verdet, V. Gautier, L. Gutmann, C.-J. Soussy, E. Collatz, and E. Cambau, 2008, A plasmid-borne *Shewanella algae* gene, *qnrA3*, and its possible transfer in vivo between *Kluyvera ascorbata* and *Klebsiella pneumoniae*: Journal of Bacteriology, v. 190, p. 5217-5223.
- Laupland, K. B., D. L. Church, J. Vidakovich, M. Mucenski, and J. D. D. Pitout, 2008a, Community-onset extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli*: Importance of international travel: Journal of Infection, v. 57, p. 441-448.
- Laupland, K. B., D. B. Gregson, D. L. Church, T. Ross, and J. D. D. Pitout, 2008b, Incidence, risk factors and outcomes of *Escherichia coli* bloodstream infections in a large Canadian region: Clinical Microbiology and Infection, v. 14, p. 1041-1047.
- Lawrence, J. G., and H. Ochman, 1998, Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 95, p. 9413-9417.
- Lederberg, J., and E. L. Tatum, 1953, Sex in bacteria - Genetic Studies, 1945-1952: Science, v. 118, p. 169-175.
- Lee, K., J. H. Yum, D. G. Yong, H. M. Lee, H. D. Kim, J. D. Docquier, G. M. Rossolini, and Y. S. Chong, 2005, Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, *blas*<sub>SIM-1</sub>, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* Clinical isolates from Korea: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 49, p. 4485-4491.
- Leshner, G. Y., M. D. Gruett, E. J. Froelich, R. P. Brundage, and J. H. Bailey, 1962, 1,8-Naphthyridine derivatives - a new class of chemotherapeutic agents: Journal of Medicinal Chemistry, v. 5, p. 1063-1065.
- Leverstein-van Hall, M. A., C. M. Dierikx, J. C. Stuart, G. M. Voets, M. P. van den Munckhof, A. van Essen-Zandbergen, T. Platteel, A. C. Fluit, N. van de Sande-Bruinsma, J. Scharinga, M. J. M. Bonten, D. J. Mevius, and E. S. G. Natl, 2011, Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains: Clinical Microbiology and Infection, v. 17, p. 873-880.
- Lewis, J. S., II, M. Herrera, B. Wickes, J. E. Patterson, and J. H. Jorgensen, 2007, First report of the emergence of CTX-M-Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a US Health Care System: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 51, p. 4015-4021.
- Li, L., B. Wang, S. Feng, J. Li, C. Wu, Y. Wang, X. Ruan, and M. Zeng, 2014, Prevalence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from chickens in Anhui province, China: PLOS One, v. 9, p. 1-6.
- Li, S., W. Song, Y. Zhou, Y. Tang, Y. Gao, and Z. Miao, 2015, Spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from a swine farm to the receiving river: Environmental Science and Pollution Research, v. 22, p. 13033-13037.
- Liao, X.-P., J. Xia, L. Yang, L. Li, J. Sun, Y.-H. Liu, and H.-X. Jiang, 2015, Characterization of CTX-M-14-producing *Escherichia coli* from food-producing animals: Frontiers in Microbiology, v. 6, p. 1-8.
- Liebana, E., M. Batchelor, K. L. Hopkins, F. A. Clifton-Hadley, C. J. Teale, A. Foster, L. Barker, E. J. Threlfall, and R. H. Davies, 2006, Longitudinal farm study of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-mediated resistance: Journal of Clinical Microbiology, v. 44, p. 1630-1634.
- Liebert, C. A., R. M. Hall, and A. O. Summers, 1999, Transposon Tn21, flagship of the Floating Genome: Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 63, p. 507-522.
- Lim, H. M., J. J. Pene, and R. W. Shaw, 1988, Cloning, nucleotide-sequence, and expression of the *Bacillus-cereus* 5/B/6  $\beta$ -lactamase-II structural gene: Journal of Bacteriology, v. 170, p. 2873-2878.
- Lin, Y.-T., Y.-J. Pan, T.-L. Lin, C.-P. Fung, and J.-T. Wang, 2015, Transfer of CMY-2 cephalosporinase from *Escherichia coli* to virulent *Klebsiella pneumoniae* causing a recurrent liver abscess: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 59, p. 5000-5002.
- Linares, J. F., I. Gustafsson, F. Baquero, J. L. Martinez, 2006, Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.103, p. 19484-19489.

- Lindberg, R. H., K. Bjorklund, P. Rendahl, M. I. Johansson, M. Tysklind, and B. A. V. Andersson, 2007, Environmental risk assessment of antibiotics in the Swedish environment with emphasis on sewage treatment plants: *Water Research*, v. 41, p. 613-619.
- Literak, I., M. Dolejska, A. Cizek, C. A. T. Djigo, A. Konecny, and P. Koubek, 2009, Reservoirs of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae among animals sympatric to humans in Senegal: extended-spectrum beta-lactamases in bacteria in a black rat (*Rattus rattus*): *African Journal of Microbiology Research*, v. 3, p. 751-754.
- Literak, I., M. Dolejska, D. Janoszowska, J. Hrusakova, W. Meissner, H. Rzycka, S. Bzoma, and A. Cizek, 2010a, Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea coast of Poland: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, p. 8126-8134.
- Literak, I., M. Dolejska, T. Radimersky, J. Klimes, M. Friedman, F. M. Aarestrup, H. Hasman, and A. Cizek, 2010b, Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars: *Journal of Applied Microbiology*, v. 108, p. 1702-1711.
- Literak, I., M. Micudova, D. Tausova, A. Cizek, M. Dolejska, I. Papousek, J. Prochazka, J. Vojtech, F. Borleis, L. Guardone, S. Guenther, J. Hordowski, C. Lejas, W. Meissner, B. Fuertes Marcos, and M. Tucakov, 2012, Plasmid-mediated quinolone resistance genes in fecal bacteria from rooks commonly wintering throughout Europe: *Microbial Drug Resistance*, v. 18, p. 567-573.
- Literak, I., R. Petro, M. Dolejska, E. Gruberova, H. Dobiasova, J. Petr, and A. Cizek, 2011, Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy urban children of two age groups in relation to their antibiotic therapy: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, p. 3005-3007.
- Literak, I., T. Reitschmied, D. Bujnakova, M. Dolejska, A. Cizek, J. Bardou, L. Pokludova, P. Alexa, D. Halova, and I. Jamborova, 2013, Broilers as a source of quinolone-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in the Czech Republic: *Microbial Drug Resistance*, v. 19, p. 57-63.
- Liu, L., D. He, L. Lv, W. Liu, X. Chen, Z. Zeng, S. R. Partridge, and J.-H. Liu, 2015, *bla*<sub>CTX-M-1/9/1</sub> hybrid genes may have been generated from *bla*<sub>CTX-M-15</sub> on an IncI2 plasmid: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, p. 4464-70.
- Livermore, D. M., 1995,  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance: *Clinical Microbiology Reviews*, v. 8, p. 557-584.
- Loncaric, I., G. L. Stalder, K. Mehinagic, R. Rosengarten, F. Hoelzl, F. Knauer, and C. Walzer, 2013, Comparison of ESBL - and AmpC producing *Enterobacteriaceae* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from migratory and resident population of rooks (*Corvus frugilegus*) in Austria: *PLOS One*, v. 8, p. 1-8.
- Lytsy, B., L. Sandegren, E. Tano, E. Torell, D. I. Andersson, and A. S. A. Melhus, 2008, The first major extended-spectrum  $\beta$ -lactamase outbreak in Scandinavia was caused by clonal spread of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-15: *APMIS*, v. 116, p. 302-308.
- Ma, L., L. K. Siu, and P.-L. Lu, 2011, Effect of spacer sequences between *bla*<sub>CTX-M</sub> and *ISEcp1* on *bla*<sub>CTX-M</sub> expression: *Journal of Medical Microbiology*, v. 60, p. 1787-1792.
- Maddox, T. W., P. D. Clegg, P. J. Diggle, A. L. Wedley, S. Dawson, G. L. Pinchbeck, and N. J. Williams, 2012a, Cross-sectional study of antimicrobial-resistant bacteria in horses. Part 1: Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: *Equine Veterinary Journal*, v. 44, p. 289-296.
- Maddox, T. W., G. L. Pinchbeck, P. D. Clegg, A. L. Wedley, S. Dawson, and N. J. Williams, 2012b, Cross-sectional study of antimicrobial-resistant bacteria in horses. Part 2: Risk factors for faecal carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in horses: *Equine Veterinary Journal*, v. 44, p. 297-303.
- Madec, J.-Y., L. Poirel, E. Saras, A. Gourguechon, D. Girlich, P. Nordmann, and M. Haenni, 2012, Non-ST131 *Escherichia coli* from cattle harbouring human-like *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-carrying plasmids: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, p. 578-581.
- Magiorakos, A. P., A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens, A. Vatopoulos, J. T. Weber, and D. L. Monnet, 2012, Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance: *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, p. 268-281.
- Mahillon, J., and M. Chandler, 1998, Insertion sequences: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, p. 725-774.
- Mahillon, J., C. Leonard, and M. Chandler, 1999, IS elements as constituents of bacterial genomes: *Research in Microbiology*, v. 150, p. 675-687.

- Mainil, J., 2013, *Escherichia coli* virulence factors: Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 152, p. 2-12.
- Manges, A. R., and J. R. Johnson, 2012, Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections: Clinical Infectious Diseases, v. 55, p. 712-719.
- Masarikova, M., I. Manga, A. Cizek, M. Dolejska, V. Oravcova, P. Myskova, R. Karpiskova, I. Literak, 2016, *Salmonella enterica* resistant to antimicrobials in wastewater effluents and black-headed gulls in the Czech Republic: Science of the Total Environment, v. 542, p. 102-107.
- Marks, S. L., S. C. Rankin, B. A. Byrne, and J. S. Weese, 2011, Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control: Journal of Veterinary Internal Medicine, v. 25, p. 1195-1208.
- Marshall, C. G., G. Broadhead, B. K. Leskiw, and G. D. Wright, 1997, D-Ala-D-Ala ligases from glycopeptide antibiotic-producing organisms are highly homologous to the enterococcal vancomycin-resistance ligases VanA and VanB: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 94, p. 6480-6483.
- Marti, E., E. Variatza, and J. L. Balcazar, 2014, Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment: Clinical Microbiology and Infection, v. 20, p. O456-O459.
- Martin, D., S. Fougnot, F. Grobost, S. Thibaut-Jovelin, F. Ballereau, T. Gueudet, D. de Mouy, J. Robert, and O. N.-v. Network, 2016, Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in community-onset urinary tract infections in France in 2013: Journal of Infection, v. 72, p. 201-206.
- Martinez-Martinez, L., 2008, Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and the permeability barrier: Clinical Microbiology and Infection, v. 14, p. 82-89.
- Martinez-Martinez, L., A. Pascual, and G. A. Jacoby, 1998, Quinolone resistance from a transferable plasmid: Lancet, v. 351, p. 797-799.
- Mascaretti, O. A., 2003, Bacteria versus antimicrobial agents: an Integrated approach : Washington, D.C., ASM Press, 393 pp.
- Maslanova, I., J. Doskar, M. Varga, L. Kuntova, J. Muzik, D. Maluskova, V. Ruzickova, and R. Pantucek, 2013, Bacteriophages of *Staphylococcus aureus* efficiently package various bacterial genes and mobile genetic elements including SCCmec with different frequencies: Environmental Microbiology Reports, v. 5, p. 66-73.
- Mataseje, L. F., P. J. Baudry, G. G. Zhanel, D. W. Morck, R. R. Read, M. Louie, and M. R. Mulvey, 2010, Comparison of CMY-2 plasmids isolated from human, animal, and environmental *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from Canada: Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 67, p. 387-391.
- Matsumoto, Y., F. Ikeda, T. Kamimura, Y. Yokota, and Y. Mine, 1988, Novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase from *Escherichia-Coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 32, p. 1243-1246.
- Mazel, D., B. Dychinco, V. A. Webb, and J. Davies, 1998, A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome: Science, v. 280, p. 605-608.
- McIntosh, D., M. Cunningham, B. Ji, F. A. Fekete, E. M. Parry, S. E. Clark, Z. B. Zalinger, I. C. Gilg, G. R. Danner, K. A. Johnson, M. Beattie, and R. Ritchie, 2008, Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 61, p. 1221-1228.
- Melano, R., A. Petroni, A. Garutti, H. A. Saka, L. Mange, F. Pasteran, M. Rapoport, A. Rossi, and M. Galas, 2002, New carbenicillin-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase (CARB-7) from *Vibrio cholerae* Non-O1, Non-O139 strains encoded by the VCR region of the *V. cholerae* genome: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 46, p. 2162-2168.
- Meunier, D., E. Jouy, C. Lazizzera, M. Kobisch, and J.-Y. Madec, 2006, CTX-M-1- and CTX-M-15-type  $\beta$ -lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France: International Journal of Antimicrobial Agents, v. 28, p. 402-407.
- Meyer, R., 2009, Replication and conjugative mobilization of Broad Host-range IncQ plasmids: Plasmid, v. 62, p. 57-70.
- Micenkova, L., P. Siskova, J. Bosak, I. Jamborova, L. Cernohorska, and D. Smajs, 2014, Characterization of human uropathogenic ESBL-producing *Escherichia coli* in the Czech Republic: Spread of CTX-M-27-producing strains in a University hospital: Microbial Drug Resistance, v. 20, p. 610-617.
- Michael, C. A., M. R. Gillings, A. J. Holmes, L. Hughes, N. R. Andrew, M. P. Holley, and H. W. Stokes, 2004, Mobile gene cassettes: A fundamental resource for bacterial evolution: American Naturalist, v. 164, p. 1-12.

- Miller, C., L. E. Thomsen, C. Gaggero, R. Mosseri, H. Ingmer, and S. N. Cohen, 2004, SOS response induction by  $\beta$ -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality: *Science*, v. 305, p. 1629-1631.
- Minarini, L. A. R., and A. L. C. Darini, 2012, Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in *Enterobacteriaceae* isolates from Brazil: *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 1309-1314.
- Minh-Duy, P., and J. Wain, 2008, IncHI plasmids, a dynamic link between resistance and pathogenicity: *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 2, p. 272-278.
- Minot, S., R. Sinha, J. Chen, H. Li, S. A. Keilbaugh, G. D. Wu, J. D. Lewis, and F. D. Bushman, 2011, The human gut virome: Inter-individual variation and dynamic response to diet: *Genome Research*, v. 21, p. 1616-1625.
- Mnif, B., S. Vimont, A. Boyd, E. Bourit, B. Picard, C. Branger, E. Denamur, and G. Arlet, 2010, Molecular characterization of addiction systems of plasmids encoding extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli*: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, p. 1599-1603.
- Modi, S. R., H. H. Lee, C. S. Spina, and J. J. Collins, 2013, Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome: *Nature*, v. 499, p. 219-222.
- Monteiro, J., R. H. Widen, A. C. C. Pignatari, C. Kubasek, and S. Silbert, 2012, Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, p. 906-909.
- Moodley, A., and L. Guardabassi, 2009, Transmission of IncN Plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, p. 1709-1711.
- Moore, P. R., A. Evenson, T. D. Luckey, E. McCoy, C. A. Elvehjem, and E. B. Hart, 1946, Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick: *Journal of Biological Chemistry*, v. 165, p. 437-441.
- Morikawa, K., A. J. Takemura, Y. Inose, M. Tsai, T. Le Thuy Nguyen, T. Ohta, and T. Msadek, 2012, Expression of a cryptic secondary sigma factor gene unveils natural competence for DNA transformation in *Staphylococcus aureus*: *PLOS Pathogens*, v. 8, p. 1-20.
- Mourao, J., C. Novais, J. Machado, L. Peixe, and P. Antunes, 2015, Metal tolerance in emerging clinically relevant multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12: i:- clones circulating in Europe: *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 45, p. 610-616.
- Mulvey, M. R., E. Susky, M. McCracken, D. W. Morck, and R. R. Read, 2009, Similar cefoxitin-resistance plasmids circulating in *Escherichia coli* from human and animal sources: *Veterinary Microbiology*, v. 134, p. 279-287.
- Muniesa, M., M. Colomer-Lluch, and J. Jofre, 2013, Potential impact of environmental bacteriophages in spreading antibiotic resistance genes: *Future Microbiology*, v. 8, p. 739-751.
- Munshi, M. H., D. A. Sack, K. Haider, Z. U. Ahmed, M. M. Rahaman, and M. G. Morshed, 1987, Plasmid-mediated resistance to nalidixic-acid in *Shigella dysenteriae* type-1: *Lancet*, v. 2, p. 419-421.
- Naas, T., G. Cuzon, M.-V. Villegas, M.-F. Lartigue, J. P. Quinn, and P. Nordmann, 2008, Genetic structures at the origin of acquisition of the  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>KPC</sub> gene: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, p. 1257-1263.
- Naas, T., Y. Mikami, T. Imai, L. Poirel, and P. Nordmann, 2001, Characterization of In53, a class 1 plasmid- and Composite Transposon-Located Integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes: *Journal of Bacteriology*, v. 183, p. 235-249.
- Nagy, B., and P. Z. Fekete, 2005, Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine: *International Journal of Medical Microbiology*, v. 295, p. 443-454.
- Nagy, Z., and M. Chandler, 2004, Regulation of transposition in bacteria: *Research in Microbiology*, v. 155, p. 387-398.
- Nakahara, H., T. Ishikawa, Y. Sarai, I. Kondo, H. Kozukue, and S. Silver, 1977, Linkage of mercury, cadmium, and arsenate and drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 33, p. 975-976.
- Nakazato, G., T. A. de Campos, E. G. Stehling, M. Brocchi, and W. D. da Silveira, 2009, Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC): *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 29, p. 479-486.
- Nelson, M., S. H. Jones, C. Edwards, and J. C. Ellis, 2008, Characterization of *Escherichia coli* populations from gulls, landfill trash, and wastewater using ribotyping: *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 81, p. 53-63.
- Nesme, J., and P. Simonet, 2015, The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria: *Environmental Microbiology*, v. 17, p. 913-930.
- Nicolas-Chanoine, M.-H., X. Bertrand, and J.-Y. Madec, 2014, *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group: *Clinical Microbiology Reviews*, v. 27, p. 543-574.
- Nield, B. S., A. J. Holmes, M. R. Gillings, G. D. Recchia, B. C. Mabbutt, K. M. H. Nevalainen, and H. W. Stokes, 2001, Recovery of new integron classes from environmental DNA: *FEMS Microbiology Letters*, v. 195, p. 59-65.
- Nikaido, H., 1996, Multidrug Efflux Pumps of Gram-negative bacteria: *Journal of Bacteriology*, v. 178, p. 5853-5859.

- Nikaido, H., 2003, Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, p. 593-656.
- Nikaido, H., and Y. Takatsuka, 2009, Mechanisms of RND multidrug efflux pumps: *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, v. 1794, p. 769-781.
- Nordmann, P., 2014, Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Overview of a major public health challenge: *Medecine Et Maladies Infectieuses*, v. 44, p. 51-56.
- Nordmann, P., L. Dortet, and L. Poirel, 2012a, Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm!: *Trends in Molecular Medicine*, v. 18, p. 263-272.
- Nordmann, P., M.-F. Lartigue, and L. Poirel, 2008,  $\beta$ -lactam induction of ISEcp1B-mediated mobilization of the naturally occurring *bla*<sub>CTX-M</sub>  $\beta$ -lactamase gene of *Kluyvera ascorbata*: *FEMS Microbiology Letters*, v. 288, p. 247-249.
- Nordmann, P., and L. Poirel, 2005, Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, p. 463-469.
- Nordmann, P., and L. Poirel, 2014, The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide: *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, p. 821-830.
- Nordmann, P., L. Poirel, and L. Dortet, 2012b, Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, p. 1503-1507.
- Norman, A., L. H. Hansen, Q. She, and S. J. Sorensen, 2008, Nucleotide sequence of pOLA52: A conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux: *Plasmid*, v. 60, p. 59-74.
- Norman, A., L. H. Hansen, and S. J. Sorensen, 2009, Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool: *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, v. 364, p. 2275-2289.
- Novais, A., I. Comas, F. Baquero, R. Canton, T. M. Coque, A. Moya, F. Gonzalez-Candelas, and J.-C. Galan, 2010, Evolutionary trajectories of beta-lactamase CTX-M-1 cluster enzymes: Predicting Antibiotic Resistance: *PLOS Pathogens*, v. 6, p. 1-16.
- Novick, R. P., 1987, Plasmid incompatibility: *Microbiological Reviews*, v. 51, p. 381-395.
- Novick, R. P., R. C. Clowes, S. N. Cohen, R. Curtiss, N. Datta, and S. Falkow, 1976, Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal: *Bacteriological Reviews*, v. 40, p. 168-189.
- Novick, R. P., and F. C. Hoppensteadt, 1978, On plasmid incompatibility: *Plasmid*, v. 1, p. 421-434.
- Ochman, H., and A. C. Wilson, 1987, Evolution in bacteria - evidence for a universal substitution rate in cellular genomes: *Journal of Molecular Evolution*, v. 26, p. 74-86.
- Ogawa, A., and T. Takeda, 1993, The gene encoding the heat-stable enterotoxin of *Vibrio-Cholerae* is flanked by 123-base pair direct repeats: *Microbiology and Immunology*, v. 37, p. 607-616.
- Ojer-Usoz, E., D. Gonzalez, I. Garcia-Jalon, and A. Isabel Vitas, 2014, High dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in effluents from wastewater treatment plants: *Water Research*, v. 56, p. 37-47.
- Oliver, A., T. M. Coque, D. Alonso, A. Valverde, F. Baquero, and R. Canton, 2005, CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among *Enterobacteriaceae* in a Spanish hospital: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 1567-1571.
- Oliver, A., J. C. Perez-Diaz, T. M. Coque, F. Baquero, and R. Canton, 2001, Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing  $\beta$ lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 616-620.
- Olliver, A., M. Valle, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckert, 2005, Overexpression of the multidrug efflux peron *acrEF* by insertional activation with *IS1* or *IS10* elements in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT204 *acrB* mutants selected with fluoroquinolones: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 289-301.
- Olson, A. B., M. Silverman, D. A. Boyd, A. McGeer, B. M. Willey, V. Pong-Porter, N. Daneman, and M. R. Mulvey, 2005, Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 2112-2115.
- Osano, E., Y. Arakawa, R. Wacharotayankun, M. Ohta, T. Horii, H. Ito, F. Yoshimura, and N. Kato, 1994, Molecular characterization of an enterobacterial metallo  $\beta$ -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia-Marcescens* that shows imipenem resistance: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 38, p. 71-78.
- Osborn, A. M., F. M. D. Tatley, L. M. Steyn, R. W. Pickup, and J. R. Saunders, 2000, Mosaic plasmids and mosaic replicons: evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons: *Microbiology*, v. 146, p. 2267-2275.
- Paciorek, J., 2002, Virulence properties of *Escherichia coli* faecal strains isolated in Poland from healthy children and strains belonging to serogroups O18, O26, O44, O86, O126 and O127 isolated from children with diarrhoea: *Journal of Medical Microbiology*, v. 51, p. 548-556.



- Pal, C., J. Bengtsson-Palme, E. Kristiansson, and D. G. J. Larsson, 2015, Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential: *BMC Genomics*, v. 16, p. 14.
- Papagiannitsis, C. C., M. Dolejska, R. Izdebski, H. Dobiasova, V. Studentova, F. J. Esteves, L. P. G. Derde, Bonten, M. J. M. Bonten, J. Hrabak, M. Gniadkowski, 2015c, Characterization of pKP-M1144, a Novel ColE1-Like Plasmid Encoding IMP-8, GES-5, and BEL-1 beta-Lactamases, from a *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 252 Isolate: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, p. 5065-5068.
- Papagiannitsis, C. C., M. Dolejska, R. Izdebski, P. Giakkoupi, A. Skalova, K. Chudejova, H. Dobiasova, A. C. Vatopoulos, L. P. G. Derde, M. J. M. Bonten, M. Gniadkowski, and J. Hrabak, 2016, Characterisation of IncA/C<sub>2</sub> plasmids carrying an In416-like integron with the *bla*<sub>VIM-19</sub> gene from *Klebsiella pneumoniae* ST383 of Greek origin: *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 47, p. 158-162.
- Papagiannitsis, C. C., R. Izdebski, A. Baraniak, J. Fiett, M. Herda, J. Hrabak, L. P. G. Derde, M. J. M. Bonten, Y. Carmeli, H. Goossens, W. Hryniewicz, C. Brun-Buisson, M. Gniadkowski, and M. W. W. S. Grp, 2015a, Survey of metallo- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae colonizing patients in European ICUs and rehabilitation units, 2008-11: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 70, p. 1981-1988.
- Papagiannitsis, C. C., V. Studentova, V. Jakubu, P. Spanelova, P. Urbaskova, H. Zemlickova, J. Hrabak, and E. Czech Participants, 2015b, High prevalence of ST131 among CTX-M-producing *Escherichia coli* from community-acquired infections, in the Czech Republic: *Microbial Drug Resistance*, v. 21, p. 74-84.
- Papp-Wallace, K. M., A. Endimiani, M. A. Taracila, and R. A. Bonomo, 2011, Carbapenems: Past, present, and future: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, p. 4943-4960.
- Parsley, L. C., E. J. Consuegra, K. S. Kakirde, A. M. Land, W. F. Harper, Jr., and M. R. Liles, 2010, Identification of diverse antimicrobial resistance determinants carried on bacterial, plasmid, or viral metagenomes from an activated sludge microbial assemblage: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, p. 3753-3757.
- Partridge, S. R., 2011, Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria: *FEMS Microbiology Reviews*, v. 35, p. 820-855.
- Partridge, S. R., and R. M. Hall, 2005, Evolution of transposons containing *bla*<sub>TEM</sub> genes: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 1267-1268.
- Partridge, S. R., G. Tsafnat, E. Coiera, and J. R. Iredell, 2009, Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons: *FEMS Microbiology Reviews*, v. 33, p. 757-784.
- Partridge, S. R., Z. Zong, and J. R. Iredell, 2011, Recombination in IS26 and Tn2 in the evolution of multiresistance regions carrying *bla*<sub>CTX-M-15</sub> on conjugative IncF plasmids from *Escherichia coli*: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, p. 4971-4978.
- Pastrana-Carrasco, J., J. Ulises Garza-Ramos, H. Barrios, R. Morfin-Otero, E. Rodriguez-Noriega, J. Manuel Barajas, S. Suarez, R. Diaz, G. Miranda, F. Solorzano, J. Contreras, and J. Silva-Sanchez, 2012, *qac* $\Delta$ 1 gene frequency and biocide resistance in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae clinical isolates: *Revista De Investigacion Clinica*, v. 64, p. 535-540.
- Paterson, D. L., 2006, Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae: *American Journal of Infection Control*, v. 34, p. S20-S28.
- Paton, J. H., and D. S. Reeves, 1988, Fluoroquinolone antibiotics - microbiology, pharmacokinetics and clinical use: *Drugs*, v. 36, p. 193-228.
- Peirano, G., K. B. Laupland, D. B. Gregson, and J. D. D. Pitout, 2011, Colonization of returning travelers with CTX-M-producing *Escherichia coli*: *Journal of Travel Medicine*, v. 18, p. 299-303.
- Pembroke, J. T., C. MacMahon, and B. McGrath, 2002, The role of conjugative transposons in the Enterobacteriaceae: *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 59, p. 2055-2064.
- Perez, A., M. Poza, A. Fernandez, M. del Carmen, F. Susana Mallo, M. Merino, S. Rumbo-Feal, M. P. Cabral, and G. Bou, 2012, Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, p. 2084-2090.
- Perez-Perez, F. J., and N. D. Hanson, 2002, Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR: *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 2153-2162.
- Perron, G. G., A. E. G. Lee, Y. Wang, W. E. Huang, and T. G. Barraclough, 2012, Bacterial recombination promotes the evolution of multi-drug-resistance in functionally diverse populations: *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, v. 279, p. 1477-1484.
- Phan, M.-D., C. Kidgell, S. Nair, K. E. Holt, A. K. Turner, J. Hinds, P. Butcher, F. J. Cooke, N. R. Thomson, R. Titball, Z. A. Bhutta, R. Hasan, G. Dougan, and J. Wain, 2009, Variation in *Salmonella enterica* serovar Typhi IncHI1 plasmids during the global spread of resistant typhoid fever: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, p. 716-727.

- Philippon, A., G. Arlet, and G. A. Jacoby, 2002, Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 46, p. 1-11.
- Phillips, I., 2007, Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health: International Journal of Antimicrobial Agents, v. 30, p. 101-107.
- Piddock, L. J., 2002, Fluoroquinolone resistance in Salmonella serovars isolated from humans and food animals: FEMS Microbiology Reviews, v. 26, p. 3-16.
- Pilar Garcillan-Barcia, M., B. Ruiz del Castillo, A. Alvarado, F. de la Cruz, and L. Martinez-Martinez, 2015, Degenerate primer MOB typing of multiresistant clinical isolates of *E. coli* uncovers new plasmid backbones: Plasmid, v. 77, p. 17-27.
- Pinto, L., H. Radhouani, C. Coelho, P. M. da Costa, R. Simoes, R. M. L. Brandao, C. Torres, G. Igrejas, and P. Poeta, 2010, Genetic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-containing *Escherichia coli* isolates from birds of prey from Serra da Estrela Natural Reserve in Portugal: Applied and Environmental Microbiology, v. 76, p. 4118-4120.
- Pitout, J. D. D., 2012a, Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance: Frontiers in Microbiology, v. 3, p. 1-7.
- Pitout, J. D. D., 2012b, Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment: Expert Review of Anti-Infective Therapy, v. 10, p. 1165-1176.
- Pitout, J. D. D., P. Nordmann, K. B. Laupland, and L. Poirel, 2005, Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the community: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 56, p. 52-59.
- Pobiega, M., J. Wojkowska-Mach, A. Chmielarczyk, D. Romaniszyn, P. Adamski, P. B. Heczko, B. Gryglewska, and T. Grodzicki, 2013, Molecular characterization and drug resistance of *Escherichia coli* strains isolated from urine from long-term care facility residents in Cracow, Poland: Medical Science Monitor, v. 19, p. 317-326.
- Poirel, L., A. Barbosa-Vasconcelos, R. R. Simoes, P. M. Da Costa, W. Liu, and P. Nordmann, 2012a, Environmental KPC-producing *Escherichia coli* isolates in Portugal: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 56, p. 1662-1663.
- Poirel, L., R. A. Bonnin, and P. Nordmann, 2012b, Genetic Features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 56, p. 559-562.
- Poirel, L., V. Cattoir, and P. Nordmann, 2008a, Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem?: Clinical Microbiology and Infection, v. 14, p. 295-297.
- Poirel, L., V. Cattoir, and P. Nordmann, 2012c, Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies: Frontiers in Microbiology, v. 3, p. 1-7.
- Poirel, L., M. Gniadkowski, and P. Nordmann, 2002a, Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related  $\beta$ -lactamase CTX-M-3: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 50, p. 1031-1034.
- Poirel, L., P. Kampfer, and P. Nordmann, 2002b, Chromosome-encoded Ambler class A  $\beta$ -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 46, p. 4038-4040.
- Poirel, L., T. Naas, and P. Nordmann, 2008b, Genetic support of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: Clinical Microbiology and Infection, v. 14, p. 75-81.
- Poirel, L., J. D. D. Pitout, L. Calvo, J. M. Rodriguez-Martinez, D. Church, and P. Nordmann, 2006, In vivo selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates expressing plasmid-mediated quinolone resistance and expanded-spectrum  $\beta$ -lactamase: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 50, p. 1525-1527.
- Poirel, L., A. Potron, C. De La Cuesta, T. Cleary, P. Nordmann, and L. S. Munoz-Priceb, 2012d, Wild coastline birds as reservoirs of broad-spectrum- $\beta$  -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Miami Beach, Florida: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 56, p. 2756-2758.
- Poirel, L., A. Potron, and P. Nordmann, 2012e, OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 67, p. 1597-1606.
- Poirel, L., J.-M. Rodriguez-Martinez, H. Mammeri, A. Liard, and P. Nordmann, 2005, Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA: Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 49, p. 3523-5.
- Poirel, L., R. Stephan, V. Perreten, and P. Nordmann, 2014, The carbapenemase threat in the animal world: the wrong culprit: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 69, p. 2007-2008.
- Pomba, C., J. D. da Fonseca, B. C. Baptista, J. D. Correia, and L. Martinez-Martinez, 2009, Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent *Escherichia coli* CTX-M-15-producing clone harboring the *qnrB2* and *aac(6')-Ib-cr* genes in a dog: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 53, p. 327-328.
- Pons, M. J., C. Gomes, and J. Ruiz, 2013, QnrVC, a new transferable Qnr-like family: Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica, v. 31, p. 191-192.

- Popowska, M., and A. Krawczyk-Balska, 2013, Broad-host-range IncP-1 plasmids and their resistance potential: *Frontiers in Microbiology*, v. 4, p. 1-8.
- Porres-Osante, N., Y. Saenz, S. Somalo, and C. Torres, 2015, Characterization of beta-lactamases in faecal *Enterobacteriaceae* recovered from healthy humans in Spain: Focusing on AmpC Polymorphisms: *Microbial Ecology*, v. 70, p. 132-140.
- Potron, A., P. Nordmann, E. Lafeuille, Z. Al Maskari, F. Al Rashdi, and L. Poirel, 2011, Characterization of OXA-181, a Carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, p. 4896-4899.
- Potron, A., P. Nordmann, and L. Poirel, 2013, Characterization of OXA-204, a carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, p. 633-636.
- Pourcher, A. M., A. Jadas-Hécart, P. Cotinet, P. Dabert, C. Ziebal, S. Le Roux, R. Moraru, D. Heddadj, I. Kempf, 2014, Effect of land application of manure from enrofloxacin-treated chickens on ciprofloxacin resistance of *Enterobacteriaceae* in soil: *Science of the Total Environment*, v. 482-483, p. 269-275.
- Price, L. B., J. R. Johnson, M. Aziz, C. Clabots, B. Johnston, V. Tchesnokova, L. Nordstrom, M. Billig, S. Chattopadhyay, M. Stegger, P. S. Andersen, T. Pearson, K. Riddell, P. Rogers, D. Scholes, B. Kahl, P. Keim, and E. V. Sokurenko, 2013, The epidemic of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 Is Driven by a Single Highly Pathogenic Subclone, H30-Rx: *mBio*, v. 4, p. 1-10.
- Pérez-Vázquez, M., Oteo, J., García-Cobos, S., Aracil, B., Harris, S.R., Ortega, A., Fontanals, D., Hernández, J.M., Solís, S., Campos, J., Dougan, G., Kingsley, R.A., 2016, Phylogeny, resistome and mobile genetic elements of emergent OXA-48 and OXA-245 *Klebsiella pneumoniae* clones circulating in Spain., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 71, p. 887-896.
- Queenan, A. M., and K. Bush, 2007, Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases: *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, p. 440-458.
- Quesada, S. P., J. A. Rizzato Paschoal, and F. G. Reyes Reyes, 2013, Considerations on the aquaculture development and on the use of veterinary drugs: Special issue for fluoroquinolones-a review: *Journal of Food Science*, v. 78, p. R1321-R1333.
- Quiros, P., M. Colomer-Lluch, A. Martinez-Castillo, E. Miro, M. Argente, J. Jofre, F. Navarro, and M. Muniesa, 2014, Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, p. 606-609.
- Rahman, M., G. Mauff, J. Levy, M. Couturier, G. Pulverer, N. Glasdorff, and J. P. Butzler, 1994, Detection of 4-quinolone resistance mutation in *gyrA* gene of *Shigella dysenteriae* Type-1 by PCR: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 38, p. 2488-2491.
- Randall, L. P., C. Clouting, R. A. Horton, N. G. Coldham, G. Wu, F. A. Clifton-Hadley, R. H. Davies, and C. J. Teale, 2011, Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, p. 86-95.
- Rasko, D. A., M. J. Rosovitz, G. S. A. Myers, E. F. Mongodin, W. F. Fricke, P. Gajer, J. Crabtree, M. Sebahia, N. R. Thomson, R. Chaudhuri, I. R. Henderson, V. Sperandio, and J. Ravel, 2008, The pangenome structure of *Escherichia coli*: Comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates: *Journal of Bacteriology*, v. 190, p. 6881-6893.
- Rawlings, D. E., 1999, Proteic toxin-antitoxin: bacterial plasmid addiction systems and their evolution with special reference to the *pas* system of pTF-FC2: *FEMS Microbiology Letters*, v. 176, p. 269-277.
- Recchia, G. D., and R. M. Hall, 1995, Plasmid evolution by acquisition of mobile gene cassettes - plasmid pIE723 contains the *aadb* gene cassette precisely inserted at a secondary site in the IncQ plasmid RSF1010: *Molecular Microbiology*, v. 15, p. 179-187.
- Reinthaler, F. F., G. Feierl, H. Galler, D. Haas, E. Leitner, F. Mascher, A. Melkes, J. Posch, I. Winter, G. Zarfel, and E. Marth, 2010, ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge: *Water Research*, v. 44, p. 1981-1985.
- Reuland, E. A., T. Halaby, J. P. Hays, D. M. C. de Jongh, H. D. R. Snetselaar, M. van Keulen, P. J. M. Elders, P. H. M. Savelkoul, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, and N. al Naiemi, 2015, Plasmid-mediated AmpC: prevalence in community-acquired isolates in Amsterdam, the Netherlands, and risk factors for carriage: *PLOS One*, v. 10, p. 1-9.
- Richards, H., and N. Datta, 1979, Reclassification of incompatibility group L (IncL) plasmids: *Plasmid*, v. 2, p. 293-295.
- Riesenfeld, C. S., R. M. Goodman, and J. Handelsman, 2004, Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes: *Environmental Microbiology*, v. 6, p. 981-989.

- Rizzo, L., C. Manaia, C. Merlin, T. Schwartz, C. Dagot, M. C. Ploy, I. Michael, and D. Fatta-Kassinos, 2013, Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review: *Science of the Total Environment*, v. 447, p. 345-360.
- Roberts, A. P., M. Chandler, P. Courvalin, G. Guedon, P. Mullany, T. Pembroke, J. I. Rood, C. J. Smith, A. O. Summers, M. Tsuda, and D. E. Berg, 2008, Revised nomenclature for transposable genetic elements: *Plasmid*, v. 60, p. 167-173.
- Robicsek, A., J. Strahilevitz, G. A. Jacoby, M. Macielag, D. Abbanat, C. H. Park, K. Bush, and D. C. Hooper, 2006, Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase: *Nature Medicine*, v. 12, p. 83-88.
- Robinson, A. A., J. B. Belden, and M. J. Lydy, 2005, Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms: *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 24, p. 423-430.
- Rodriguez, M. M., P. Power, M. Radice, C. Vay, A. Famiglietti, M. Galleni, J. A. Ayala, and G. Gutkind, 2004, Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 4895-4897.
- Rodriguez, M. M., P. Power, H. Sader, M. Galleni, and G. Gutkind, 2010, Novel chromosome-encoded CTX-M-78  $\beta$ -lactamase from a *Kluyvera georgiana* Clinical isolate as a putative origin of CTX-M-25 subgroup: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, p. 3070-3071.
- Rodriguez-Bano, J., L. Lopez-Cerero, M. D. Navarro, P. Diaz de Alba, and A. Pascual, 2008, Faecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 62, p. 1142-1149.
- Rodriguez-Martinez, J. M., M. Eliecer Cano, C. Velasco, L. Martinez-Martinez, and A. Pascual, 2011, Plasmid-mediated quinolone resistance: an update: *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 17, p. 149-182.
- Rogers, B. A., H. E. Sidjabat, and D. L. Paterson, 2011, *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, p. 1-14.
- Rodicio, R. M., A. Herrero, I. Rodriguez, P. Garcia, I. Montero, J. Beutlich, R. Rodicio, B. Guerra, and M. C. Mendoza, 2011, Acquisition of antimicrobial resistance determinants by virulence plasmids specific for nontyphoid serovars of *Salmonella enterica*: *Reviews in Medical Microbiology*, v. 22, p. 55-65.
- Rossolini, G. M., M. M. D'Andrea, and C. Mugnaioli, 2008, The spread of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: *Clinical Microbiology and Infection*, v. 14, p. 33-41.
- Rowe-Magnus, D. A., A. M. Guerout, L. Biskri, P. Bouige, and D. Mazel, 2003, Comparative analysis of superintegrons: Engineering extensive genetic diversity in the Vibrionaceae: *Genome Research*, v. 13, p. 428-442.
- Rowe-Magnus, D. A., A. M. Guerout, and D. Mazel, 2002, Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes: *Molecular Microbiology*, v. 43, p. 1657-1669.
- Rowe-Magnus, D. A., and D. Mazel, 1999, Resistance gene capture: *Current Opinion in Microbiology*, v. 2, p. 483-488.
- Rubin, J. E., and J. D. D. Pitout, 2014, Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, carbapenemase and AmpC producing Enterobacteriaceae in companion animals: *Veterinary Microbiology*, v. 170, p. 10-18.
- Ruiz, J., 2003, Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 51, p. 1109-1117.
- Ruuskanen, M., J. Muurinen, A. Meierjohan, K. Pärnänen, M. Tamminen, C. Lyra, L. Kronberg, M. Virta, 2016, Fertilizing with Animal Manure Disseminates Antibiotic Resistance Genes to the Farm Environment: *Journal of Environmental Quality*, v. 45, p. 488-493.
- Saenz, Y., M. Zarazaga, L. Brinas, F. Ruiz-Larrea, and C. Torres, 2003, Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 51, p. 1001-1005.
- Saga, T., M. Kaku, Y. Onodera, S. Yamachika, K. Sato, and H. Takase, 2005, *Vibrio parahaemolyticus* chromosomal *qnr* homologue VPA0095: Demonstration by transformation with a mutated gene of its potential to reduce quinolone susceptibility in *Escherichia coli*: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 2144-2145.
- Saino, Y., F. Kobayashi, M. Inoue, and S. Mitsuhashi, 1982, Purification and properties of inducible penicillin  $\beta$ -lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 22, p. 564-570.
- Samuels, A. L., E. Lanka, and J. E. Davies, 2000, Conjugative junctions in RP4-mediated mating of *Escherichia coli*: *Journal of Bacteriology*, v. 182, p. 2709-2715.
- Sanchez, M. B., A. Hernandez, J. M. Rodriguez-Martinez, L. Martinez-Martinez, and J. L. Martinez, 2008, Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants: *BMC Microbiology*, v. 8, p. 1-14.

- Sarmah, A. K., M. T. Meyer, A. B. A. Boxall, 2006, A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment: *Chemosphere*, v. 65, p. 725–759.
- Sarria, J. C., A. M. Vidal, R. C. Kimbrough, 2001, Infections caused by *Kluyvera* species in humans: *Clinical Infectious Diseases*, v. 33, p. E69-74.
- Seshasayee, A. S., P. Bertone, G. M. Fraser, N. M. Luscombe, 2006, Transcriptional regulatory networks in bacteria: from input signals to output responses. *Current Opinion in Microbiology*, v. 9, p. 511-519. *Current Opinion in Microbiology*, v. 9, p. 511-519.
- Schijyen, J. F., H. Blaak, F. M. Schets, and A. M. d. R. Husman, 2015, Fate of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* from faecal sources in surface water and probability of human exposure through swimming: *Environmental Science & Technology*, v. 49, p. 11825-11833.
- Schink, A.-K., K. Kadlec, H. Kaspar, J. Mankertz, and S. Schwarz, 2013, Analysis of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates collected in the GERM-Vet monitoring programme: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 1741-1749.
- Schmidt, M., P. Zheng, and N. Delihis, 1995, Secondary structures of *Escherichia coli* antisense *micF* RNA, the 5'-end of the target *ompF* mRNA, and the RNA/RNA duplex: *Biochemistry*, v. 34, p. 3621-3631.
- Schmiedel, J., L. Falgenhauer, E. Domann, R. Bauerfeind, E. Prenger-Berninghoff, C. Imirzalioglu, and T. Chakraborty, 2014, Multiresistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany: *BMC Microbiology*, v. 14, p. 1-13.
- Schwarz, S., and E. Chaslus-Dancla, 2001, Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance: *Veterinary Research*, v. 32, p. 201-225.
- Schwarz, S., C. Kehrenberg, and T. R. Walsh, 2001, Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production: *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 17, p. 431-437.
- Seiffert, S. N., M. Hilty, V. Perreten, and A. Endimiani, 2013, Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health?: *Drug Resistance Updates*, v. 16, p. 22-45.
- Seitz, P., and M. Blokesch, 2013, Cues and regulatory pathways involved in natural competence and transformation in pathogenic and environmental Gram-negative bacteria: *FEMS Microbiology Reviews*, v. 37, p. 336-363.
- Shaheen, B. W., R. Nayak, and D. M. Boothe, 2013, Emergence of a New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM-1)-encoding gene in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from companion animals in the United States: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, p. 2902-2903.
- Sheng, W.-H., R. E. Badal, P.-R. Hsueh, and S. Program, 2013, Distribution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, AmpC  $\beta$ -lactamases, and carbapenemases among *Enterobacteriaceae* isolates causing intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region: results of the study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART): *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, p. 2981-2988.
- Shiraki, Y., N. Shibata, Y. H. Doi, and Y. Arakawa, 2004, *Escherichia coli* producing CTX-M-2  $\beta$ -lactamase in cattle, Japan: *Emerging Infectious Diseases*, v. 10, p. 69-75.
- Shore, A. C., and D. C. Coleman, 2013, Staphylococcal cassette chromosome *mec*: Recent advances and new insights: *International Journal of Medical Microbiology*, v. 303, p. 350-359.
- Shousha, A., N. Awaiwanont, D. Sofka, F. J. M. Smulders, P. Paulsen, M. P. Szostak, T. Humphrey, and F. Hilbert, 2015, Bacteriophages isolated from chicken meat and the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, p. 4600-4606.
- Sidjabat, H. E., K. Y. Seah, L. Coleman, A. Sartor, P. Derrington, C. Heney, J. Faoagali, G. R. Nimmo, and D. L. Paterson, 2014, Expansive spread of Inc11 plasmids carrying *bla*<sub>CMY-2</sub> amongst *Escherichia coli*: *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 44, p. 203-208.
- Sidjabat, H. E., N. Townell, G. R. Nimmo, N. M. George, J. Robson, R. Vohra, L. Davis, C. Heney, and D. L. Paterson, 2015, Dominance of IMP-4-producing *Enterobacter cloacae* among carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Australia: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, p. 4059-4066.
- Siguier, P., J. Filee, and M. Chandler, 2006a, Insertion sequences in prokaryotic genomes: *Current Opinion in Microbiology*, v. 9, p. 526-531.
- Siguier, P., L. Gagnevin, and M. Chandler, 2009, The new IS1595 family, its relation to IS1 and the frontier between insertion sequences and transposons: *Research in Microbiology*, v. 160, p. 232-241.
- Siguier, P., E. Gourbeyre, and M. Chandler, 2014, Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity: *FEMS Microbiology Reviews*, v. 38, p. 865-891.
- Siguier, P., E. Gourbeyre, A. Varani, B. Ton-Hoang, and M. Chandler, 2015, Everyman's guide to bacterial insertion sequences: *Microbiology Spectrum*, v. 3, p.1-35.

- Siguier, P., J. Perochon, L. Lestrade, J. Mahillon, and M. Chandler, 2006b, ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences: *Nucleic Acids Research*, v. 34, p. D32-D36.
- Silver, S., 2003, Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds: *Fems Microbiology Reviews*, v. 27, p. 341-353.
- Silver, S., and L. T. Phung, 2005, A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 32, p. 587-605.
- Smet, A., A. Martel, D. Persoons, J. Dewulf, M. Heyndrickx, L. Herman, F. Haesebrouck, and P. Butaye, 2010a, Broad-spectrum  $\beta$ -lactamases among *Enterobacteriaceae* of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health: *FEMS Microbiology Reviews*, v. 34, p. 295-316.
- Smet, A., F. Van Nieuwerburgh, T. T. M. Vandekerckhove, A. Martel, D. Deforce, P. Butaye, and F. Haesebrouck, 2010b, Complete nucleotide sequence of CTX-M-15-plasmids from clinical *Escherichia coli* isolates: Insertional events of transposons and insertion sequences: *PLOS One*, v. 5, p. 1-8.
- Smillie, C., M. P. Garcillan-Barcia, M. Vi. Francia, E. P. C. Rocha, and F. de la Cruz, 2010, Mobility of plasmids: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 74, p. 434-452.
- Snyder, L., and W. Champness, 2007, *Molecular genetics of bacteria*, 3rd Edition, Washington, D.C., ASM Press, 735 pp.
- Sorensen, A. H., L. H. Hansen, E. Johannesen, and S. J. Sorensen, 2003, Conjugative plasmid conferring resistance to olaquinox: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 798-799.
- Sougakoff, W., S. Goussard, and P. Courvalin, 1988, The TEM-3  $\beta$ -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by 2 amino-acid substitutions: *FEMS Microbiology Letters*, v. 56, p. 343-348.
- Sousa, M., C. Torres, J. Barros, S. Somalo, G. Igrejas, and P. Poeta, 2011, Gilthead seabream (*Sparus aurata*) as carriers of SHV-12 and TEM-52 extended-spectrum beta-lactamases-containing *Escherichia coli* isolates: *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 8, p. 1139-1141.
- Spratt, B. G., L. D. Bowler, Q. Y. Zhang, J. J. Zhou, and J. M. Smith, 1992, Role of interspecies transfer of chromosomal genes in the evolution of penicillin resistance in pathogenic and commensal *Neisseria* species: *Journal of Molecular Evolution*, v. 34, p. 115-125.
- Stalder, G. L., I. Loncaric, and C. Walzer, 2014, Diversity of enterobacteria including  $\beta$ -lactamase producing isolates associated with the Spanish slug (*Anion vulgaris*): *Science of the Total Environment*, v. 479, p. 11-16.
- Stedt, J., J. Bonnedahl, J. Hernandez, J. Waldenstrom, B. J. McMahon, C. Tolf, B. Olsen, and M. Drobni, 2015, Carriage of CTX-M type extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in gulls across Europe: *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 57, p. 1-8.
- Stokes, H. W., and M. R. Gillings, 2011, Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens: *FEMS Microbiology Reviews*, v. 35, p. 790-819.
- Stokes, H. W., and R. M. Hall, 1989, A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons: *Molecular Microbiology*, v. 3, p. 1669-1683.
- Stolle, I., E. Prenger-Berninghoff, I. Stamm, S. Scheufen, E. Hassdenteufel, S. Guenther, A. Bethe, Y. Pfeifer, and C. Ewers, 2013, Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 2802-2808.
- Strahilevitz, J., G. A. Jacoby, D. C. Hooper, and A. Robicsek, 2009, Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat: *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, p. 664-689.
- Sukul, P., and M. Spiteller, 2007, Fluoroquinolone antibiotics in the environment: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 191, v. 191, p. 131-162.
- Sutterlin, S., P. Edquist, L. Sandegren, M. Adler, T. Tangden, M. Drobni, B. Olsen, and A. Melhus, 2014, Silver resistance genes are overrepresented among *Escherichia coli* isolates with CTX-M production: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, p. 6863-6869.
- Suzuki, H., T. Lefebure, P. P. Bitar, and M. J. Stanhope, 2012, Comparative genomic analysis of the genus *Staphylococcus* including *Staphylococcus aureus* and its newly described sister species *Staphylococcus simiae*: *BMC Genomics*, v. 13, p. 1-8.
- Szmolka, A., D. Fortini, L. Villa, A. Carattoli, M. F. Anjum, and B. Nagy, 2011, First report on IncN plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrS1* in porcine *Escherichia coli* in Europe: *Microbial Drug Resistance*, v. 17, p. 567-573.
- Tacao, M., A. Moura, A. Correia, and I. Henriques, 2014, Co-resistance to different classes of antibiotics among ESBL-producers from aquatic systems: *Water Research*, v. 48, p. 100-107.
- Tagg, K. A., A. N. Ginn, X. Jiang, J. Ellem, S. R. Partridge, and J. R. Iredell, 2015, Distribution of acquired AmpC  $\beta$ -lactamase genes in Sydney, Australia: *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 83, p. 56-58.

- Talukdar, P. K., M. Rahman, M. Rahman, A. Nabi, Z. Islam, M. M. Hoque, H. P. Endtz, and M. A. Islam, 2013, Antimicrobial resistance, virulence factors and genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from household water supply in Dhaka, Bangladesh: PLOS One, v. 8, p. 1-8.
- Tamang, M. D., H.-M. Nam, M. Gurung, G.-C. Jang, S.-R. Kim, S.-C. Jung, Y. H. Park, and S.-K. Lim, 2013, Molecular characterization of CTX-M  $\beta$ -lactamase and associated addiction systems in *Escherichia coli* circulating among cattle, farm workers, and the farm environment: Applied and Environmental Microbiology, v. 79, p. 3898-3905.
- Tamang, M. D., H.-M. Nam, G.-C. Jang, S.-R. Kim, M. H. Chae, S.-C. Jung, J.-W. Byun, Y. H. Park, and S.-K. Lim, 2012, Molecular characterization of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from stray dogs in South Korea: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 56, p. 2705-2712.
- Tamtam, F., F. Mercier, B. Le Bot, J. Eurin, Q. T. Dinh, M. Clement, and M. Chevreuil, 2008, Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions: Science of the Total Environment, v. 393, p. 84-95.
- Tangden, T., O. Cars, A. Melhus, and E. Lowdin, 2010, Foreign Travel is a major risk factor for colonization with *Escherichia coli* producing CTX-M-Type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a prospective study with Swedish volunteers: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 54, p. 3564-3568.
- Tausova, D., M. Dolejska, A. Cizek, L. Hanusova, J. Hrusakova, O. Svoboda, G. Camlik, and I. Literak, 2012, *Escherichia coli* with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 67, p. 1103-1107.
- Tavakoli, N., A. Comanducci, H. M. Dodd, M. C. Lett, B. Albiger, and P. Bennett, 2000, IS1294, a DNA element that transposes by RC transposition: Plasmid, v. 44, p. 66-84.
- Taylor, D. E., 2009, Thermosensitive nature of IncHI1 plasmid transfer: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 53, p. 2703-2703.
- Taylor, D. E., J. C. Chumpitaz, and F. Goldstein, 1985, Variability of IncHI1 plasmids from *Salmonella typhi* with special reference to Peruvian plasmids encoding resistance to trimethoprim and other antibiotics: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 28, p. 452-455.
- Taylor, D. E., and J. G. Levine, 1980, Studies of temperature-sensitive transfer and maintenance of H Incompatibility group plasmids: Journal of General Microbiology, v. 116, p. 475-484.
- Temkin, E., A. Adler, A. Lerner, and Y. Carmeli, 2014, Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: biology, epidemiology, and management: Antimicrobial Therapeutics Reviews: Infectious Diseases of Current and Emerging Concern, v. 1323, p. 22-42.
- Tennstedt, T., R. Szczepanowski, S. Braun, A. Puhler, and A. Schluter, 2003, Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant: FEMS Microbiology Ecology, v. 45, p. 239-252.
- Teshager, T., L. Dominguez, M. A. Moreno, Y. Saenz, C. Torres, and S. Cardenosa, 2000, Isolation of an SHV-12  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strain from a dog with recurrent urinary tract infections: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 44, p. 3483-3484.
- Tham, J., I. Odenholt, M. Walder, A. Brolund, J. Ahl, and E. Melander, 2010, Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in patients with travellers' diarrhoea: Scandinavian Journal of Infectious Diseases, v. 42, p. 275-280.
- Thisted, T., and K. Gerdes, 1992, Mechanism of post-segregational killing by the *hok/sok* system of plasmid R1: Sok antisense RNA regulates *hok* gene expression indirectly through the overlapping *mok* gene: Journal of Molecular Biology, v. 223, p. 41-54.
- Thomas, C. M., and K. M. Nielsen, 2005, Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria: Nature Reviews Microbiology, v. 3, p. 711-721.
- Tock, M. R., and D. T. F. Dryden, 2005, The biology of restriction and anti-restriction: Current Opinion in Microbiology, v. 8, p. 466-472.
- Toleman, M. A., and T. R. Walsh, 2011, Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria: FEMS Microbiology Reviews, v. 35, p. 912-935.
- Trott, D., 2013,  $\beta$ lactam resistance in Gram-negative pathogens isolated from animals: Current Pharmaceutical Design, v. 19, p. 239-249.
- Turner, S. M., A. Scott-Tucker, L. M. Cooper, and I. R. Henderson, 2006, Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer Enterotoxigenic *Escherichia coli*: FEMS Microbiology Letters, v. 263, p. 10-20.
- Turnidge, J., L. R. McCarthy, R. N. Master, and D. E. Kepner, 2003, Low levels of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. A five-year trend in Australia measured through the use of TSN Database Australia: Communicable Diseases Intelligence Quarterly Report, v. 27, Suppl, p. S89-91.

- Unicomb, L. E., J. Ferguson, R. J. Stafford, R. Ashbolt, M. D. Kirk, N. G. Becker, M. S. Patel, G. L. Gilbert, M. Valcanis, L. Mickan, for the Australian Campylobacter Subtyping Study Group, 2006, Low-level fluoroquinolone resistance among *Campylobacter jejuni* isolates in Australia: *Clinical Infectious Diseases*, v. 42, p. 1368-1374.
- Valverde, A., R. Canton, M. Pilar Garcillan-Barcia, A. Novais, J. Carlos Galan, A. Alvarado, F. de la Cruz, F. Baquero, and T. M. Coque, 2009, Spread of *bla*<sub>CTX-M-14</sub> is driven mainly by IncK plasmids disseminated among *Escherichia coli* phylogroups A, B1, and D in Spain: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, p. 5204-5212.
- Valverde, A., F. Grill, T. M. Coque, V. Pintado, F. Baquero, R. Canton, and J. Cobo, 2008, High rate of intestinal colonization with extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing organisms in household contacts of infected community patients: *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, p. 2796-2799.
- van Belkum, A., 2007, Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA): *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 49, p. 22-27.
- Veldman, K., L. M. Cavaco, D. Mevius, A. Battisti, A. Franco, N. Botteldoorn, M. Bruneau, A. Perrin-Guyomard, T. Cerny, C. De Frutos Escobar, B. Guerra, A. Schroeter, M. Gutierrez, K. Hopkins, A.-L. Myllyniemi, M. Sunde, D. Wasyl, and F. M. Aarestrup, 2011, International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, p. 1278-1286.
- Veldman, K., P. van Tulden, A. Kant, J. Testerink, and D. Mevius, 2013, Characteristics of cefotaxime-resistant *Escherichia coli* from wild birds in the Netherlands: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, p. 7556-7561.
- Venter, J. C., K. Remington, J. F. Heidelberg, A. L. Halpern, D. Rusch, J. A. Eisen, D. Y. Wu, I. Paulsen, K. E. Nelson, W. Nelson, D. E. Fouts, S. Levy, A. H. Knap, M. W. Lomas, K. Neelson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y. H. Rogers, and H. O. Smith, 2004, Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea: *Science*, v. 304, p. 66-74.
- Verdet, C., Y. Benzerara, V. Gautier, O. Adam, Z. Ould-Hocine, and G. Arlet, 2006, Emergence of DHA-1-producing *Klebsiella* spp. in the Parisian region: Genetic organization of the *ampC* and *ampR* genes originating from *Morganella morganii*: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 607-617.
- Vetting, M. W., S. S. Hegde, J. E. Fajardo, A. Fiser, S. L. Roderick, H. E. Takiff, and J. S. Blanchard, 2006, Pentapeptide repeat proteins: *Biochemistry*, v. 45, p. 1-10.
- Vignaroli, C., G. M. Luna, S. Pasquaroli, A. Di Cesare, R. Petruzzella, P. Paroncini, and F. Biavasco, 2013, Epidemic *Escherichia coli* ST131 and *Enterococcus faecium* ST17 in coastal marine sediments from an Italian beach: *Environmental Science & Technology*, v. 47, p. 13772-13780.
- Vila, J., J. Ruiz, F. Marco, A. Barcelo, P. Goni, E. Giral, and T. J. Deanta, 1994, Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 38, p. 2477-2479.
- Villa, L., A. Capone, D. Fortini, M. Dolejska, I. Rodríguez, F. Taglietti, P. De Paolis, N. Petrosillo, A. Carattoli, 2013b, Reversion to susceptibility of a carbapenem-resistant clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 2482-2486.
- Villa, L., A. Carattoli, P. Nordmann, C. Carta, and L. Poirel, 2013a, Complete sequence of the IncT-type plasmid pT-OXA-181 carrying the *bla*<sub>OXA-181</sub> carbapenemase gene from *Citrobacter freundii*: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, p. 1965-1967.
- Villa, L., A. Garcia-Fernandez, D. Fortini, and A. Carattoli, 2010, Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, p. 2518-2529.
- Vincent, C., P. Boerlin, D. Daignault, C. M. Dozois, L. Dutil, C. Galanakis, R. J. Reid-Smith, P.-P. Tellier, P. A. Tellis, K. Ziebell, and A. R. Manges, 2010, Food Reservoir for *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infections: *Emerging Infectious Diseases*, v. 16, p. 88-95.
- Vo, A. T. T., E. van Duijkeren, A. C. Fluit, and W. Gaastra, 2007, Characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from horses: *Veterinary Microbiology*, v. 124, p. 248-255.
- Voets, G. M., T. N. Platteel, A. C. Fluit, J. Scharringa, C. M. Schapendonk, J. C. Stuart, M. J. M. Bonten, M. A. Leverstein-van Hal, and E. S. W. G. Natl, 2012, Population distribution of beta-lactamase conferring resistance to third-generation cephalosporins in human clinical Enterobacteriaceae in the Netherlands: *PLOS One*, v. 7, p. 1-6.



- Voulgari, E., O. Zarkotou, K. Ranellou, D. E. Karageorgopoulos, G. Vrioni, V. Mamali, K. Themeli-Digalaki, and A. Tsakris, 2013, Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 84-88.
- Waldor, M. K., H. Tschape, and J. J. Mekalanos, 1996, A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139: *Journal of Bacteriology*, v. 178, p. 4157-4165.
- Wales, A. D., M. J. Woodward, and G. R. Pearson, 2005, Attaching-effacing bacteria in animals: *Journal of Comparative Pathology*, v. 132, p. 1-26.
- Walker, R. I., D. Steele, T. Aguado, and E. T. E. C. Ad Hoc, 2007, Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) disease: *Vaccine*, v. 25, p. 2545-2566.
- Walsh, T. R., M. A. Toleman, L. Poirel, and P. Nordmann, 2005, Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm?: *Clinical Microbiology Reviews*, v. 18, p. 306-325.
- Walsh, T. R., J. Weeks, D. M. Livermore, and M. A. Toleman, 2011, Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study: *Lancet Infectious Diseases*, v. 11, p. 355-362.
- Walther-Rasmussen, J., and N. Hoiby, 2006, OXA-type carbapenemases: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 57, p. 373-383.
- Wang, J., R. Stephan, K. Power, Q. Yan, H. Haechler, and S. Fanning, 2014, Nucleotide sequences of 16 transmissible plasmids identified in nine multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates expressing an ESBL phenotype isolated from food-producing animals and healthy humans: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, p. 2658-2668.
- Wang, L., Y. Oda, S. Grewal, M. Morrison, F. C. Michel, Jr., and Z. Yu, 2012, Persistence of resistance to erythromycin and tetracycline in swine manure during simulated composting and lagoon treatments: *Microbial Ecology*, v. 63, p. 32-40.
- Wang, M., Q. Guo, X. Xu, X. Wang, X. Ye, S. Wu, D. C. Hooper, and M. Wang, 2009a, New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, p. 1892-1897.
- Wang, M., G. A. Jacoby, D. M. Mills, and D. C. Hooper, 2009b, SOS regulation of *qnrB* expression: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, p. 821-823.
- Wasyl, D., A. Hoszowski, and M. Zajac, 2014, Prevalence and characterisation of quinolone resistance mechanisms in *Salmonella* spp: *Veterinary Microbiology*, v. 171, p. 307-314.
- Weese, J. S., J. M. Blondeau, D. Boothe, E. B. Breitschwerdt, L. Guardabassi, A. Hillier, D. H. Lloyd, M. G. Papich, S. C. Rankin, J. D. Turnidge, and J. E. Sykes, 2011, Antimicrobial use guidelines for treatment of urinary tract disease in dogs and cats: Antimicrobial guidelines working group of the international society for companion animal infectious diseases: *Veterinary Medicine International*, v. 2011, p. 263768, 1-9.
- Wegener, H. C., F. M. Aarestrup, L. B. Jensen, A. M. Hammerum, and F. Bager, 1999, Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe: *Emerging Infectious Diseases*, v. 5, p. 329-335.
- Whelan, K. F., E. Colleran, and D. E. Taylor, 1995, Phage inhibition, colicin resistance, and tellurite resistance are encoded by a single cluster of genes on the IncHI2 plasmid R478: *Journal of Bacteriology*, v. 177, p. 5016-5027.
- Whiteley, M., and D. E. Taylor, 1983, Identification of DNA homologies among H-Incompatibility group plasmids by restriction enzyme digestion and Southern transfer hybridization: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 24, p. 194-200.
- WHO, 2003, Impact of antimicrobial growth promoter termination in Denmark: WHO international panel's evaluation of the termination of the use of antimicrobial growth promoters in Denmark., World Health Organization, 57 pp.
- WHO, 2012, Critically important antimicrobials for human medicine, Geneva, Switzerland, World Health Organization, 32 pp.
- Williams, P. A., and K. Murray, 1974, Metabolism of benzoate and methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Evidence for existence of a TOL plasmid: *Journal of Bacteriology*, v. 120, p. 416-423.
- Wirth, T., D. Falush, R. T. Lan, F. Colles, P. Mensa, L. H. Wieler, H. Karch, P. R. Reeves, M. C. J. Maiden, H. Ochman, and M. Achtman, 2006, Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective: *Molecular Microbiology*, v. 60, p. 1136-1151.
- Woodford, N., A. Carattoli, E. Karisik, A. Underwood, M. J. Ellington, and D. M. Livermore, 2009, Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia*

- coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, p. 4472-4482.
- Woodford, N., J. F. Turton, and D. M. Livermore, 2011, Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance: *FEMS Microbiology Reviews*, v. 35, p. 736-755.
- Wozniak, R. A. F., and M. K. Waldor, 2010, Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow: *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, p. 552-563.
- Wu, T.-L., J.-H. Chia, L.-H. Su, C.-H. Chiu, A.-J. Kuo, L. Ma, and L. K. Siu, 2007, CMY-2  $\beta$ -lactamase-carrying community-acquired urinary tract *Escherichia coli*: genetic correlation with *Salmonella enterica* serotypes Choleraesuis and Typhimurium: *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 29, p. 410-416.
- Xiao, W., S. Zhang, Q. Zhao, Y. Wang, Y. Lai, Z. Li, and X. Cui, 2013, Diversity and heavy-metal tolerance of bacteria isolated from Gejiu tin mining area of Yunnan: *Weishengwu Xuebao*, v. 53, p. 1158-1165.
- Yagi, T., J. Wachino, H. Kurokawa, S. Suzuki, K. Yamane, Y. Doi, N. Shibata, H. Kato, K. Shibayama, and Y. Arakawa, 2005, Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*: *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 2551-2558.
- Yamane, K., J.-I. Wachino, S. Suzuki, K. Kimura, N. Shibata, H. Kato, K. Shibayama, T. Konda, and Y. Arakawa, 2007, New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, p. 3354-3360.
- Yang, Q.-E., J. Sun, L. Li, H. Deng, B.-T. Liu, L.-X. Fang, X.-P. Liao, and Y.-H. Lu, 2015, IncF plasmid diversity in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains from animals in China: *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 1-9.
- Yong, D., M. A. Toleman, C. G. Giske, H. S. Cho, K. Sundman, K. Lee, and T. R. Walsh, 2009, Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>NDM-1</sub>, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, p. 5046-5054.
- Zakharova, I. B., and D. V. Viktorov, 2015, Integrative conjugative elements (ICEs) of microorganisms: *Molecular Genetics Microbiology and Virology*, v. 30, p. 114-123.
- Zhang, H., Y. Zhou, S. Guo, and W. Chang, 2015, Multidrug resistance found in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from rural water reservoirs in Guantao, China: *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 1-4.
- Zhao, W.-H., and Z.-Q. Hu, 2011a, Epidemiology and genetics of VIM-type metallo- $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacilli: *Future Microbiology*, v. 6, p. 317-333.
- Zhao, W.-H., and Z.-Q. Hu, 2011b, IMP-type metallo- $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons: *Critical Reviews in Microbiology*, v. 37, p. 214-226.
- Zhao, W.-H., and Z.-Q. Hu, 2013, Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria: *Critical Reviews in Microbiology*, v. 39, p. 79-101.
- Zhao, X. L., C. Xu, J. Domagala, and K. Drlica, 1997, DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: A strategy for avoiding bacterial resistance: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, p. 13991-13996.
- Zinder, N. D., 1955, Bacterial transduction: *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, v. 45, p. 23-49.
- Zong, Z., A. N. Ginn, H. Dobiasova, J. R. Iredell, and S. R. Partridge, 2015, Different Inc11 plasmids from *Escherichia coli* carry *ISEcp1-bla*<sub>CTX-M-15</sub> associated with different Tn2-derived elements: *Plasmid*, v. 80, p. 118-126.
- Zong, Z., and R. Yu, 2010, *Escherichia coli* carrying the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene of ST648: *Journal of Medical Microbiology*, v. 59, p. 1536-1537.
- Zurfluh, K., M. T. Nuesch-Inderbinen, L. Poirel, P. Nordmann, H. Haechler, and R. Stephan, 2015, Emergence of *Escherichia coli* producing OXA-48  $\beta$ -lactamase in the community in Switzerland: *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, v. 4, p. 1-3.
- Zurfluh, K., J. Wang, J. Klumpp, M. Nuesch-Inderbinen, S. Fanning, and R. Stephan, 2014, Vertical transmission of highly similar *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-harboring Inc11 plasmids in *Escherichia coli* with different MLST types in the poultry production pyramid: *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 1-7.

## Internetové zdroje

AGAR, Australian Group on Antimicrobial Resistance. The evolution of carbapenemases in Enterobacteriaceae in Australia.

URL: [http://www.agargroup.org/files/AGAR\\_Carbapenemase\\_evolution%20Final.pdf](http://www.agargroup.org/files/AGAR_Carbapenemase_evolution%20Final.pdf)

EARS-Net, Antimicrobial resistance interactive database

URL: <http://ecdc.europa.eu/>

ICEberg, ICEberg: a web-based resource for integrative and conjugative elements found in Bacteria

URL: <http://db-mml.sjtu.edu.cn/ICEberg/>

INTEGRALL, The integron database

URL: <http://integrall.bio.ua.pt/>

IS Finder

URL: <https://www-is.biotoul.fr/>

PlasmidFinder

URL: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>

Plasmid MLST Database

URL: <http://pubmlst.org/plasmid/>

qnr numbering and sequence

URL: <http://www.lahey.org/qnrstudies/>

1. DOLEJSKÁ, M., BIEROŠOVÁ, B., KOHOUTOVÁ, L., LITERÁK, I., ČÍŽEK A., 2009, Antibiotic resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum betalactamases in surface water and sympatric black-headed gulls: *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, p. 1941-1950.
2. LITERAK, I., DOLEJSKA, M., CIZEK, A., DJIGO, C. A. T., KONECNY, A., KOUBEK, P., 2009, Reservoirs of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae among animals sympatric to humans in Senegal: extended-spectrum beta-lactamases in bacteria in a black rat (*Rattus rattus*): *African Journal of Microbiology Research*, v. 11, p. 751-754.
3. LITERAK, I., DOLEJSKA, M., RADIMERSKY, T., KLIMES, J., FRIEDMAN, M., AARESTRUP, F. M., HASMAN, H., CIZEK, A., 2010, Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars: *Journal of Applied Microbiology*, v. 108, p. 1702-1711.
4. LITERAK, I., DOLEJSKA, M., JANOSZOWSKA, D., HRUSAKOVA, J., WLODZIMIERZ, M., RZYSKA, H., BZOMA, S., CIZEK, A., 2010, Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea coast of Poland: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, p. 8126-8134.
5. DOLEJSKA, M., DUSKOVA, E., RYBARIKOVA, J., JANOSZOWSKA, D., ROUBALOVA, E., DIBDAKOVA, K., MASECKOVA, G., KOHOUTOVA, L., LITERAK, I., SMOLA, J., CIZEK, A., 2011, Plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from equine clinic and horseback riding centre: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, p. 757-764.
6. DOLEJSKA, M., JURCICKOVA, Z., LITERAK, I., POKLUDOVA, L., BURES, J., HERA, A., KOHOUTOVA, L., SMOLA, J., CIZEK, A., 2011, IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> in *Escherichia coli* isolates on a dairy farm: *Veterinary Microbiology*, v. 149, p. 513-516.
7. LITERAK, I., PETRO, R., DOLEJSKA, M., GRUBEROVA, E., DOBIASOVA, H., PETR, J., CIZEK, A., 2011, Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy urban children of two age categories with a view to their antibiotic therapy: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, p. 3005-3007.
8. DOLEJSKA, M., MATULOVA, M., KOHOUTOVA, L., LITERAK, I., BARDON, J., CIZEK, A. (2011) Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in turkey meat production flocks in the Czech Republic: National survey reveals widespread isolates with *bla*<sub>SHV-12</sub> genes on IncFII plasmids: *Letters in Applied Microbiology*, v. 53, 271-277.
9. DOLEJSKA, M., FLOREK, M., FLORKOVA, P., JAMBOROVA, I., PURGERTOVA, M., KUTILOVA, I., CIZEK, A., GUENTHER, S., LITERAK, I., 2011, CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, p. 2784-2790.
10. TAUSOVA, D., DOLEJSKA, M., CIZEK, A., HANUSOVA, L., HRUSAKOVA, J., SVOBODA, O., CAMLIK, G., LITERAK, I., 2012, *Escherichia coli* with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and plasmid mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, p. 1103-1107.
11. ALBRECHTOVA, K., DOLEJSKA, M., CIZEK, A., TAUSOVA, D., KLIMES, J., BEBORA, L., LITERAK, I., 2012, Dogs of nomadic pastoralists in northern Kenya are reservoirs of plasmid-mediated cephalosporin- and quinolone-resistant *Escherichia coli*, including pandemic clone B2-O25b-ST131: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, p. 4013-4017.
12. DOLEJSKA, M., BRHELOVA, E., DOBIASOVA, H., KRIVDOVA, J., JURANKOVA, J., SEVCIKOVA, A., DUBSKA, L., LITERAK, I., CIZEK, A., VAVRINA, M., KUTNIKOVA, L., STERBA, J. (2012) Dissemination of IncFII<sub>k</sub>-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates from children in hospital paediatric oncology wards: *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 40, p. 510-515.

13. LITERAK, I., MICUDOVA, M., TAUSOVA, D., CIZEK, A., **DOLEJSKA, M.**, PAPOUSEK, I., PROCHAZKA, J., VOJTECH, J., BORLEIS, F., GUARDONE, L., GUENTHER, S., HORDOWSKI, J., LEJAS, C., MEISSNER, W., MARCOS, BF., TUCAKOV, M., 2012, Plasmid-mediated quinolone resistance genes in fecal bacteria from rooks commonly wintering throughout Europe: *Microbial Drug Resistance*, v. 18, p. 567-573.
14. **DOLEJSKA, M.**, VILLA, L., HASMAN, H., HANSEN, L., CARATTOLI, A., 2013, Characterization of IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnr* genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, environment and humans: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 333-339.
15. **DOLEJSKA, M.**, VILLA, L., POIREL, L., NORDMANN, P., CARATTOLI, A., 2013, Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance-nodulation-cell division/multidrug efflux pump: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* v. 68, p. 34-39.
16. LITERAK, I., REITSCHMIED, T., BUJNAKOVA, D., **DOLEJSKA, M.**, CIZEK, A., BARDON, J., POKLUDOVA, L., ALEXA, P., HALOVA, D., JAMBOROVA, I., 2013, Broilers as a source of quinolone-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in the Czech Republic: *Microbial Drug Resistance*, v. 19, p. 57-63.
17. **DOLEJSKA, M.**, VILLA, L., DOBIASOVA, H., FORTINI, D., FEUDI, C., CARATTOLI, A., 2013, Plasmid content of a clinically relevant *Klebsiella pneumoniae* clone from the Czech Republic, producing CTX-M-15 and QnrB1: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, p. 1073-1076.
18. KLIMES, J., MACHALKOVA, M., **DOLEJSKA, M.**, CIZEK, A., JANOSZOWSKA, D., ALEXA, P., ALBRECHTOVA, K., VOJTECH, J., LITERAK, I., 2013, *Escherichia coli*-producing extended-spectrum beta-lactamases CTX-M-15 in a captive South American tapir (*Tapirus terrestris*): *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 44, p. 173-175.
19. ACCOGLI, M., FORTINI, D., GIUFRÈ, M., GRAZIANI, C., **DOLEJSKA, M.**, CARATTOLI, A., CERQUETTI, M., 2013, IncI1 plasmids associated with the spread of CMY-2, CTX-M-1 and SHV-12 in *Escherichia coli* of animal and human origin: *Clinical Microbiology and Infection*, v. 19, p. E238-240.
20. DOBIASOVA, H., **DOLEJSKA, M.**, JAMBOROVA, I., BRHELOVA, E., BLAZKOVA, L., PAPOUSEK, I., KOZLOVA, M., KLIMES, J., CIZEK, A., LITERAK, I., 2013, Extended spektrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic: *FEMS Microbiology Ecology*, v. 85, p. 604-611.
21. VILLA, L., CAPONE, A., FORTINI, D., **DOLEJSKA, M.**, RODRÍGUEZ, I., TAGLIETTI, F., DE PAOLIS, P., PETROSILLO, N., CARATTOLI, A., 2013, Reversion to susceptibility of a carbapenem resistant clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 2482-2486.
22. ALBRECHTOVA, K., PAPOUSEK, I., DE NYS, H., PAULY, M., ANOH, E., MOSSOUN, A., **DOLEJSKA, M.**, MASARIKOVA, M., METZGER, S., COUACY-HYMAN, E., AKOUA-KOFFI, C., WITTIG, R. M., KLIMES, J., CIZEK, A., LEENDERTZ, F. H., LITERAK, I., 2014, Low rates of antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae in wildlife in Taï National Park, Côte d'Ivoire, surrounded by villages with high prevalence of multiresistant ESBL-producing *Escherichia coli* in people and domestic animals: *PLOS One*, v. 9, e113548.
23. JANATOVA, M., ALBRECHTOVA, K., PETRZELKOVA, K. J., **DOLEJSKA, M.**, PAPOUSEK, I., MASARIKOVA, M., CIZEK, A., TODD, A., SHUTT, K., KALOUSOVA, B., PROFOUSOVA, I., MODRY, D., LITERAK, I., 2014, Antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae from humans and wildlife in Dzanga-Sangha Protected Area, Central African Republic: *Veterinary Microbiology*, v. 171, p. 422-431.
24. **DOLEJSKA, M.**, VILLA, L., MINOIA, M., GUARDABASSI, L., CARATTOLI, A., 2014, Complete sequences of IncHI1 plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnrS1* in equine *Escherichia coli* provide new insights into plasmid evolution: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, p. 2388-2393.
25. ALBRECHTOVA, K., KUBELOVA, M., MAZANCOVA, J., **DOLEJSKA, M.**, LITERAK, I., CIZEK, A., 2014, High prevalence and variability of CTX-M-15-producing and fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* observed in stray dogs in rural Angola: *Microbial Drug Resistance*, v. 20, p. 372-375.

26. JAMBOROVA, I., **DOLEJSKA, M.**, VOJTECH, J., GUENTHER, S., URICARIU, R., DROZDOWSKA, J., PAPOUSEK, I., PASEKOVA, K., MEISSNER, W., HORDOWSKI, J., CIZEK, A., LITERAK, I., 2015, Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and fluoroquinolones in various *Escherichia coli* sequence types isolated from rooks wintering in Europe: Applied and Environmental Microbiology, v. 81, p. 648-657.
27. STUDENTOVA, V., DOBIASOVA, H., HEDLOVA, D., **DOLEJSKA, M.**, PAPAGIANNITSIS, C. C., HRABAK, J., 2015, Complete nucleotide sequence of two NDM-1-encoding plasmids characterized from the same Sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae*: Antimicrobial Agents Chemotherapy, v. 59, p. 1325-1358.
28. PAPAGIANNITSIS C. C., **DOLEJSKA, M.**, IZDEBSKI, R., DOBIASOVA H., STUDENTOVA, V., ESTEVES, F. J., DERDE, L. P. G., BONTEN, M.J.M., HRABAK, J., GNIADKOWSKI, M., 2015, Characterization of pKP-M1144, a novel ColE1-like plasmid encoding IMP-8, GES-5, and BEL-1  $\beta$ -lactamases, from a *Klebsiella pneumoniae* sequence type 252 isolate: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 59, p. 5065-5068.
29. DOBIASOVA, H., VIDENSKA, P., **DOLEJSKA, M.**, 2015, Complete sequences of IncU plasmids harboring quinolone resistance genes *qnrS2* and *aac(6')-Ib-cr* in *Aeromonas* spp. from ornamental fish: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 60, p. 653-657.
30. **DOLEJSKA, M.**, MASARIKOVA, M., DOBIASOVA, H., JAMBOROVA, I., KARPISKOVA, R., HAVLICEK, M., CARLILE, N., PRIDDEL, D., CIZEK, A., LITERAK, I., 2016, High prevalence of *Salmonella* and IMP-4-producing Enterobacteriaceae in the silver gull on Five Islands, Australia: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 71, p. 63-70.
31. MASARIKOVA, M., MANGA, I., CIZEK, A., **DOLEJSKA, M.**, ORAVCOVA, V., MYSKOVA, P., KARPISKOVA, R., LITERAK, I., 2016, *Salmonella enterica* resistant to antimicrobials in wastewater effluents and black-headed gulls in the Czech Republic: Science of the Total Environment, v. 542, p. 102-107.
32. PAPAGIANNITSIS, C. C., **DOLEJSKA, M.**, IZDEBSKI, R., GIAKKOUPI, P., SKÁLOVÁ, A., CHUDĚJOVÁ, K., DOBIASOVA, H., VATOPOULOS, A. C., DERDE, L.P., BONTEN, M.J., GNIADKOWSKI, M., HRABÁK, J., 2016, Characterisation of IncA/C2 plasmids carrying an *In416*-like integron with the *bla*<sub>VIM-19</sub> gene from *Klebsiella pneumoniae* ST383 of Greek origin: International Journal of Antimicrobial Agents, v. 47, p. 158-162.
33. DOBIASOVA, H., KUTILOVA, I., PIACKOVA, V., VESELY, T., CIZEK, A., **DOLEJSKA, M.**, 2014, Ornamental fish as a source of plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic resistance plasmids: Veterinary Microbiology, v. 171, p. 413-421.
34. DOBIASOVA, H., **DOLEJSKA, M.**, 2016, Prevalence and diversity of IncX plasmids carrying fluoroquinolone and  $\beta$ -lactam resistance genes in *Escherichia coli* originating from diverse sources and geographical areas: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v tisku.

## Příloha 1

DOLEJSKÁ, M., BIEROŠOVÁ, B., KOHOUTOVÁ, L., LITERÁK, I., ČÍŽEK A., 2009, Antibiotic resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls: *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, p. 1941-1950.

### Souhrn

---

V této studii byly vzorky kloakálních výtěrů mláďat racků chechtavých hnízdících na vodním díle Nové Mlýny a vzorky vody vyšetřeny na přítomnost rezistentních izolátů *E. coli* a salmonel. Salmonely byly zjištěny v 16 % vzorků vody a u 24 % racků. *E. coli* s produkcí ESBL (CTX-M-1, CTX-M-15, SHV-2, SHV-12) byly identifikovány pouze ve vzorcích z racků. Studie dokumentuje významnou kontaminaci povrchové vody salmonelami a rezistentními kmeny *E. coli*. Rackové představují rezervoáry rezistentních kmenů včetně producentů ESBL.





## ORIGINAL ARTICLE

# Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls

M. Dolejská<sup>1</sup>, B. Bierošová<sup>1</sup>, L. Kohoutová<sup>2</sup>, I. Literák<sup>1</sup> and A. Čížek<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

## Keywords

antibiotics, *Escherichia coli*, extended-spectrum beta-lactamases, gulls, *Larus*, resistance, *Salmonella*, surface water.

## Correspondence

Monika Dolejská, Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Czech Republic.  
E-mail: m.dolejska@centrum.cz

2008/1520: received 4 September 2008, revised 27 October 2008 and accepted 3 November 2008

doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04155.x

## Abstract

**Aim:** To examine surface water from a pond in the northeastern part of the Czech Republic and young black-headed gulls (*Larus ridibundus*) nesting on the same pond for the presence of antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli*.

**Methods and Results:** A total of 16% ( $n = 87$ ) of water and 24% ( $n = 216$ ) of gull samples yielded *Salmonella*. *Salmonella* Enteritidis PT8 and PT4 were the most prevalent. Antibiotic resistance was found in 12% ( $n = 14$ ) of water and 28% ( $n = 51$ ) of gull salmonellae. *Escherichia coli* were found in 83 (95%) and 213 (99%) of pond water and gull samples, respectively. Totals of 18% ( $n = 83$ ) of water and 28% ( $n = 213$ ) of gull *E. coli* isolates were resistant to antimicrobial agents tested. Class 1 integrons were found in 21% ( $n = 14$ ) of water and 15% ( $n = 60$ ) of gull antibiotic-resistant *E. coli* isolates. Class 2 integrons and extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* isolates (with *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15-like</sub>, *bla*<sub>SHV-2</sub> and *bla*<sub>SHV-12</sub>) were found in 13% (eight positive,  $n = 60$  gull-resistant *E. coli* isolates) and 3% (seven positive,  $n = 216$  gull *E. coli* isolates) of gull isolates, respectively. Antibiotic-resistant *E. coli* isolates with identical pulsed field gel electrophoresis (PFGE) patterns were found in either gulls or water, but not both. Salmonellae of the same serotype and PFGE profile were found in both gulls and water.

**Conclusion:** A high prevalence of antibiotic-resistant salmonellae and *E. coli* were found in both pond water and in sympatric black-headed gulls.

**Significance and Impact of the Study:** Intensive contamination of pond surface water by antibiotic-resistant *E. coli* and salmonellae was documented. Black-headed gulls were identified as important reservoirs of antibiotic-resistant salmonellae and *E. coli*, including extended-spectrum beta-lactamase-producing isolates.

## Introduction

Increased introduction of antimicrobial agents into the environment via medical therapy, agriculture and animal husbandry has resulted in selective pressures on bacterial populations (Schwarz and Chaslus-Dancla 2001). The increase in the number of resistant and

multiresistant (resistant to two and more antimicrobials) strains of bacteria is a major concern of health officials worldwide. Recently, bacterial resistance arising through the production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) has been recognized as a worldwide therapeutic problem (Bush 2008; Cantón *et al.* 2008; Hawkey 2008).

Bacterial contamination of surface water, and particularly contamination with faecally derived bacteria, has long been a water quality issue owing to the potential for disease transmission. Antibiotic-resistant bacteria have been detected in various aquatic environments, including drinking water (Shehabi *et al.* 2006), rivers (Cernat *et al.* 2002), sewage (Anderson and Sobrey 2006) and marine water (Boehm *et al.* 2003). The transmission of resistance genes from environmental bacteria to human pathogens is considered an important risk for public health (Cernat *et al.* 2002; Walia *et al.* 2004). The introduction of resistant bacteria to surface waters through faecal contamination plays a role in both the occurrence and dissemination of resistance.

The black-headed gull (*Larus ridibundus*) is an abundant, migrating species that nests in colonies on water reservoirs in inland Eurasia (Hudec and Štastný 2005). Many studies have recorded the presence of both human and animal pathogens, mainly *Salmonella* spp. (Literák *et al.* 1992; Čížek *et al.* 1994; Nesse *et al.* 2005; Palmgren *et al.* 2006; Pennycott *et al.* 2006), in gulls. Moreover, gulls have been involved in several outbreaks of salmonellosis in animals (Johnston *et al.* 1979) and humans (Kruse *et al.* 2004).

Gulls have been identified as important reservoirs of antibiotic-resistant commensal bacteria, particularly *Escherichia coli*, including antibiotic resistance genes and integrons (Tsubokura *et al.* 1995; Dolejska *et al.* 2007; Gionechetti *et al.* 2008), probably reflecting the presence of such strains in their sources of food and/or water.

The aim of this study was to examine both pond surface water samples and samples from young, unfledged black-headed gulls nesting on the same pond for the presence of antibiotic-resistant *Salmonella* and *E. coli*. Any antibiotic resistance genes, integrons and ESBL in bacteria thus isolated were analysed and the identity of water and gull isolates were compared. In addition, the dynamics of occurrence of these bacteria in water was studied over the course of a year.

## Materials and Methods

### Sample collection

A total of 87 water samples were taken from the Heřmanický Pond near Ostrava in the northeastern part of the Czech Republic. Pond water was regularly sampled every 14 days over a 1-year period between November 2005 and November 2006. The samples were taken using the Moore swab method (Moore 1948). The swabs, sterilized at 121°C before use, were placed into the water for 24 h: at two sites at the inflow and two at the outflow of the pond. Next day, the swabs were taken out and placed into sterile

bags and transported to the laboratory in an isothermal box. A total of 216 cloacal swabs from young black-headed gulls nesting at this pond were taken in May 2006. Cloacal smears of gulls were placed on Amies Transport Medium (Oxoid, UK) and transported within several hours in an isothermic box to the laboratory for processing.

Heřmanický Pond lies in a valley of the River Odra and has a total area of about 120 ha. The source of the water for the pond is the River Vrbická Stružka. This river receives surface water that includes water probably contaminated by municipal waste from the cities of Petřvald, Orlová and Rychvald, with a total population of about 100 000 inhabitants. Water from the pond then flows back into the River Vrbická Stružka and, thereafter, into the River Odra. There is no evidence of contamination of the pond by agricultural waste. The pond serves as a nesting site for almost 250 species of birds (in particular for around 2000 nesting pairs of black-headed gulls) and as a traditional stop for migrating water birds. It is also intensively used for sport angling (Mandák 2004).

### *Salmonella* and *Escherichia coli* isolation and antibiotic susceptibility testing

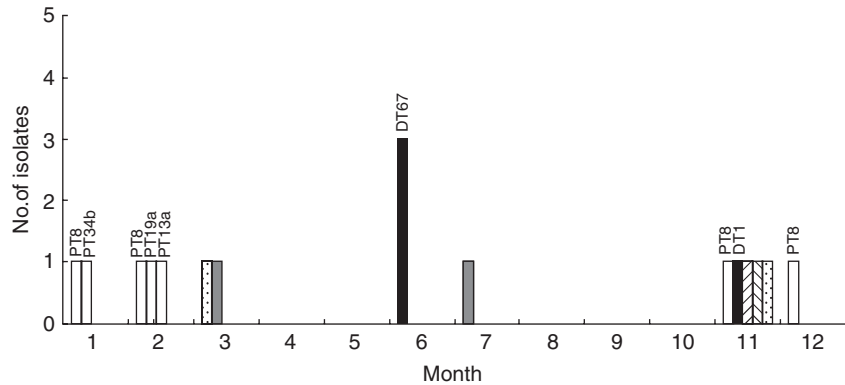
On the same day as sampling, Moore swabs and cloacal swabs from gulls were placed into buffered peptone water (BPW; Oxoid) and examined for *Salmonella* and *E. coli* as previously described by Čížek *et al.* (2007) and Literák *et al.* (2007). *Salmonella* isolates were serotyped and characterized by phage typing (Čížek *et al.* 2007).

The antibiotic susceptibility of *Salmonella* and *E. coli* isolates was tested using the disc diffusion method on Mueller-Hinton Agar (Oxoid), in accordance with Clinical Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI; NCCLS 2002) and using 12 antibacterial substances as previously described by Čížek *et al.* (2007).

### Polymerase chain reaction (PCR) for detecting antibiotic resistance determinants and integrons

In *E. coli* and *Salmonella* isolates found to be resistant to one or more antibiotics, PCR was used for detecting specific antibiotic resistance genes, the class 1 and 2 integrase genes *intI1* and *intI2*, respectively, and gene cassettes within class 1 and 2 integrons (Dolejska *et al.* 2007). The list of primers and control strains is shown in Table S1 (see Supporting Information). PCR products of the class 1 integron region amplified using the dhfr1/F and aadA5/R primers were purified (DyeEx 2.0 Spin Kit; Qiagen) and sequenced using an ABI 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). The results were compared with sequences previously published on the internet: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

**Figure 1** Numbers of *Salmonella* isolates obtained from water samples during a 1-year period (from January to December) including serotype and phagotype characterization. (□, *S. Enteritidis*; ■, *S. Typhimurium*; ▨, *S. Derby*; ▩, *S. Indiana*; ▪, *S. Infantis*; ▣, *S. Hadar*).



### Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

The one-day standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *E. coli* and *Salmonella* by PFGE, as recommended by PulseNet (Molecular Subtyping Network for Foodborne Bacterial Disease Surveillance, US – <http://www.cdc.gov/pulsenet>), was used on selected water and gull *E. coli* strains exhibiting the same antibiotic resistance phenotype and antibiotic resistance genes in order to compare their macrorestriction profiles and determine epidemiological relatedness, as well as for all antibiotic-resistant *Salmonella* isolates from water and gulls. The relatedness of the samples was analysed according to the criteria by Tenover *et al.* (1995). The samples with indistinguishable PFGE patterns (clones) were inscribed with the same letters. The samples with more than seven differences in PFGE patterns were designed as not related and inscribed with different letters.

### Extended-spectrum beta-lactamases

The samples were enriched in MacConkey broth and subcultivated onto MacConkey agar containing cefotaxime (2 mg l<sup>-1</sup>; Wu *et al.* 2008). The colonies were examined using the double-disc synergy test for the production of ESBL (Thomson and Sanders 1992; NCCLS 2002) and identified by the API 10S test kit (bioMerieux, France). The genes responsible for the ESBL phenotype (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA-1-like</sub>, *bla*<sub>OXA-2-like</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub>) were identified by PCR and the PCR products were further analysed using sequencing (ABI 310 Genetic Analyser; Applied Biosystems). The list of primers used is shown in Table S1.

## Results

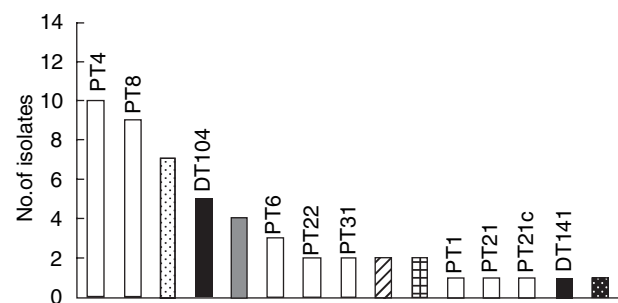
### *Salmonella*

A total of 14 (16%) of 87 pond water samples yielded *Salmonella* isolates. Using Fischer's exact test ( $P = 0.022$ ),

the prevalence of salmonellae was found to be significantly higher in samples from the water inflow (14 samples) as compared with those collected from the water outflow (3 samples). The highest number of isolates was found in water in November compared with the other months (Fig. 1). *Salmonella* Enteritidis was the most prevalent serotype, being found in 50% ( $n = 7$ ) of *Salmonella*-positive samples (Fig. 1).

Cloacal swabs were taken from 216 young black-headed gulls, of which 51 (24%) yielded *Salmonella*. Seven different serotypes were found in gulls (Fig. 2). *Salmonella* Enteritidis was the most prevalent serotype and *S. Enteritidis* PT4 followed by PT8 were predominant.

Resistance to one or more antibiotics was found in 14% ( $n = 2$ ) and 29% ( $n = 15$ ) of water and gull *Salmonella* isolates, respectively (Table 1). Four isolates of *Salmonella* Hadar with the same antibiotic-resistance profile (NaST – resistance to nalidixic acid, streptomycin and tetracycline) were detected in water and gulls. Resistance to nalidixic acid was the most prevalent, being found in 25% ( $n = 16$ ) of the isolates, and in particular in five of the six *S. Hadar* and 10 of 36 *S. Enteritidis* isolates. The following genes were identified in *Salmonella* isolates: *bla*<sub>TEM</sub> (resistance to ampicillin), *strA* (streptomycin) and *tetA* (tetracycline).



**Figure 2** *Salmonellae* isolated from black-headed gulls including serotypes and phagotypes. (□, *S. Enteritidis*; ■, *S. Typhimurium*; ▨, *S. Derby*; ▩, *S. Ohio*; ▪, *S. Kentucky*; ▪, *S. Infantis*; ▣, *S. Hadar*).

Source	Serotype (phagotype)	Antibiotic resistance profile*	No. of isolates	Antibiotic resistance genes	Pulsotype
Water	<i>Salmonella</i> Hadar	NaST	2	<i>strA</i> , <i>tetA</i>	L
Gulls	<i>Salmonella</i> Enteritidis (PT 1)	Na	1		K
	<i>S. Enteritidis</i> (PT 4)	Na	8		K
	<i>S. Enteritidis</i> (PT 31)	Na	1		K
	<i>S. Hadar</i>	Na	1		L
	<i>S. Hadar</i>	NaST	2	<i>strA</i> , <i>tetA</i>	L
	<i>Salmonella</i> Derby	A	1	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	M
	<i>S. Derby</i>	Na	1		M

\*A, ampicillin; Na, nalidixic acid; S, streptomycin; T, tetracycline.

All antibiotic-resistant salmonellae were tested by PFGE. *Salmonella* isolates of the same serotype, independent of the antibiotic resistance phenotype, exhibited the same macrorestriction profile (Table 1).

### *Escherichia coli*

*Escherichia coli* isolates were found in 83 (95%) of 87 pond water samples. Resistance to one or more antibiotics was detected in 14 (17%) of 83 *E. coli* isolates. In total, 6 (7%) of the 83 isolates were resistant to only one antimicrobial agent and the remaining 8 isolates were resistant to more than one agent. Tetracycline resistance was predominant, detected in nine isolates, followed by resistance to sulphonamides, ampicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole. The most common antibiotic resistance phenotypes were monoresistance to tetracycline and monoresistance to ampicillin. The results of the

antimicrobial susceptibility of *E. coli* isolates from pond water are summarized in Table 2.

A total of 213 (99%) *E. coli* isolates were obtained from 216 gull cloacal swab samples. Sixty (28%) of the isolates displayed resistance to antibiotics. Twelve (6%) of the 213 isolates were resistant to only one antimicrobial agent and the remaining 48 isolates were resistant to more than one agent. Resistance to the three antibiotics was most prevalent. Resistance to tetracycline was predominant, found in 46 of the isolates, followed by resistance to ampicillin, streptomycin, sulphonamides and trimethoprim-sulfamethoxazole (Table 2). The most common antibiotic resistance phenotypes were resistance to ampicillin, streptomycin and sulphamethoxazole (phenotype AST), found in nine isolates.

The following genes were identified in *E. coli* isolates: *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>-like (resistance to ampicillin), *tetA*, *tetB* (tetracycline), *strA*, *aadA1*, *aadA2*, *aadA5* (streptomycin),

Antibiotics	No. of resistant isolates (prevalence %)		Statistical significance of differences*
	Pond water (n = 83)	Gulls (n = 213)	
Tetracycline	9 (11)	46 (22)	<i>P</i> = 0.021
Sulphonamides	8 (10)	28 (13)	NS
Ampicillin	7 (8)	41 (19)	<i>P</i> = 0.016
Trimethoprim-sulfamethoxazole	7 (8)	19 (9)	NS
Streptomycin	3 (4)	32 (15)	<i>P</i> = 0.003
Chloramphenicol	2 (2)	6 (3)	NS
Nalidixic acid	1 (1)	13 (6)	NS
Ciprofloxacin	0 (0)	7 (3)	NS
Cephalotin	0 (0)	3 (1)	NS
Gentamicin	0 (0)	1 (<1)	NS
Amoxicillin-clavulanic acid	0 (0)	0 (0)	NT
Ceftazidime	0 (0)	0 (0)	NT

Differences in prevalence were compared using Fisher's exact test. Statistical significance is indicated at *P* ≤ 0.05.

\*NS, not significant; NT, not tested.

**Table 2** Prevalence of antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates from pond water and black-headed gulls

*sul1*, *sul2*, *sul3* (sulphonamides) and *cat*, *cmlA*, *floR* (chloramphenicol). The majority of water and gull ampicillin-resistant isolates yielded the *bla*<sub>TEM</sub> gene while two isolates were negative for all *bla* genes tested. As regards tetracycline resistance determinants, the gene *tetA* was predominant in tetracycline-resistant isolates from gulls while the gene *tetB* was found in the majority of isolates from water. Isolates with both genes (*tetA* and *tetB*) were frequent in gulls. One tetracycline-resistant isolate from a gull was negative for all *tet* determinants tested. The *sul2* gene was the predominant sulphonamide resistance determinant in both groups of isolates and a combination of two *sul* genes (*sul1* and *sul2*) was frequently found in both water and gull samples. A list of all antibiotic-resistant *E. coli* isolates from pond water and black-headed gulls, including antibiotic resistance profiles and antibiotic resistance genes, is shown in Table 3.

#### Integrations and gene cassettes in *Escherichia coli* isolates

Three of 14 antibiotic-resistant *E. coli* isolates from water yielded the *intI1* gene and class 1 integron. A class 1 integron of 1.6 kb with the gene cassette *dhfr12-aadA2* was present in two *E. coli* isolates, and one isolate contained a 1.5 kb integron with the *dhfr1-aadA1* cassette. One *sul1*-positive isolate with the *aadA5* gene cassette but without the *intI1* gene was detected, suggesting a mutation in the 5' conservative region of the integron.

Nine of the 60 antibiotic-resistant *E. coli* isolates from gulls possessed the *intI1* gene and gene cassettes in variable regions of the class 1 integron. The spectrum of integrations in gull isolates was heterogeneous and varied from those found in water samples; seven different types of integrations were found in total: integrations of 1 kb with *aadA1* or *aadA2* cassette, 1.5 kb integron with *dhfr1-aadA1*, 1.7 kb integron with *dhfr17-aadA5*, 1.9 kb integron with *bla*<sub>OXA-1</sub>-like-*aadA1*. Two *intI1*-positive samples were negative for variable region of class 1 integron; one of them with *dhfr1* cassette and the other contained *aadA1* gene. One 2 kb integron with an unusual combination of gene cassettes, *dhfr1-catB3-aadA4*, was found in a gull isolate. The sequence analysed was identical to sequences stored in the GenBank under accession no. AM939644 (*E. coli* isolate 980, class 1 integron) and AY214164 (*E. coli* plasmid pAPEC-02-R). Two isolates were negative for a variable region of the class 1 integron, probably as a result of a mutation inside the integron structure (data not shown). One *sul1*-positive isolate proved negative for *intI1* as well as for all gene cassettes tested.

Class 2 integrations were found only in gull isolates. Eight of all antibiotic-resistant isolates were positive for the *intI2* gene; however, the PCR reaction for the variable

region of the class 2 integron was negative in one of these. Three types of class 2 integrations were found. A class 2 integron with a variable region of 2.5 kb in size and the *estX-sat-aadA1* gene cassette was found in three *E. coli* isolates; an integron 2 kb in size with the *dhfr1-sat-aadA1* cassette was found in three isolates and a 1.5 kb integron with the *sat-aadA1* cassette was seen in one isolate.

#### Macrorestriction profile analysis

Sixteen *E. coli* isolates (five from water, eleven from gulls) that exhibited the same antibiotic-resistance profile and genes were analysed by PFGE. Identical isolates (clones) were found among gull isolates or among water isolates, but no relatedness was found between gull and water isolates (Table 4). PFGE patterns of the isolates can be seen in Fig. S1 (see Supporting Information).

#### ESBL-producing *Escherichia coli*

No ESBL-producing isolates were found in water samples. *Escherichia coli* isolates producing ESBL were found in seven (3%, *n* = 216) samples from gulls. The genes *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (one isolate), *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-like (two), *bla*<sub>SHV-2</sub> (one) and *bla*<sub>SHV-12</sub> (two) were found. One ESBL-producing isolate was negative for all *bla* genes tested. All *bla*<sub>SHV</sub>-positive isolates exhibited the same antibiotic resistance profile, ACf (resistance to ampicillin and cephalothin). All *bla*<sub>CTX-M</sub>-positive isolates were resistant to four to seven antimicrobials. Two of these carried a class 1 integron of 1.7 kb with the *dhfr17-aadA5* gene cassette, and the remaining one contained a 1.5 kb class 1 integron with *dhfr1-aadA1*.

#### Discussion

Contamination of surface water with untreated manure and sewage continues to be a serious environmental problem. The pond that we examined is situated within a large industrial area densely inhabited with humans. The area is not important from an agricultural point of view and there are no large livestock farms that introduce an influential amount of wastes of animal origin into surface waters. In our study, we demonstrate a high level of contamination of pond surface water by salmonellae. The spectrum of serotypes and phagotypes of *Salmonella enterica* isolated from pond water indicates their human and/or animal origin. *Salmonella* Enteritidis PT8 was the most prevalent serotype found in water in 2006 and, at the same time, this phagotype was also predominant in both humans and animals in the Czech Republic (Renata Karpíšková, National Institute of Public Health in Prague, personal communication). *Salmonella* Hadar isolates with

**Table 3** List of antibiotic-resistant *Escherichia coli* from pond water and gulls

Source	Antibiotic resistance phenotype*	Antibiotic resistance genes†	No. of strains	
Water	A	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	1	
		ND	1	
	T	<i>tetA</i>	2	
		<i>tetA, tetB</i>	1	
	Su	<i>sul1, aadA5</i>	1	
	CT	<i>cmlA, tetA</i>	1	
	SuSxt	<i>sul2</i>	1	
	SSuT	<i>strA, sul2, tetB</i>	1	
	ASuSxt	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>sul2</i>	1	
	ASuSxtT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>sul1, sul2, tetA, int1</i> , 11 1.5 kb: <i>dhfr1-aadA1</i>	1	
	ANaSuSxtT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>sul1, sul2, int1</i> , 11 1.6 kb: <i>dhfr12-aadA2</i>	1	
	ASSuSxtT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA, sul2, tetA</i>	1	
	ACSSuSxtT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>cat, strA, sul1, sul2, tetB, int1</i> , 11 1.6 kb: <i>dhfr12-aadA2</i>	1	
	Gulls	A	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	3
		Na	NT	1
S		<i>aadA1, int12</i>	1	
T		<i>tetA</i>	1	
T		<i>tetB</i>	3	
T		<i>tetA, int12</i> , 12 2.5 kb: <i>estX-sat-aadA1</i>	1	
T		<i>tetB, int12</i> , 12 2.5 kb: <i>estX-sat-aadA1</i>	1	
AS		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>aadA1, int12</i>	1	
ASxt		<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	1	
CipNa		NT	1	
NaT		<i>tetB</i>	2	
SSu		<i>strA, sul2</i>	1	
ST		<i>strA, tetB</i>	1	
SuT		<i>sul3, tetA</i>	1	
ACT		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>cat, tetA</i>	1	
ACipNa		<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	1	
ANaT		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tetB</i>	1	
AST		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA, tetA</i>	4	
		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA, tetB</i>	2	
		<i>strA, tetB</i>	1	
		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA, tetA, tetB</i>	1	
ASuT		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>sul3, tetB</i>	1	
SSuT		<i>sul1, tetB, int1</i> , 11 1 kb: <i>aadA1</i> , 11 1 kb: <i>aadA2</i>	1	
SuCipNa		<i>sul1</i>	1	
SuSxtT		<i>sul1, tetA, int1</i> , 11 2 kb: <i>dhfr1-catB3-aadA4, int12</i>	1	
ACipNaT		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tetB</i>	1	
ACSSu		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>cat, strA, sul2</i>	1	
ACSuT		<i>cat, sul1, tetB, int1</i> , 11 1.8 kb: <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> -like- <i>aadA1</i>	1	
ASSuSxt		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA, sul1, sul2, int1</i> , 11 1.5 kb: <i>dhfr17-aadA5</i>	1	
ASSuT		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA, sul2, tetA</i>	1	
ASuSxtT		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>sul1, tetA, int1</i> , 11 1.5 kb: <i>dhfr1-aadA1</i>	1	
		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>sul3, tetB</i>	1	
CSuSxtT		<i>cat, sul2, tetA</i>	1	
ACfSSuT		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA, sul2, tetB</i>	1	
ASSuSxtT		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA, sul2, tetA</i>	3	
		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA, sul2, tetA, int12</i> , 12 2 kb: <i>dhfr1-sat-aadA1</i>	1	
		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA, sul2, tetA, int12</i> , 12 2.5 kb: <i>estX-sat-aadA1</i>	1	
		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA, sul2, tetB</i>	1	
		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA, sul1, sul2, tetA, tetB, int1</i> , 11 1.5 kb: <i>dhfr17-aadA5</i>	1	
ACfSSuSxtT		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA, sul2, tetA</i>	1	
		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA, sul2, tetB</i>	1	
ACSSuSxtT		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA, sul2, tetA</i>	1	
		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>cat, strA, sul2, tetB, int12</i> , 12 2 kb: <i>dhfr1-sat-aadA1</i>	1	



**Table 3** (Continued)

Source	Antibiotic resistance phenotype*	Antibiotic resistance genes†	No. of strains
	ANaSSuSxtT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetB</i> , <i>int11</i> , <i>dhfr1</i>	1
	ACipNaSSuSxtT	<i>strA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>int11</i> , I1 1.5 kb: <i>dhfr1-aadA1</i>	1
	ACCfCipGnNaSSuSxtT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>floR</i> , <i>strA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetB</i> , <i>int11</i> , <i>aadA1</i>	1

\*A, ampicillin; C, chloramphenicol; Cf, cephalotin; Cip, ciprofloxacin; Gn, gentamicin; Na, nalidixic acid; S, streptomycin; Su, sulfonamides cp.; Sxt, trimethoprim-sulfamethoxazole; T, tetracycline.

†ND, not determined; NT, not tested; I1, class 1 integron; I2, class 2 integron.

**Table 4** *Escherichia coli* isolates analysed by pulsed field gel electrophoresis

Group	Antibiotic resistance phenotype*	Antibiotic resistance genes	Pulsotype	
			Designation	Source
1	A	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	A	Water (1)
			B	Gulls (3)
2	T	<i>tetA</i>	C	Water (2)
			D	Gulls (2)
3	ASuSxtT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>int11</i> , 1.5 kb integron: <i>dhfr1-aadA1</i>	E	Water (1)
			F	Gulls (1)
4	ASSuSxtT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>	G	Water (1)
			H	Gulls (5)

\*A, ampicillin; S, streptomycin; Su, sulfonamides cp.; Sxt, trimethoprim-sulfamethoxazole; T, tetracycline.

resistance to nalidixic acid, streptomycin and tetracycline are exclusively isolated from human samples in the Czech Republic (Renata Karpíšková, personal communication), indicating contamination of the water in the pond by human sewage. On the other hand, *Salmonella* Derby, isolated from pond water, is exclusively found in pigs in the Czech Republic (Renata Karpíšková, personal communication).

A high prevalence of *Salmonella* was recorded among young black-headed gulls. A total of 24% ( $n = 216$ ) of gull samples yielded *Salmonella* isolates as compared with 27% ( $n = 132$ ) of isolates found from the same colony in 2005 (Čížek *et al.* 2007). The spectrum of serotypes and phagotypes in gulls varied between 2006 and 2005, probably reflecting different contamination sources for gull colonization. The most prevalent phagotype in 2005, S. Enteritidis PT6, was replaced by PT4 and PT8 in 2006. The PT4 phagotype is predominant to the west of the Czech Republic, suggesting an additional source of this phagotype in black-headed gulls outside their nesting area. *Salmonella* Enteritidis PT8, S. Derby and antibiotic-resistant S. Hadar were frequently found in gulls as well as in pond water.

*Escherichia coli* was isolated in pond surface water from both the inflow and outflow throughout the year. Various studies provide evidence that *E. coli* can persist in secondary, nonhost habitats such as freshwater and water sediments (Hendricks and Morrison 1967; Flint 1987;

Anderson *et al.* 2005). An increase in faecal *E. coli* contamination of natural waters in the summer months and higher survival and growth at warmer temperatures was reported by Ksoll *et al.* (2007), although a negative rate of growth and decreased survival in secondary habitats was also observed. There is probably, therefore, a continuous bulk transfer from human and animal sources to maintain a stable population outside the animal hosts (Savageau 1983). Our results demonstrate an intensive and permanent faecal contamination of the pond.

Black-headed gulls have been identified as reservoirs of antibiotic-resistant salmonellae and *E. coli*, including integron-carrying isolates (Čížek *et al.* 2007; Dolejska *et al.* 2007). Edge and Hill (2005) demonstrated that bird faeces might be a more prominent contributor of *E. coli* to surface waters than municipal wastewater sources. Omnivorous adult black-headed gulls from colonies in the Czech Republic gather food for their young over an area of about 10 km around the nesting colonies (Hudec and Štastný 2005) and, as such, have sufficient opportunities to become infected through by-products of animal and human origin. We consider the sources of *E. coli* infections in young black-headed gulls to be from outside the pond water and local environment owing to the differing spectrum of *E. coli* isolates found in gulls in 2006 and in the water of the Heřmanický Pond in November 2005/November 2006, as well as the differing spectrum of *E. coli* isolates found in gulls in 2006 and gulls examined

at the same location in 2005. However, further investigations must be performed to confirm this statement. We did not find any isolate with the same antibiotic-resistance profile, antibiotic resistance genes and macro-restriction profile in isolates from water and gulls in 2006. A few studies have reported little genetic similarity between *E. coli* populations in hosts and those in the environment where faeces from those hosts accumulate (Gordon 2001; Gordon *et al.* 2002; McLellan 2004). As with our study, McLellan (2004) found that some *E. coli* strains isolated from river water were more closely related to isolates taken from different river sites or collected on other days than they were related to *E. coli* strains from known sources of faecal contamination (e.g. gulls) at these sites.

We found integrons in both water and black-headed gull isolates. The prevalence of integron-positive *E. coli* was higher in gulls as compared with water and the spectrum of integrons was more variable in gulls. We believe that this is because of additional sources of strains with integrons in the food of gulls outside the pond water. A class 1 integron, 2 kb in size, with a unique combination of gene cassettes (*dhfr1-catB3-aadA4*) was detected in a black-headed gull isolate. A similar type of integron was recently found in poultry *E. coli* in Hungary (2.4 kb, *dhfr1-catB3-aadA5*; Nógrády *et al.* 2006). The sequence of the integron we detected was identical with the integron described by Kadlec and Schwarz (in press) in an animal *E. coli* isolate in Germany between 2004 and 2006 (GenBank accession no. AM939644). This type of integron was also identified as part of the pAPEC-O2-R plasmid in an avian pathogenic *E. coli* strain isolated from a chicken with obvious disease manifestation in the United States in 2005 (Johnson *et al.* 2005).

Class 2 integrons were demonstrated only in gull isolates, with integrons 2.5 kb in size with *estX-sat-aadA1* and 2 kb with *dhfr1-sat-aadA1* being the most prevalent. The same types of integrons have been sporadically found in *E. coli* from pigs in Norway and Switzerland (Sunde 2005; Cocchi *et al.* 2007). According to our knowledge, this is the first report of class 2 integrons in wildlife.

Some isolates with class 1 and class 2 integrons were positive for streptomycin-resistant gene *aadA* but did not exhibit corresponding antibiotic resistance phenotype. It was demonstrated that streptomycin resistance genes associated with integrons mostly provide reduced susceptibility to these agents rather than full resistance, probably owing to low-level gene expression (Collins and Hall 1995; Martinez-Freijo *et al.* 1998).

We detected ESBL-producing *E. coli* in 3% of the black-headed gull samples. The ESBL genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> that we found in these isolates are

the most prevalent ones world-wide. The *bla*<sub>CTX-M</sub> and especially *bla*<sub>CTX-M-1</sub> genes have now become increasingly dominant in Europe (Cantón *et al.* 2008). All the *bla*<sub>CTX-M</sub>-positive *E. coli* from gulls in our study contained class 1 integrons with genes cassettes; *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-positive *E. coli* contained *dhfr1-aadA1* and *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-like positive *E. coli* isolates were positive for *dhfr17-aadA5*. The *bla*<sub>CTX-M</sub> gene has recently been identified as frequently found on the same genetic elements as class 1 integrons (Cantón *et al.* 2008). The ESBL SHV-12 and SHV-2 that we found in gull *E. coli* isolates are the most prevalent enzymes within the SHV family (Cantón *et al.* 2008). They have been reported all over the world in *Klebsiella pneumoniae* and, more recently, in *E. coli* from humans and food-producing animals (Valverde *et al.* 2004; Hernández *et al.* 2005; Miró *et al.* 2005; Blanc *et al.* 2006; Machado *et al.* 2008). Little information is available on the spreading of ESBL-producing *E. coli* isolates into the environment and wildlife. ESBL-producing *E. coli* with *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *bla*<sub>SHV-12</sub> has been found in birds of prey in Portugal (Costa *et al.* 2006). We therefore consider our observation of the occurrence of ESBL-producing *E. coli* in black-headed gulls that commonly occupy water reservoirs in inland Europe somewhat alarming. It provides evidence that the ESBL-producing *E. coli* selected for in humans and food-producing animals are colonizing wild gulls and that, via these birds, the emerging ESBL-producing *E. coli* isolates can be spread into the environment in the same way as *E. coli* isolates resistant to older generations of antimicrobials, as we recently documented (Dolejska *et al.* 2007).

## Acknowledgements

This study was funded by grant no. MSM6215712402 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and grant IGA VFU 162/2008 FVL. The authors thank Renata Karpíšková from the Centre for Food Chain Hygiene, Brno, National Institute of Public Health in Prague, Czech Republic, for recent data on the occurrence of human and animal salmonellosis in the Czech Republic.

## References

- Anderson, M.E. and Sobrey, M.D. (2006) Detection and occurrence of antimicrobially resistant *Escherichia coli* in groundwater on or near swine farms in eastern North Carolina. *Water Sci Technol* **54**, 211–218.
- Anderson, K.L., Whitlock, J.E. and Harwood, V.J. (2005) Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. *Appl Environ Microbiol* **71**, 3041–3048.



- Blanc, V., Mesa, R., Saco, M., Lavilla, S., Prats, S., Miró, E., Navarro, F., Cortés, P. *et al.* (2006) ESBL- and plasmidic class C beta-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Vet Microbiol* **118**, 299–304.
- Boehm, A.B., Fuhrman, J.A., Mrse, R.D. and Grant, S.B. (2003) Tiered approach for identification of a human fecal pollution source at a recreational beach: case study at Avalon Bay, Catalina Island, California. *Environ Sci Technol* **37**, 673–680.
- Bush, K. (2008) Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in North America, 1987–2006. *Clin Microbiol Infect* **14**, 134–143.
- Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F. and Coque, T.M. (2008) Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* **14**, 144–153.
- Cernat, R., Lazăr, V., Balotescu, C., Cotar, A., Coipan, E. and Cojocar, C. (2002) Distribution and diversity of conjugative plasmids among some multiple antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains isolated from river waters. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol* **47**, 147–153.
- Čížek, A., Literák, I., Hejlíček, K., Tremel, F. and Smola, J. (1994) *Salmonella* contamination of the environment and its incidence in wild birds. *J Vet Med B* **41**, 320–327.
- Čížek, A., Dolejská, M., Karpíšková, R., Dědičová, D. and Literák, I. (2007) Wild black-headed gulls (*Larus ridibundus*) as an environmental reservoir of *Salmonella* strains resistant to antimicrobial drugs. *Eur J Wildl Res* **53**, 55–60.
- Cocchi, S., Grasselli, E., Gutacker, M., Benagli, C., Convert, M. and Piffaretti, J.C. (2007) Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. *FEMS Immunol Med Microbiol* **50**, 126–132.
- Collins, C.M. and Hall, R.M. (1995) Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 155–162.
- Costa, D., Poeta, P., Sáenz, Y., Vinué, L., Rojo-Bezares, B., Jouini, A., Zarazaga, M., Rodrigues, J. *et al.* (2006) Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J Antimicrob Chemother* **58**, 1311–1312.
- Dolejska, M., Cizek, A. and Literak, I. (2007) High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from black-headed gulls in the Czech Republic. *J Appl Microbiol* **103**, 11–19.
- Edge, T.A. and Hill, S. (2005) Occurrence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* from surface waters and faecal pollution sources near Hamilton, Ontario. *Can J Microbiol* **51**, 501–505.
- Flint, K.P. (1987) The long-term survival of *Escherichia coli* in river water. *J Appl Bacteriol* **63**, 261–270.
- Gionechetti, F., Zucca, P., Gombac, F., Monti-Bragadin, C., Lagatolla, C., Tonin, E., Edalucci, E., Vitali, L.A. *et al.* (2008) Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons in Enterobacteriaceae isolated from Mediterranean herring gulls (*Larus cachinnans*). *Microb Drug Resist* **14**, 93–99.
- Gordon, D.M. (2001) Geographical structure and host specificity in bacteria and the implications for tracing the source of coliform contamination. *Microbiology* **147**, 1079–1085.
- Gordon, D.M., Bauer, S. and Johnson, J.R. (2002) The genetic structure of *Escherichia coli* populations in primary and secondary habitats. *Microbiology* **148**, 1513–1522.
- Hawkey, P.M. (2008) Prevalence and clonality of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Asia. *Clin Microbiol Infect* **14**, 159–165.
- Hendricks, C.W. and Morrison, S.M. (1967) Multiplication and growth of selected enteric bacteria in clear mountain stream water. *Water Res* **1**, 567–576.
- Hernández, J.R., Martínez-Martínez, L., Cantón, R., Coque, M.T. and Pascual, A. and Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH) (2005) Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2122–2125.
- Hudec, K. and Štastný, K. (2005) *Larus ridibundus* Linnaeus. In *Ptáci – Aves, Fauna ČR II/2 (Birds of the Czech Republic, in Czech)*, pp. 759–769. Prague: Academia.
- Johnson, T.J., Siek, K.E., Johnson, S.J. and Nolan, L.K. (2005) DNA sequence and comparative genomics of pAPEC-O2-R, an avian pathogenic *Escherichia coli* transmissible R plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4681–4688.
- Johnston, W.S., Maclachlan, G.K. and Hopkána, G.F. (1979) The possible involvement of seagulls (*Larus* spp.) in the transmission of *Salmonella* in dairy cattle. *Vet Rec* **105**, 526–527.
- Kadlec, K. and Schwarz, S. (2008) Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons and associated gene cassettes among *Escherichia coli* isolates from swine, horses, cats and dogs collected in the BfT-GermVet monitoring study. *J Antimicrob Chemother*, doi: 10.1093/jac/dkn233.
- Kruse, H., Kirmeno, A.M. and Handeland, K. (2004) Wildlife as a source of zoonotic infections. *Emerg Infect Dis* **10**, 2067–2072.
- Ksoll, W.B., Ishii, S., Sadowsky, M.J. and Hicks, R.E. (2007) Presence and sources of fecal coliform bacteria in epilithic periphyton communities of Lake Superior. *Appl Environ Microbiol* **73**, 3771–3778.
- Literák, I., Čížek, A. and Honza, M. (1992) Using examinations of young black-headed gulls (*Larus ridibundus*) for the detection of *Salmonella* in the environment. *Acta Vet Brno* **61**, 141–146.
- Literák, I., Vanko, R., Dolejská, M., Čížek, A. and Karpíšková, R. (2007) Antibiotic resistant *Escherichia coli* in Russian rooks (*Corvus frugilegus*) wintering in the Czech Republic. *Lett Appl Microbiol* **45**, 616–621.

- Machado, E., Coque, T.M., Cantón, R., Sousa, J.C. and Peixe, L. (2008) Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *J Antimicrob Chemother* **62**, 296–302.
- Mandák, M. (2004) Heřmanický rybník – významná ornitologická lokalita (Heřmanický Pond – important ornithological locality, in Czech). *Acrocephalus (Ostrava)* **20**, 2–53.
- Martinez-Freijo, P., Fluit, A.C., Schmitz, F.J., Grek, V.S.C., Verhoef, J. and Jones, M.E. (1998) Class I integrons in gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother* **42**, 689–696.
- McLellan, S.L. (2004) Genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from urban rivers and beach water. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4658–4665.
- Miró, E., Mirelis, B., Navarro, F., Rivera, A., Mesa, R.J., Roig, M.C., Gómez, L. and Coll, P. (2005) Surveillance of extended spectrum  $\beta$ -lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother* **56**, 1152–1155.
- Moore, B. (1948) The detection of paratyphoid carriers in towns by means of sewage examination. *Mon Bull Minist Health Public Health Lab Serv* **9**, 72–78.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved standard M31-A2. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Nesse, L.L., Refsum, T., Heir, E., Nordby, K., Vardund, T. and Holstad, G. (2005) Molecular epidemiology of *Salmonella* spp. isolates from gulls, fish-meal factories, feed factories, animals and humans in Norway based on pulsed-field gel electrophoresis. *Epidemiol Infect* **133**, 53–58.
- Palmgren, H., Aspán, A., Broman, T., Bengtsson, K., Blomquist, L., Bergström, S., Sellin, M., Wollin, R. et al. (2006) *Salmonella* in black-headed gulls (*Larus ridibundus*); prevalence, genotypes and influence on *Salmonella* epidemiology. *Epidemiol Infect* **134**, 635–644.
- Pennycott, T.W., Park, A. and Mather, H.A. (2006) Isolation of different serovars of *Salmonella enterica* from wild birds in Great Britain between 1995 and 2003. *Vet Rec* **158**, 817–820.
- Savageau, M.A. (1983) *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanism of gene control. *Am Nat* **122**, 732–744.
- Schwarz, S. and Chaslus-Dancla, E. (2001) Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res* **32**, 201–225.
- Shehabi, A.A., Odeh, J.F. and Fayyad, M. (2006) Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from human stools and drinking water sources in Jordan. *J Chemother* **18**, 468–472.
- Sunde, M. (2005) Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin. *J Antimicrob Chemother* **56**, 1019–1024.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Pensing, D.H., Swaminathan, B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**, 2233–2239.
- Thomson, K.S. and Sanders, C.C. (1992) Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 1877–1882.
- Tsubokura, M., Matsumoto, A., Otsuki, K., Animas, S.B. and Sanekata, T. (1995) Drug resistance and conjugative R plasmids in *Escherichia coli* strains isolated from migratory waterfowl. *J Wildl Dis* **31**, 352–357.
- Valverde, A., Coque, T.M., Sánchez-Moreno, M.P., Rollán, A., Baquero, F. and Cantón, R. (2004) Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol* **42**, 4769–4775.
- Walia, S.K., Kaiser, A., Parkash, M. and Chaudhry, G.R. (2004) Self-transmissible antibiotic resistance to ampicillin, streptomycin, and tetracycline found in *Escherichia coli* isolates from contaminated drinking water. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* **39**, 651–662.
- Wu, S., Chouliara, E., Hasman, H., Dalsgaard, A., Vieira, A. and Jensen, L.B. (2008) Detection of a single isolate of CTX-M-1-producing *Escherichia coli* from healthy pigs in Denmark. *J Antimicrob Chemother* **61**, 747–749.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1** Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) patterns of *Escherichia coli* isolates from water and gulls with the same antibiotic resistance phenotype and antibiotic resistance genes. The same PFGE patterns are indicated by the same letter. Lines 10 and 16, control strain *Salmonella* Braenderup H9812; lanes 1 and 2, *E. coli* type C (water); lines 3, 4 and 6, *E. coli* type B (gull); line 5, *E. coli* type A (water); line 7, *E. coli* type E (water); line 8, *E. coli* type F (gull); line 9, *E. coli* type G (water); lines 11–15, *E. coli* type H (gull); line 17, *E. coli* type D (gull).

**Table S1** List of primers used in this study.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

## Příloha 2

LITERAK, I., DOLEJSKA, M., CIZEK, A., DJIGO, C. A. T., KONECNY, A., KOUBEK, P. ,2009, Reservoirs of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae among animals sympatric to humans in Senegal: extended-spectrum beta-lactamases in bacteria in a black rat (*Rattus rattus*): African Journal of Microbiology Research, v. 11, p. 751-754.

### Souhrn

---

Vyšetřením vzorků rektálních výtěrů vybraných skupin savců ze Senegalu byly identifikovány dva kmeny s produkcí ESBL, které pocházely z krysy obecné. Jednalo se o izoláty *E. coli* s CTX-M-15 a *Enterobacter cloacae* s TEM-52. Studie poukazuje na možný význam sympatrických druhů hlodavců v šíření rezistentních bakterií.



Full Length Research Paper

# Reservoirs of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae among animals sympatric to humans in Senegal: extended-spectrum beta-lactamases in bacteria in a black rat (*Rattus rattus*)

Ivan Literak<sup>1\*</sup>, Monika Dolejska<sup>1</sup>, Alois Cizek<sup>2</sup>, Chiekh Ahmed Tidiane Djigo<sup>3</sup>, Adam Konecny<sup>4,5</sup> and Petr Koubek<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic.

<sup>2</sup>Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic.

<sup>3</sup>Administration of the Niokolo Koba National Park, Tambacounda, Senegal.

<sup>4</sup>Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic.

<sup>5</sup>Centre de Biologie et de Gestion des Populations, INRA-IRD, Montferrier sur Lez, France.

Accepted 2 October, 2009

**In Senegal, rectal swabs from cattle, wild rodents and chiropterans were cultured for Enterobacteriaceae. Isolates were tested for susceptibility to antimicrobial agents. Two cefotaxime-resistant isolates were found in a black rat (*Rattus rattus*): a multiresistant *Escherichia coli* with *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene and *Enterobacter cloacae* resistant to ampicillin and cephalotin with *bla*<sub>TEM-52b</sub> gene. Sympatric rats in Senegal may represent an important reservoir for antibiotic-resistant. Enterobacteriaceae including extended-spectrum beta-lactamases producing isolates.**

**Key words:** Antibiotics, resistance, *Escherichia*, *Enterobacter*, rat, Senegal.

## INTRODUCTION

Recently, bacteria isolated from feces and rectal swabs of wild and domestic animals in Europe and North America were examined for antimicrobial susceptibility. Close associations were found between occurrences of resistant bacteria in humans, domestic and sympatric wild animals (Skurnik et al., 2006). This may have been influenced by the use of antimicrobial agents. Data regarding occurrence of antibiotic-resistant bacteria in African domestic and wild mammals are limited. We examined cattle, wild rodents and chiropterans sympatric to humans in southeastern Senegal for the presence of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae. Our results are presented and discussed in this paper.

## MATERIAL AND METHODS

In September 2007, we examined domestic cattle (n = 48; 31 cows, 4 haifers, and 13 calves), wild rodents (n = 45; *Rattus rattus* 33, *Arvicola ansorgei* 4, *Myomys daltoni* 3, *Mastomys erythroleucos* 2, *Tatera guinea* 2, *Mus musculus* 1) and chiropterans (n = 24; *Epomorphorus gambianus* 19, *Micropteropus pusilus* 3, *Hiposideros gigas* 2) sympatric to humans, from two locations in southeastern Senegal for the presence of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae. Wild rodents and chiropterans were caught using live traps and mist nets, respectively, in places inhabited by humans. Rectal swabs obtained from all the sampled animals were stored in Amies transport medium before laboratory testing.

Individual rectal swabs were placed overnight in Buffered Peptone Water (BPW) (Oxoid, UK) at 37 °C, and then cultured for *E. coli* on Chromogenic medium for *E. coli* and coliform bacteria (Oxoid). One suspect colony of each plate was identified using API10S test kit (bioMérieux, France) and tested for susceptibility to antimicrobial agents in accordance with CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute). Antibiotic susceptibility was tested by disk diffusion method on Mueller-Hinton agar (Oxoid) using the

\*Corresponding author. E-mail: [literaki@vfu.cz](mailto:literaki@vfu.cz). Tel: +420541 562 630. Fax: +420 541 652 631.

following antimicrobials and concentrations: amoxicillin-clavulanic acid (30 µg), ampicillin (10 µg), cephalothin (30 µg), ceftazidime (30 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), nalidixic acid (30 µg), streptomycin (10 µg), sulphamethoxazole-trimethoprim (25 µg), sulphonamides (300 µg), and tetracycline (30 µg) (Oxoid). In *E. coli* isolates found to be resistant to one or more of the antibiotics listed above, polymerase chain reaction (PCR) was used to detect specific antibiotic-resistance genes, integrase genes *int1* and *int2*, and gene cassettes within class 1 and 2 integrons (Dolejska et al. 2007, for the list of primers see Literak et al., in press).

For isolation of extended-spectrum beta-lactamase-producing and quinolone-resistant Enterobacteriaceae, the samples were enriched overnight at 37°C in MacConkey broth (Oxoid) and after that subcultured on MacConkey agar containing cefotaxime (2 mg L<sup>-1</sup>) and MacConkey agar containing nalidixic acid (20 mg L<sup>-1</sup>) to detect Enterobacteriaceae resistant to cefotaxime and nalidixic acid, respectively. The cefotaxime-resistant colonies were examined using the double-disk synergy test for the production of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) (CLSI 2002) and identified by the API 10S test kit (bioMérieux). The genes responsible for the ESBL phenotype (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub>) were identified by PCR and the products were further analysed using sequencing (ABI 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems). The primers 1537 and 1580 were used for sequencing of *bla*<sub>CTX-M-1</sub> group and the primers 686 and 757 were used for sequence analysis of *bla*<sub>TEM</sub> (Literak et al., in press). Transferability of *bla* genes was tested by conjugation (Literak et al., in press). Plate-mating experiments were done using plasmid-free, rifampicin and nalidixic acid resistant *E. coli* MT102RN and *Salmonella* Typhimurium SL5325 as recipients (Caroff et al., 1999; Olesen et al., 2004).

## RESULTS AND DISCUSSION

A total of 48 isolates of *E. coli* were obtained from 48 samples (one sample - one isolate) of cattle in Dar Salam (13°15' N, 13°12' W). Three isolates were resistant to tetracycline encoded by the *tetA* gene. Using a selective cultivation, one more *E. coli* isolate resistant to nalidixic acid but susceptible to ciprofloxacin was obtained. We do not consider the cattle in that area of Senegal to comprise an important reservoir of resistant *E. coli* nor as a risk factor for transmitting resistant *E. coli* to people living in close contact with their cattle. It should be noted that an *E. coli* isolate resistant to tetracycline originating from cattle has been documented in Kenya, which is also in tropical Africa (Kikuvu et al., 2007).

A total of 37 and 24 *E. coli* isolates from 37 wild rodents and 24 chiropterans respectively, in Dar Salam were obtained by cultivation on Chromogenic medium. Two (5%) isolates from wild rodents, both from black rats (*Rattus rattus*), were resistant: one resistant to tetracycline carrying the *tetA* gene and one multiresistant to sulphonamides, sulphamethoxazole-trimethoprim and tetracycline with the *sul2* and *tetA* genes. Only one (4%) isolate from chiropterans (*Micropteropus pusillus*) was resistant to tetracycline due to presence of the *tetA* gene. No antibiotic-resistant isolates were obtained using selective cultivation on media with cefotaxime or nalidixic acid. The prevalence of resistant isolates in both wild rodents and chiropterans in Dar Salam was low, and, as in cattle, the most frequent resistance was to tetracycline.

The information on antimicrobial usage in people as well as in domestic animals in Dar Salam is limited, and there was probably only small pressure for selection of resistant *E. coli* in their populations and consequently for the spreading of resistant isolates or genetic determinants of resistance to sympatric populations of wild animals. A study in Indonesia showed that the use of antimicrobials in people and domestic animals and fecal contamination of the environment was associated with the isolation of resistant Enterobacteriaceae in sympatric wild rodents including black rats and chiropterans (Graves et al., 1988).

Additionally, eight wild rodents sympatric to human buildings were examined in Tambacounda (13°45' N, 13°40' W). Using cultivation on Chromogenic medium 8 *E. coli* isolates were obtained, however, resistance to antimicrobials tested was not found in any isolate. Using the selective method of cultivation on medium with cefotaxime or nalidixic acid, two *E. coli* isolates resistant to nalidixic acid and sensitive to ciprofloxacin were found in two black rats. Moreover two isolates of cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae were found in another black rat. Found were an *E. coli* isolate resistant to ampicillin, streptomycin, sulphonamides, sulphamethoxazole-trimethoprim and tetracycline with genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *strA*, *sul2*, and *tetA*, as well as an *Enterobacter cloacae* isolate with the *bla*<sub>TEM-52b</sub> gene. The *bla* genes failed to transfer by conjugation into *E. coli* and *Salmonella*. Tambacounda is a town with poor hygienic conditions where wild rodents commonly inhabit buildings with humans and can be easily colonized with fecal bacterial strains excreted by humans or resistance determinants can be spread by horizontal gene transfer.

The dissemination of ESBLs is a problem of global magnitude, with rates of production being particularly high in some enterobacterial species, especially *Klebsiella pneumoniae* and *E. coli* (Rossolini et al., 2008). Various types of ESBLs (TEM, SHV, CTX-M) has been documented recently in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in different regions of Africa (Kariuki et al., 2001, Usha et al., 2008, Ehlers et al., 2009). The CTX-M-15 beta-lactamase has been detected in hospital isolates of *Salmonella enterica* in Senegal (Weill et al., 2004), *Klebsiella pneumoniae* isolates connected with community-acquired urinary tract infections in Nigeria (Soge et al., 2006). CTX-M-15 is also wide spread in hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* and *Enterobacter cloacae* in Algeria (Touati et al., 2006, 2007, labadene et al., 2008, Massai et al., 2008) and Tunisia (Ktari et al., 2006, Abbassi et al., 2008). Global dissemination of CTX-M-15 and importance of clonal spreading has recently been documented by Clermont et al. (2008). These authors reported a clone of CTX-M-15-producing *E. coli* spreading through Europe, Tunisia and Central African Republic.

Recently, two children with no known antibiotic exposure living in a remote Senegalese village, were found to be fecal carriers of a multiresistant *E. coli* clone that pro-



duced CTX-M-15 beta-lactamase (Ruppe et al., 2009). These isolates were able to transfer resistance to cephalosporins since the presence of *bla*<sub>CTX-M-15</sub> was confirmed by PCR in the transconjugants. This highlights the current massive spread of extended-spectrum beta-lactamases, especially CTX-M-15, even in isolated communities.

TEM-52 has been seen in non-typhoid *Salmonella* of human origin and *Salmonella* seems to be the preferred reservoir for this ESBL type (Yates et al., 2004; Hasman et al., 2005). Only few TEM-52 producers are reported in animals. The gene *bla*<sub>TEM-52</sub> has been documented in *E. coli* from pets (Costa et al. 2004) and food-producing animals (Brinas et al. 2005). In the wild, the gene *bla*<sub>TEM-52</sub> has been detected in *E. coli* from wild birds and game in Portugal (Costa et al., 2008, Poeta et al., 2008) and wild boars in the Czech Republic (Literak et al., in press). To define the extent of the spread of ESBLs, the characterization of antibiotic-resistant bacteria needs to be done in each geographical area and different environments including wildlife, especially in areas where resources are limited and antibiotics are unregulated (Okeke et al., 1999).

We conclude that rats sympatric to humans in Senegal, similarly as rats in Kenya (Gakyua et al., 2001), represent a possibly important reservoir for antibiotic-resistant Enterobacteriaceae including ESBL producing strains.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by grants nos. MSM6215712402 (Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic) and IAA 6093403 (Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic).

## REFERENCES

- Abbassi MS, Torres C, Achour W, Vinue L, Saenz Y, Costa D, Bouchami O, BenHassen A (2008). Genetic characterisation of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated from stem cell transplant patients in Tunisia. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 32: 308–314.
- Brinas L, Moreno MA, Teshager T (2005). Monitoring and characterization of extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 1262–1264.
- Caroff N, Espaze E, Berard I, Richet H, Reynaud A (1999). Mutations in the ampC promoter of *Escherichia coli* isolates resistant to oxyiminocephalosporins without extended spectrum beta-lactamase production. *FEMS Microbiol. Lett.* 173: 459–465.
- Clermont O, Lavollay M, Vimont S, Deschamps C, Forestier C, Branger C, Denamur E, Arlet G (2008). The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J. Antimicrob. Chemother.* 61: 1024–1028.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute Guidelines (2002) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved standard M31-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Costa D, Poeta P, Brinas L, Saenz Y, Rodrigues J, Torres C (2004). Detection of CTX M-1 and TEM-52 beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 54: 960–961.
- Costa D, Poeta P, Saenz Y, Vinue L, Coelho AC, Matos M, Rojo-Bezares B, Rodrigues J, Torres C (2008). Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from wild animals. *Microb. Drug Resist.* 14: 71–77.
- Dolejska M, Cizek A, Literak I (2007). High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from black-headed gulls in the Czech Republic. *J. Appl. Microbiol.* 103: 11–19.
- Dolejska M, Biersova B, Kohoutova L, Literak I, Cizek A (2009). Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. *J. Appl. Microbiol.* 106: 1941–1950.
- Ehlers MM, Veldsman C, Makgotlo EP, Dove MG, Hoosen AA, Kock MM (2009). Detection of *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> antibiotic resistance genes in randomly selected bacterial pathogens from the Steve Biko Academic Hospital. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 56: 191–196.
- Gakuya FM, Kyule MN, Gathura PB, Kariuki S (2001). Antimicrobial susceptibility and plasmids from *Escherichia coli* isolated from rats. *East Afr. Med. J.* 78: 518–522.
- Graves SR, Kennelly-Merritt SA, Tidemann CR, Rawlinson PA, Harvey KJ, Thornton IWB (1988). Antibiotic-resistance patterns of enteric bacteria of wild mammals on the Krakatau Island and West Java, Indonesia. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 322: 339–353.
- Hasman H, Mevius D, Veldman K, Olesen I, Aarestrup FM (2005). Beta-lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* 56:115–121.
- labadene H, Messai Y, Ammari H, Ramdani-Bouguessa N, Lounes S, Bakour R, Arlet G (2008). Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J. Antimicrob. Chemother.* 62: 133–136.
- Kariuki S, Corkill JE, Revathi G, Musoke R, Hart CA (2001). Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2141–2143.
- Kikui GM, Schwarz S, Ombui NJ, Mitema ES, Kehrenberg C (2007). Streptomycin and chloramphenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolates from cattle, pigs, and chicken in Kenya. *Microb. Drug Resist.* 13: 62–68.
- Ktari S, Arlet G, Mnif B, Gautier V, Mahjoubi F, Ben Jmeaa M, Bouaziz M, Hammami A (2006). Emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing VIM-4 metallo-beta-lactamase, CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase, and CMY-4 AmpC beta-lactamase in a Tunisian university hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 4198–4201.
- Literak I, Dolejska M, Radimersky T, Klimes J, Friedman M, Aarestrup FM, Hasman H, Cizek A. Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *E. coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *J. Appl. Microbiol.* In press.
- Messai Y, labadene H, Benhassine T, Alouache S, Tazir M, Gautier V, Arlet G, Bakour R (2008). Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathol. Biol.* 56: 319–325.
- Okeke IN, Lamikanra A, Edelman R (1999). Socioeconomic and behavioral factors leading to acquired bacterial resistance to antibiotics in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 18–27.
- Olesen I, Hasman H, Aarestrup FM (2004). Prevalence of beta-lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microb. Drug Res.* 10: 334–340.
- Poeta P, Radhouani H, Igrejas G, Goncalves A, Carvalho C, Rodrigues J, Vinue, Somalo S, Torres C (2008). Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta lactamases. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 7439–7441.
- Rossolini GM, D'Andrea MM and Mugnaioli C (2008). The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin. Microbiol.*

- Infect. 14(1): 33–41.
- Ruppe E, Woerther PL, Diop A, Sene AM, Da Costa A, Arlet G, Andremont A, Rouveix B (2009). Carriage of CTX-M-15 – producing *Escherichia coli* among remote-living children in Senegal. *Antimicrobial Agents Chemother.* 53: 3135-3137.
- Skurnik D, Ruimy R, Andremont A, Amarin C, Rouquet P, Picard B, Denamur E (2006). Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 1215–1219.
- Soge O, Queenan AM, Ojo KK, Adeniyi BA, Roberts MC (2006). CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase from Nigerian *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 24–30.
- Touati A, Benallaoua S, Djoudi F, Madoux J, Brasme L, De Champs C (2006). Characterization of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated from hospital environments in Algeria. *Microb. Drug Res.* 13: 85–89.
- Touati A, Benallaoua S, Djoudi F, Madoux J, Brasme L, De Champs C (2007). Characterization of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated from hospital environments in Algeria. *Microb. Drug Res.* 13: 85–89.
- Usha G, Chunderika M, Prashini M, Willem SA, Yusuf ES (2008). Characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Salmonella spp.* at a tertiary hospital in Durban, South Africa. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 62: 86–91.
- Weill FX, Perrier-Gros-Claude JD, Demartin M, Coignard S, Grimont PA (2004). Characterization of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-15)-producing strains of *Salmonella enterica* isolated in France and Senegal. *FEMS Microbiol. Lett.* 238: 353–358.
- Yates CM, Brown DJ, Edwards GF, Amye SG (2004). Detection of TEM-52 in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated in Scotland. *J. Antimicrob. Chemother.* 53: 407–408.



## Příloha 3

LITERAK, I., DOLEJSKA, M., RADIMERSKY, T., KLIMES, J., FRIEDMAN, M., AARESTRUP, F. M., HASMAN, H., CIZEK, A., 2010, Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *E. coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars: Journal of Applied Microbiology, v. 108, p. 1702-1711.

### Souhrn

---

Vybrané druhy volně žijících savců z České a Slovenské republiky byly vyšetřeny na přítomnost rezistentních koliformních bakterií. Z prasat divokých bylo získáno pět (6 %) izolátů *E. coli* s produkcí ESBL, u kterých byl gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub> nesen na Inc11 plazmidu. Studie dokumentuje šíření klinicky významné antimikrobiální rezistence k volně žijícím savcům.



## ORIGINAL ARTICLE

**Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars**I. Literak<sup>1</sup>, M. Dolejska<sup>1</sup>, T Radimersky<sup>1</sup>, J. Klimes<sup>1</sup>, M. Friedman<sup>1</sup>, F.M. Aarestrup<sup>2</sup>, H. Hasman<sup>2</sup> and A. Cizek<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> National Food Institute, Technical University of Denmark, Copenhagen, Denmark

<sup>3</sup> Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

**Keywords**

antibiotic resistance, Czech Republic, intestinal bacteria, Slovakia, *Sus scrofa*.

**Correspondence**

Ivan Literak, Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackeho 1–3, 612 42 Brno, Czech Republic.  
E-mail: literaki@vfu.cz

2009/0712: received 23 April 2009, revised 3 September 2009 and accepted 15 September 2009

doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04572.x

**Abstract**

**Aims:** To determine the presence of antibiotic-resistant faecal *Escherichia coli* in populations of wild mammals in the Czech Republic and Slovakia.

**Methods and Results:** Rectal swabs or faeces collected during 2006–2008 from wild mammals were spread on MacConkey agar and MacConkey agar containing 2 mg l<sup>-1</sup> of cefotaxime. From plates with positive growth, one isolate was recovered and identified as *E. coli*. Susceptibility to 12 antibiotics was tested using the disk diffusion method. Resistance genes, class 1 and 2 integrons and gene cassettes were detected in resistant isolates by polymerase chain reaction (PCR). Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) were further characterized by DNA sequencing, macrorestriction profiling and determination of plasmid sizes. Plasmid DNA was subjected to *EcoRV* digestion, transferability by conjugation and incompatibility grouping by multiplex PCR. The prevalence of resistant isolates was 2% in small terrestrial mammals (rodents and insectivores,  $n_{E. coli} = 242$ ), 12% in wild ruminants and foxes ( $n_{E. coli} = 42$ ), while no resistant isolates were detected in brown bears ( $n_{E. coli} = 16$ ). In wild boars (*Sus scrofa*) ( $n_{E. coli} = 290$ ), the prevalence of resistant isolates was 6%. Class 1 and 2 integrons with various gene cassettes were recorded in resistant isolates. From wild boars, five (2%,  $n_{rectal\ smears} = 293$ ) multiresistant isolates producing ESBL were recovered: one isolate with  $bla_{CTX-M-1} + bla_{TEM-1}$ , three with  $bla_{CTX-M-1}$  and one with  $bla_{TEM-52b}$ . The  $bla_{CTX-M-1}$  genes were carried on approx. 90 kb IncII conjugative plasmids.

**Conclusions:** Antibiotic-resistant *E. coli* occurred in populations of wild mammals in various prevalences.

**Significance and Impact of the Study:** Wild mammals are reservoirs of antibiotic-resistant *E. coli* including ESBL-producing strains which were found in wild boars.

**Introduction**

The increasing antimicrobial resistance in bacteria is a current problem in medicine. In the veterinary area, the alarming state of bacterial antibiotic resistance is seen in

examining the *Escherichia coli* isolates, where attention has been given especially to food-producing animals such as pigs, cattle and domestic fowl (White 2006). A phenomenon studied rather more recently is the spreading of resistant *E. coli* strains into the environment beyond

the populations directly influenced by the antibiotic practice and the subsequent colonization of wild animal populations.

We have studied the occurrence of resistant commensal *E. coli* in the populations of various wild bird species in the Czech Republic (Dolejska *et al.* 2007, 2008, 2009; Literak *et al.* 2007). The prevalence of resistant *E. coli* was found to be high in omnivorous synanthropic birds like black-headed gulls (*Larus ridibundus*) and rooks (*Corvus frugilegus*), while in house sparrows (*Passer domesticus*) from cattle stables the prevalence was substantially lower. Wild birds colonized by resistant *E. coli*, and particularly the synanthropic bird species with high prevalence of resistant *E. coli*, can thus become important reservoirs and vectors of these strains that are potentially concerning because of the presence of conjugatively transferable determinants of resistance.

Attention has been given to some species of wild mammals regarding the occurrence of commensal resistant *E. coli* in various parts of the world (Rolland *et al.* 1985; Routman *et al.* 1985; Graves *et al.* 1988; Kinjo *et al.* 1992; Gilliver *et al.* 1999; Livermore *et al.* 2001; Swiecicka *et al.* 2003; Costa *et al.* 2006; Kozak *et al.* 2009; Schierack *et al.* 2009). An extensive study analysing antibiotic resistance in 449 *E. coli* isolates from 77 wild mammal species of 14 families was carried out in Australia (Sherley *et al.* 2000). The results from Australia demonstrated a low but widespread prevalence of antimicrobial resistance in wild isolates. Geographical location and host group significantly influenced the antibiotic resistance profile of isolates.

The goal of the present study is to characterize the central European (Czech and Slovak) populations of wild mammals regarding the occurrence of commensal antimicrobial-resistant *E. coli*.

## Material and methods

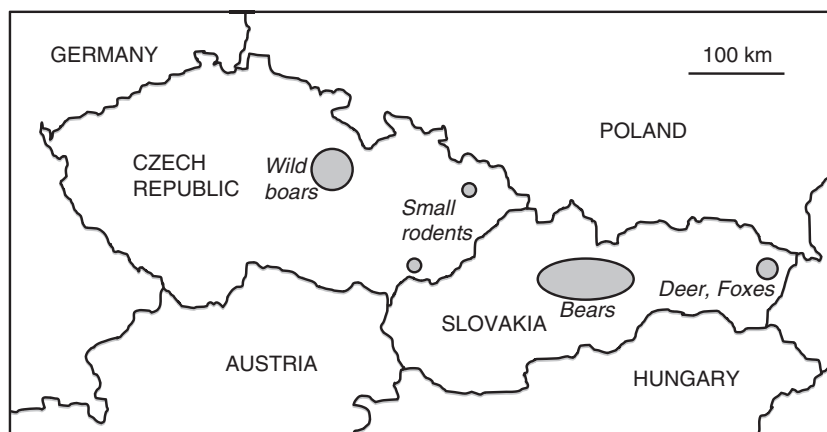
### Animals

Small terrestrial mammals (Rodentia, Insectivora) were captured in a suburban and forest environment. They were snap trapped and dissected. During dissection, samples of the large intestines' contents were collected for the subsequent *E. coli* isolation. In the suburban environment of the village of Kunin (north-eastern Czech Republic), small terrestrial mammals were captured near fields and family houses with gardens in May 2007 and 2008. In a forest environment frequented by people but not by farm animals near the village of Vracov (south-eastern Czech Republic), small terrestrial mammals were captured in September 2008.

Large wild mammals (Cervidae, Canidae) were examined in Poloniny National Park (NP) in north-eastern Slovakia. Faecal samples of these mammals were collected in winter of 2006/2007 and 2007/2008. The brown bear (*Ursus arctos*) is a carnivore living in the mountains of Slovakia. Its present population density is maintained by regulated culling. Rectal swabs were collected from brown bears that were shot in the Low Tatras NP in central Slovakia during 2005–2007. The wild boar (*Sus scrofa*) is common in central Europe and is a frequently hunted game species. Rectal swabs were collected from wild boars that were shot near Litomyšl and Opava (central and north-eastern Czech Republic) in 2006 and 2007 (Fig. 1).

### Sample collection and processing

Individual rectal swabs from wild pigs, samples of intestinal content from small terrestrial mammals or samples of faeces were placed overnight in buffered peptone water



**Figure 1** Sampling sites in the Czech Republic and Slovakia.

(BPW) at 37°C, then cultivated for *E. coli* and tested for susceptibility to 12 antimicrobial agents as previously described (Literak *et al.* 2007). Briefly, one colony of each plate was tested for susceptibility to antimicrobial agents in accordance with CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA). Antibiotic susceptibility was tested by disk diffusion method on Mueller–Hinton agar (CM337; Oxoid, UK) using antibacterial substances: amoxicillin–clavulanic acid (30 µg), ampicillin (10 µg), cephalothin (30 µg), ceftazidime (30 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), nalidixic acid (30 µg), streptomycin (10 µg), trimethoprim–sulfamethoxazole (25 µg), sulfonamides compounds (300 µg) and tetracycline (30 µg) (Oxoid). In *E. coli* isolates found to be resistant to one or more of the antibiotics listed above, polymerase chain reaction (PCR) was used to detect specific antibiotic-resistant genes, integrase genes *int1* and *int2*, and gene cassettes within class 1 and 2 integrons (Dolejska *et al.* 2007; Literak *et al.* 2007). The presence of genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA-2-like</sub>, *bla*<sub>OXA-1/-30</sub>, *cat*, *cmlA*, *floR*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *strA*, *int1*, *int2*, variable region of class 1 integron, variable region of class 2 integron, *dhfr1*, *dhfr12*, *dhfr17*, *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *estX* and *sat1/2* was tested with primers and under the conditions listed in Table 1. The control strains *E. coli* F134, H195, HR17, M2, M44, M66, M148, OP1, R128, *Aeromonas* sp. A233, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104S1 and *Klebsiella pneumoniae* ATTC700603 were used. All *E. coli* strains were identified by the API 10S test (BioMerieux, France).

The samples from BPW were enriched with MacConkey broth and subcultivated onto MacConkey agar containing cefotaxime (2 mg l<sup>-1</sup>) to detect *E. coli* strains with extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) (Wu *et al.* 2008). The colonies were examined using the double-disc synergy test for the production of ESBL (Thomson and Sanders 1992; CLSI 2008a) and identified by the API 10S test. The genes responsible for the ESBL phenotype (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub>) were identified by PCR, and the products were further analysed using sequencing (ABI 310 Genetic Analyser; Applied Biosystems). The primers 1537 and 1580 were used for sequencing of *bla*<sub>CTX-M-1 group</sub>, and the primers 686 and 757 were used for sequence analysis of *bla*<sub>TEM</sub> (Table 1).

Antimicrobial susceptibility of all the ESBL-positive isolates was tested quantitatively by broth microdilution with cation-adjusted Mueller–Hinton broth, according to CLSI guidelines (CLSI 2008b). Microtitre trays were used with dehydrated dilution ranges of custom-made panels of antibiotics (Trek Diagnostic System, East Grinstead, UK). The following antimicrobial agents were included in

the panel: amoxicillin–clavulanic acid, ampicillin, apramycin, cefpodoxime, ceftiofur, cephalotin, chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, florfenicol, gentamicin, nalidixic acid, neomycin, spectinomycin, streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline and trimethoprim with the test ranges and Subcommittee on Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing (CLSI/VAST) breakpoints as described previously (CLSI 2008b). Identification of *E. coli* phylogenetic groups was performed using a multiplex PCR assay (Clermont *et al.* 2000) in all the ESBL isolates. By this method, *E. coli* isolates can be divided into four main phylogenetic groups (A, B1, B2 and D) according to the presence of *chuA* and *yjaA* genes and DNA fragment TSPE4.C2. The isolates were typed by *Xba*I-pulsed field gel electrophoresis (PFGE) (CDCP 2004). The samples with no band differences were designed as indistinguishable and possibly epidemiologically linked, and the samples with the different PFGE patterns (more than three band changes) were epidemiologically unrelated (Tenover *et al.* 1995).

Transferability of *bla* genes was tested by conjugation. Plate mating experiments were performed using plasmid-free, rifampicin-resistant and nalidixic acid-resistant *E. coli* MT102RN and *Salm.* Typhimurium SL5325 as recipients (Caroff *et al.* 1999; Olesen *et al.* 2004). The strains were grown to exponential phase, mixed (1 : 1), and 500 µl of the donor and recipient mixture was incubated using a bacteriological filter on the surface of blood agar at 37°C overnight. Transconjugants were selected on brain heart infusion (BHI) medium supplemented with 25 mg l<sup>-1</sup> rifampicin, 32 mg l<sup>-1</sup> nalidixic acid and 2 mg l<sup>-1</sup> cefotaxime.

Plasmids of ESBL strains were characterized by replicon typing and *EcoRV* digestion. Primarily plasmid DNA was extracted using the Qiagen plasmid midi kit (Qiagen, Germany). Plasmid DNA was introduced to competent *E. coli* Genehogs® (Invitrogen, USA) by electroporation followed by the selection of transformants on BHI agar supplemented with cefotaxime (2 mg l<sup>-1</sup>). The presence of relevant *bla* gene in transformants was confirmed by PCR. The size of the plasmid with ESBL gene from transformants was designated by S1-PFGE. Plasmid DNA from transformants was digested with *EcoRV* and subjected to gel electrophoresis in 0.8% agarose gel for 4 h at 4.0 V cm<sup>-1</sup>. Plasmids were replicon typed as previously described (Carattoli *et al.* 2005).

The following abbreviations are used for resistance phenotype in this study: ampicillin (A), amoxicillin–clavulanic acid (Ac), chloramphenicol (C), cephalotin (Cf), ceftazidime (Cfz), ciprofloxacin (Cip), gentamicin (Gn), nalidixic acid (Na), streptomycin (S), sulfonamides cp. (Su), trimethoprim–sulfamethoxazole (Sxt) and tetracycline (T).

**Table 1** List of primers for antibiotic resistance genes used in the study

Primer	Primer sequence (5'–3')	Amplified gene	Anneling temp. (°C)	Amplicon size (bp)	Reference
tetA/F	GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC	<i>tetA</i>	55	210	Ng <i>et al.</i> (1999)
tetA/R	CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG				
tetB/F	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG	<i>tetB</i>	55	659	Ng <i>et al.</i> (1999)
tetB/R	GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG				
tetC/F	CTT GAG AGC CTT CAA CCC AG	<i>tetC</i>	55	418	Ng <i>et al.</i> (1999)
tetC/R	ATG GTC GTC ATC TAC CTG CC				
tetD/F	AAA CCA TTA CGG CAT TCT GC	<i>tetD</i>	55	787	Ng <i>et al.</i> (1999)
tetD/R	GAC CGG ATA CAC CAT CCA TC				
tetE/F	AAA CCA CAT CCT CCA TAC GC	<i>tetE</i>	55	278	Ng <i>et al.</i> (1999)
tetE/R	AAA TAG GCC ACA ACC GTC AG				
tetG/F	CAG CTT TCG GAT TCT TAC GG	<i>tetG</i>	55	468	Ng <i>et al.</i> (1999)
tetG/R	GAT TGG TGA GGC TCG TTA GC				
686	ACC AAT GCT TAA TCA GTG AG	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	55	964	Bergenholtz <i>et al.</i> (2009)
757	GCG GAA CCC CTA TTT G				
1354	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC	<i>bla</i> <sub>CTX-M all</sub>	60	554	Hasman <i>et al.</i> (2005)
1580	TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA AYS AGC GG				
1537	CCA TGG TTA AAA AAT CAC TGC G	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1 group</sub>	60	593	Bergenholtz <i>et al.</i> (2009)
1580	TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA AYS AGC GG				
blaSHV/F	CAC TCA AGG ATG TAT TGT G	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	55	702	Brinas <i>et al.</i> (2002)
blaSHV/R	TTA GCG TTG CCA GTG CTC G				
blaOXA2/F	TTC AAG CCA AAG GCA CGA TAG	<i>bla</i> <sub>OXA-2 like</sub>	55	885	Brinas <i>et al.</i> (2002)
blaOXA2/R	TCC GAG TTG ACT GCC GGG TTG				
blaOXA-1F	CCA AAG ACG TGG ATG	<i>bla</i> <sub>OXA-1/-30</sub>	55	831	EU339234
blaOXA-1R	GTT AAA TTC GAC CCC AAG TT				
cat/F	CCT GCC ACT CAT CGC AGT	<i>cat</i>	55	623	Guerra <i>et al.</i> (2001)
cat/R	CCA CCG TTG ATA TAT CCC				
cmlA/F	TGT CAT TTA CGG CAT ACT CG	<i>cmlA</i>	55	455	Saenz <i>et al.</i> (2004)
cmlA/R	ATC AGG CAT CCC ATT CCC AT				
floF/F	GCG ATA TTC ATT ACT TTG GC	<i>floR</i>	50	425	Faldynova <i>et al.</i> (2003)
floF/R	TAG GAT GAA GGT GAG GAA TG				
sul1/F	CTT CGA TGA GAG CCG GCG GC	<i>sul1</i>	68	417	Zhao <i>et al.</i> (2001)
sul1/R	GCA AGG CGG AAA CCC GCG CC				
sul2/F	AGG GGG CAG ATG TGA TCG AC	<i>sul2</i>	58	249	Faldynova <i>et al.</i> (2003)
sul2/R	GCA GAT GAT TTC GCC AAT TG				
sul3/F	GAG CAA GAT TTT TGG AAT CG	<i>sul3</i>	55	789	Perreten and Boerlin (2003)
sul3/R	CAT CTG CAG CTA ACC TAG GGC TTT GGA				
strA/F	CCT ATC GGT TGA TCA ATG TC	<i>strA</i>	58	250	Faldynova <i>et al.</i> (2003)
strA/R	GAA GAG TTT TAG GGT CCA CC				
intl1/F	CCT CCC GCA CGA TGA TC	<i>intl1</i>	55	280	Zhao <i>et al.</i> (2001)
intl1/R	TCC ACG CAT CGT CAG GC				
intl2/F	CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG T	<i>intl2</i>	55	788	Saenz <i>et al.</i> (2004)
intl2/R	GTA GCA AAC GAG TGA CGA AAT G				
5'CS	GGC ATC CAA GCA GCA AG	Class 1 integron	55	Variable	Levesque <i>et al.</i> (1995)
3'CS	AAG CAG ACT TGA CCT GA				
Hep74	CGGGATCCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA	Class 2 integron	55	Variable	White <i>et al.</i> (2001)
Hep51	GATGCCATCGCAAGTACGAG				
dhfr1/F	ACG GAT CCT GGC TGT TGG TTG GAC GC	<i>dhfr1</i>	55	254	Gibreel and Skold (1998)
dhfr1/R	CGG AAT TCA CCT TCC GGC TCG ATG TC				
dhfr12/F	ACT CGG AAT CAG TAC GCA	<i>dhfr12</i>	51	462	Guerra <i>et al.</i> (2001)
dhfr12/R	GTG TAC GGA ATT ACA GCT				
dhfr17/F	GAT TTC TGC AGT GTC AGA	<i>dhfr17</i>	50	384	Guerra <i>et al.</i> (2004)
dhfr17/R	CTC AGG CAT TAT AGG GAA				
aadA1/F	CGA CTC AAC TAT CAG AGG TA	<i>aadA1</i>	51	384	AY534545
aadA1/R	CTT TTG TCA GCA AGA TAG CC				
aadA2/F	CGG TGA CCA TCG AAA TTT CG	<i>aadA2</i>	55	249	Frana <i>et al.</i> (2001)

**Table 1** (Continued)

Primer	Primer sequence (5'–3')	Amplified gene	Anneling temp. (°C)	Amplicon size (bp)	Reference
aadA2/R	CTA TAG CGC GGA GCG TCT CGC	aadA5	55	217	EF571855
aadA5/F	CAC TGG ACA CAA TCC ACC TG				
aadA5/R	CCA AGG CAC TAC TTC GCT TC				
estX/F	CCCATGAACCCATTATCCTG	estX	55	227	DQ286459
estX/R	ATGAGCAGCTTCAGACCAT				
sat/F	CCGACCAAGGCTTTGAACATA	sat1/2	55	234	DQ286459
sat/R	TCGCAAATTCGATGAGACTG				

## Results

### Rodentia, Insectivora

In the suburban environment of the village of Kunin, 75 small terrestrial mammals were examined (*Mus musculus* – 4 specimens, *Apodemus agrarius* – 24, *Apodemus flavicollis* – 20, *Apodemus sylvaticus* – 2, *Microtus arvalis* – 6, *Microtus subterraneus* – 13, *Arvicola terrestris* – 1, *Sorex araneus* – 1, *Crociodura suaveolens* – 4). *Escherichia coli* was recovered from 43 animals. Resistance to antibiotics was recorded in only one isolate (1/43, 2%) from striped field mouse (*A. agrarius*). It was a multiresistant isolate with the phenotype ACSuSxtT and with resistance genes *bla*<sub>TEM</sub>, *cat*, *strA*, *sul1*, *sul2* and *tetB*. Also detected was the class 1 integron (2.0 kb) with gene cassette *dhfr12-orf-aadA2*. No isolates with ESBL production were found.

In the forest environment near the village of Vracov, 235 small terrestrial mammals were examined (*A. flavicollis* – 30 specimens, *A. sylvaticus* – 51, *A. microps* – 22, *Microtus arvalis* – 3, *Microtus subterraneus* – 11, *Clethrionomys glareolus* – 103, *Sorex araneus* – 12, *Sorex minutus* – 2, *Crociodura suaveolens* – 1). *Escherichia coli* was recovered from 199 animals. There were four resistant isolates (4/199, 2%). Three resistant isolates originated from bank voles (*Clethrionomys glareolus*): *E. coli* of the phenotype A (with the gene *bla*<sub>TEM</sub>), phenotype T (with the gene *tetA*) and phenotype Na. One resistant isolate was from *A. sylvaticus*: phenotype AT (with genes *bla*<sub>TEM</sub> and *tetB*). No isolates with ESBL production were found.

### Cervidae, Canidae, *Ursus arctos*

Sixty samples of faeces from Poloniny NP were examined (*Cervus elaphus* – 53, *Capreolus capreolus* – 2, *Vulpes vulpes* – 5). *Escherichia coli* was isolated from 42 samples. Five isolates were resistant (5/42, 12%). Four resistant *E. coli* isolates originated from *Cervus elaphus* with phenotype T (with *tetA* gene) and one isolate originated from *Vulpes vulpes* with phenotype T (with *tetB* gene). A total of 21 rectal swabs were collected from

*U. arctos*, and 16 *E. coli* isolates were recovered. In no *U. arctos* isolate was there recorded a resistance to the antimicrobials tested. No ESBL-producing isolates were found.

### *Sus scrofa*

A total of 293 rectal swabs were collected from *S. scrofa*, and 290 *E. coli* were recovered. Antibiotic resistance was recorded in 17 isolates (17/290, 6%) (Table 2).

Of the 293 rectal swabs, five *E. coli* strains (5/293, 2%) were isolated on the medium with cefotaxime. All five strains produced ESBL (they were positive in the double disk synergy test). In all cases, the strains were multi-resistant (with resistance to 3–8 antibiotics), and in two strains, class 2 integrons were found (Table 3). The genes

**Table 2** Overview of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolates from wild boars

Number of isolates	Phenotype of resistance*	Resistance genes, integrons†: gene cassettes
1	A	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
1	Na	
1	S	<i>strA</i>
1	S	<i>int2</i> , <i>estX-sat-aadA1</i>
1	S	<i>int2</i> , I2: 1.5 kb: <i>sat-aadA1</i>
2	T	<i>tetA</i>
3	T	<i>tetB</i>
1	AST	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA</i> , <i>tetB</i>
1	NaSuSxt	<i>sul1</i> , <i>int1</i> , I1: 1.7 kb: <i>dhfr17-aadA5</i>
1	SSuT	<i>strA</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>
2	SSuT	<i>strA</i> , <i>sul2</i> , <i>tetB</i>
1	ASSuSxtT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tetA</i> , <i>strA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>int1</i> , I1: 1.5 kb: <i>dhfr1-aadA1</i>
1	AACSSxtT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA</i> , <i>tetA</i> , <i>int2</i> , I2: 2.0 kb: <i>dhfr1-sat-aadA1</i>

\*A, ampicillin; Ac, amoxicillin–clavulanic acid; Na, nalidixic acid; S, streptomycin; Su, sulfonamides cp.; Sxt, trimethoprim–sulfamethoxazole; T, tetracycline.

†I1, class 1 integron; I2, class 2 integron.



**Table 3** Phenotypic and genotypic characteristics of ESBL-positive *Escherichia coli* strains from wild boars

Isolate	Nonbeta-lactam antibiotic resistance phenotype*	Other antibiotic resistance genes and integrons†	Phylogenetic group‡	Plasmid type (EcoRV)	<i>bla</i> gene on plasmid	Incompatibility group	Plasmid size (approximate kb)	Conjugation to	
								<i>bla</i> genes	<i>bla</i> genes
85DI/B	SSuT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	A	A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	Incl1	90	+	+
137DI/B	SSu	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	A	A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	Incl1	90	+	+
67DI/B	SSpeSuT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	A	A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	Incl1	90	+	+
118DI/B	SSpeSuT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	A	A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	Incl1	90	+	+
172DI/B	T	<i>bla</i> <sub>TEM-52b</sub>	A	B	<i>bla</i> <sub>TEM-52b</sub>	NT§	45	+	-

ESBL, extended-spectrum beta-lactamase.

\*S, streptomycin; Spe, spectinomycin; Su, sulfonamides cp.; T, tetracycline.

†I2, class 2 integron.

‡The phylogenetic groups were determined by PCR for *chuA* and *yjaA* genes and DNA fragment TSPE4.C2 according to Clermont *et al.* (2000).

§NT, incompatibility group not specified by the primers used in the study.

*bla*<sub>CTX-M-1</sub> (three strains), *bla*<sub>TEM-52b</sub> (one strain) and the combination of *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *bla*<sub>TEM-1</sub> (one strain) were found by PCR and sequencing. PFGE analysis of all five wild type isolates showed that each isolate produced a distinct pulse-type. All the isolates belonged to phylogenetic group A. The plasmids with *bla*<sub>CTX-M-1</sub> were transferred by conjugation to the *E. coli* MT102RN and *Salm.* Typhimurium SL5325, while the plasmid with *bla*<sub>TEM-52b</sub> was transferred only to *E. coli*. The *sul2* gene transferred together with *bla*<sub>CTX-M-1</sub> genes by conjugation as well as transformation in all the strains, thus showing the presence of this gene on the same plasmid encoding *bla*<sub>CTX-M-1</sub>. All four plasmids encoding *bla*<sub>CTX-M-1</sub> had identical EcoRV RFLP profile designated A. They belonged to the Incl group and had a size of approx. 90 kb. The *bla*<sub>TEM-52b</sub>-harbouring plasmid had a distinct RFLP profile (B), and the size of the plasmid was approx. 45 kb. In this plasmid, however, it was not possible to specify the Inc group by the method used.

## Discussion

The low prevalence (2%) of resistant *E. coli* isolates in the populations of small terrestrial mammals at two sites in Czech Republic was probably caused by an exceptional contact between the hosts and resistant *E. coli* strains produced by either humans or domestic animals that were capable of colonizing new hosts or at least of enabling the horizontal transfer of genetic determinants of antibiotic resistance to the *E. coli* strains that colonize small terrestrial mammals.

By examination of small terrestrial mammals originated from two pig farms in the Czech Republic, we found

much higher prevalences of resistant *E. coli* in these mammals (11% and 54%, respectively) depending probably on the high prevalences of resistant *E. coli* isolates in pigs reared and treated with antibiotics in those farms (Literak *et al.* 2009). Recently, it was also suggested that *E. coli* isolates from wild small terrestrial mammals living on swine farms in Canada have higher rates of resistance and are more frequently multiresistant than *E. coli* isolates from environments, such as natural areas, that are less impacted by human and agricultural activities (Kozak *et al.* 2009).

Exceptional, yet still most frequent, was the resistance to tetracycline in *E. coli* from Czech small terrestrial mammals. Resistance to tetracycline had been frequent (unlike other antibiotics tested) also in *E. coli* isolates from bank voles examined in Poland (Swiecicka *et al.* 2003). A study of antibiotic resistance in *E. coli* from rats in Indonesia has suggested that tetracycline-resistant *E. coli* has become established in rats in West Java, whereas rats on the nearby uninhabited Krakatau Islands do not contain these bacteria (Graves *et al.* 1988). It was concluded that excessive or uncontrolled use of antibiotics by human population in areas where faecal contamination of the environment is inevitable leads to changes in the enteric flora of wild mammals living in these areas. We concur with that conclusion. Role of environmental bacteria as natural resistance reservoirs and possible source of genetic elements (Chopra and Roberts, 2001) could be another explanation for the frequent occurrence of tetracycline resistance in *E. coli* from wild mammals.

One *E. coli* strain isolated from the striped field mouse showed a multiresistant pattern. It is an exceptional finding in our study of small terrestrial mammals. However,



the colonization of other small terrestrial mammals – 13-lined ground squirrels (*Spermophilus tridecemlineatus*) – by multiresistant isolates of other Gram-negative members of the  $\gamma$ -proteobacteria group was recorded in the USA (Cloud-Hansen *et al.* 2007).

In free-living ruminants, e.g. the Japanese serow (*Capricornis crispus*), the prevalence of resistant *E. coli* isolates was markedly lower compared to individuals of the same species in captivity (Kinjo *et al.* 1992). At Poloniny NP in Slovakia, the prevalence of resistant *E. coli* isolates from wild mammals, particularly ruminants but also the red fox, was 12%. This finding suggests the existence of important sources of colonization by resistant *E. coli* isolates in Poloniny NP. Meadows that are a food source for wild ruminants in the NP are also used for grazing of cattle. Cattle, especially calves, could be the source of resistant isolates (Dolejska *et al.* 2008). Foxes searching for food in the immediate vicinity of human habitations, and particularly in winter, can easily become infected with food contaminated by resistant isolates of human origin, or domestic animals could be the source. At villages within Poloniny NP, resistant *E. coli* isolates were found also in domestic dogs (data not shown). Both in wild ruminants and foxes from Poloniny NP, only monoresistant isolates with resistance to tetracycline were recorded, and we have not found the presence of ESBL in *E. coli* isolates. The occurrence of ESBL-producing *E. coli* from two deer (*bla*<sub>TEM-52</sub>) and one fox (*bla*<sub>CTX-M-14</sub> + *bla*<sub>TEM-1</sub>) has recently been recorded in Portuguese NPs (Costa *et al.* 2006) suggesting the spreading of such strains also into the wildlife of NPs.

Antibiotic-resistant *E. coli* isolates were found among wild ruminants in the Stelvio NP, Italy (Caprioli *et al.* 1991). In Norway, antibiotic resistance was also found in *E. coli* isolates from wild cervids, and most of the resistant isolates were resistant to one type of antibiotics only (Lillehaug *et al.* 2005). Our results from Poloniny NP were similar. On the other hand, *E. coli* isolates from wild cervids and bank voles from remote areas of Finland were almost free of antimicrobial resistance (Osterblad *et al.* 2001), and thus it was suggested that the widespread resistance found in *E. coli* populations must be caused by human activities.

Class 1 and 2 integrons are genetic elements that play an important role in the development of antibiotic resistance. They have a worldwide distribution and are described from Gram-negative bacteria colonizing both humans and animals (Sunde 2005). Integrons so far characterized have originated mostly from bacteria isolated from environments where antibiotics are heavily used (Sunde 2005). Recently, a class 1 integron was found in *E. coli* isolated from wild reindeer (*Rangifer tarandus*) in a remote mountain area in Norway (Sunde 2005). In the

present study, we have recorded class 1 and 2 integrons in striped field mouse and wild boars. In our other studies, we have recorded the occurrence of *E. coli* isolates with class 1 and 2 integrons in both domestic and wild animals as well as in surface waters in the Czech Republic (Dolejska *et al.* 2007, 2008, 2009; Literak *et al.* 2007). Class 1 integrons with the same gene cassettes as in wild boars were found in cattle, in black-headed gulls and in water from the pond where these gulls lived. Class 2 integrons with the same gene cassettes as in wild boars were also recorded in black-headed gulls. It seems that *E. coli* isolates possessing integrons with various gene cassettes are emerging more and more frequently in synanthropic wild animal populations, although these animals are not directly influenced by antibiotics.

The occurrence of multiresistant *E. coli* isolates from wild boars with ESBL-producing genes is a novelty in Europe. In central Europe, the wild boar is a common and widespread large mammal that lives in forest, field and suburban habitats and is intensively hunted in many countries (Herre 1986). Wild boars are omnivores and can visit communal refuse sites as well as the proximity of animal farms and consume animal waste containing resistant *E. coli* strains. We assume that the presence of multiresistant *E. coli* isolates with ESBL in wild boars is caused by these sources. Bacterial resistance to multiple antibiotics was recently documented in bacteria, including *E. coli*, colonizing the avian scavengers Egyptian vultures (*Neophron percnopterus*) in Spain (Blanco *et al.* 2007). The prevalence of antibiotic-resistant vulture bacteria was higher in areas where vultures consumed the highest proportion of carrion from stabled livestock, especially fattening pigs and poultry.

Most of the ESBL isolates from wild boars contained the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene. CTX-M-1 is one of most prevalent ESBLs in Europe. It has been frequently detected in humans (Novais *et al.* 2007) as well as in food-producing animals (Meunier *et al.* 2006). ESBL-producing *E. coli* with *bla*<sub>CTX-M-1</sub> has also been recently detected in wild birds (Poeta *et al.* 2008; Dolejska *et al.* 2009). The *bla*<sub>CTX-M-1</sub> in all the isolates was carried on large 90 -kb plasmids. This plasmid also carried the sulfonamide-resistance gene *sul2*. This plasmid seems to be of relatively broad host range because of conjugation to the *Salmonella* recipient. All the plasmids had the same RFLP profile and belonged to the incompatibility group Inc11. This type of plasmid has recently been associated with *bla*<sub>CTX-M-1</sub> in poultry in France (Girlich *et al.* 2007) and Denmark (data not published). It provides evidence that the ESBL-producing *E. coli* selected for in humans and food-producing animals are colonizing wild animals, which can thus become reservoirs and possible vectors of these strains into the environment.

The gene *bla*<sub>TEM-52b</sub> was found in one *E. coli* isolate from a wild boar. TEM-52 has been seen in nontyphoid *Salmonella* of human origin, and *Salmonella* seems to be the preferred reservoir for this ESBL type (Yates *et al.* 2004; Hasman *et al.* 2005). The gene *bla*<sub>TEM-52</sub> has also been documented in *E. coli* from pets (Costa *et al.* 2004), food-producing animals (Brinas *et al.* 2005) and recently also in wild birds and game in Portugal (Costa *et al.* 2008; Poeta *et al.* 2008).

In central Europe, we can observe a widespread occurrence of antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from wildlife. We suppose similarly as do Skurnik *et al.* (2006) that antimicrobial resistance found in *E. coli* from wild mammals is anthropogenic. Among wild mammals, the wild boar plays an important role in the circulation of resistant *E. coli* isolates including isolates with integrons and ESBL production. The wild boar can be considered an important reservoir and vector of these strains in the environment.

## Acknowledgements

We are grateful to K. Dibdakova, L. Hanusova, N. Horakova, L. Chudobova, F. Kupka, T. Najer, J. Mikulska, S. Ondrus, P. Slamova, M. Slavikova and E. Suchanova for their assistance in the field and/or in the laboratory. This study was funded by Grant No. MSM6215712402 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic. Capture, euthanasia and examination of small terrestrial mammals were approved by the Ethical Commission of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

## References

- Bergenholtz, R.D., Jorgensen, M.S., Hansen, L.H., Jensen, L.B. and Hasman, H. (2009) Characterization of genetic determinants of extended-spectrum cephalosporinases (ESCs) in *Escherichia coli* isolates from Danish and imported poultry meat. *J Antimicrob Chemother* **64**, 207–209.
- Blanco, G., Lemus, J.A., Grande, J., Gangoso, L., Grande, J.M., Donazar, J.A., Arroyo, B., Frias, O. *et al.* (2007) Geographical variation in cloacal microflora and bacterial antibiotic resistance in a threatened avian scavenger in relation to diet and livestock farming practices. *Environ Microbiol* **9**, 1738–1749.
- Brinas, L., Zarazaga, M., Saenz, Y., Ruiz-Larrea, F. and Torres, C. (2002)  $\beta$ -lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 3156–3160.
- Brinas, L., Moreno, M.A. and Teshager, T. (2005) Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1262–1264.
- Caprioli, A., Donelli, G., Falbo, V., Passi, C., Pagano, A. and Mantovani, A. (1991) Antimicrobial resistance and production of toxins in *Escherichia coli* strains from wild ruminants and the alpine marmot. *J Wildl Dis* **27**, 324–327.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L. and Threlfall, E.J. (2005) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* **63**, 219–228.
- Caroff, N., Espaze, E., Berard, I., Richet, H. and Reynaud, A. (1999) Mutations in the ampC promoter of *Escherichia coli* isolates resistant to oxyiminocephalosporins without extended spectrum beta-lactamase production. *FEMS Microbiol Lett* **173**, 459–465.
- Center for Disease Control and Prevention (2004) *Standardized Molecular Subtyping of Foodborne Bacterial Pathogens by Pulsed-Field Gel Electrophoresis*. Atlanta, GA: The National Molecular Network for Foodborne Disease Surveillance CDCP.
- Chopra, I. and Roberts, M. (2001) Tetracyclin antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**, 232–260.
- Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E. (2000) Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4555–4558.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008a) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 8th Informational Supplement*. Wayne, PA: CLSI.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008b) *Performance Standards for Antimicrobial Disc and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard 3rd Edition*. Wayne, PA: CLSI.
- Cloud-Hansen, K.A., Villiard, K.M., Handelsman, J. and Carey, H.V. (2007) Thirteen-lined ground squirrels (*Spermophilus tridecemlineatus*) harbor multiantibiotic-resistant bacteria. *J Am Assoc Lab Anim Sci* **46**, 17–20.
- Costa, D., Poeta, P., Brinas, L., Saenz, Y., Rodrigues, J. and Torres, C. (2004) Detection of CTX-M-1 and TEM-52 beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. *J Antimicrob Chemother* **54**, 960–961.
- Costa, D., Poeta, P., Saenz, Y., Vinue, L., Rojo-Bezares, B., Jouini, A., Zarazaga, M., Rodrigues, J. *et al.* (2006) Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J Antimicrob Chemother* **58**, 1311–1312.
- Costa, D., Poeta, P., Saenz, Y., Vinue, L., Coelho, A.C., Matos, M., Rojo-Bezares, B., Rodrigues, J. *et al.* (2008) Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* recovered from wild animals. *Microb Drug Resist* **14**, 71–77.
- Dolejska, M., Cizek, A. and Literak, I. (2007) High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in

- Escherichia coli* isolates from black-headed gulls in the Czech Republic. *J Appl Microbiol* **103**, 11–19.
- Dolejska, M., Senk, D., Cizek, A., Rybarikova, J., Sychra, O. and Literak, I. (2008) Antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates in cattle and house sparrows on two Czech dairy farms. *Res Vet Sci* **85**, 491–494.
- Dolejska, M., Biersosova, B., Kohoutova, L., Literak, I. and Cizek, A. (2009) Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. *J Appl Microbiol*, **106**, 1941–1950.
- Faldynova, M., Pravcova, M., Sisak, F., Havlickova, H., Kolackova, I., Cizek, A., Karpiskova, R. and Rychlik, I. (2003) Evolution of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains isolated in Czech Republic between 1984 and 2002. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 2002–2005.
- Frana, T.S., Carlson, S.A. and Griffith, R.W. (2001) Relative and conservation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104. *Appl Environ Microbiol* **67**, 445–448.
- Gibreel, A. and Skold, O. (1998) High-level resistance to trimethoprim in clinical isolates of *Campylobacter jejuni* by acquisition of foreign genes (*dfr1* and *dfr9*) expressing drug-intensive dihydrofolate reductases. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 3059–3064.
- Gilliver, M.A., Bennett, M., Begon, M., Hazel, S.M. and Hart, C.A. (1999) Antibiotic resistance found in wild rodents. *Nature* **401**, 233–234.
- Girlich, D., Poirel, L., Carattoli, A., Kempf, I., Lartigue, M.F., Bertini, A. and Nordmann, P. (2007) Extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. *Appl Environ Microbiol* **73**, 4681–4685.
- Graves, S.R., Kennely-Meritt, S.A., Tidemann, C.R., Rawlinson, P.A., Harvey, K.J. and Thornton, I.W.B. (1988) Antibiotic resistance patterns of enteric bacteria of wild mammals on the Krakatau Islands and West Java, Indonesia. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **322**, 339–353.
- Guerra, B., Soto, S.M., Arguelles, J.M. and Mendoza, M.C. (2001) Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i-]. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1305–1308.
- Guerra, B., Junker, E., Miko, A., Helmuth, R. and Mendoza, M.C. (2004) Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Microb Drug Resist* **10**, 83–91.
- Hasman, H., Mevius, D., Veldman, K., Olesen, I. and Aarestrup, F.M. (2005) Beta-lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother* **56**, 115–121.
- Herre, W. (1986) *Sus scrofa* – Wildschwein. In *Handbuch der Säugetiere Europas. Band2/II Paarhufer – Artiodactyla (Suidae, Cervidae, Bovidae)* ed. Niethammer, J. and Krapp, F. pp. 36–66. Wiesbaden, Germany: AULA-Verlag.
- Kinjo, T., Minamoto, N., Sugiyama, M. and Sugiyama, Y. (1992) Comparison of antimicrobial resistant *Escherichia coli* in wild and captive Japanese serows. *J Vet Med Sci* **54**, 821–827.
- Kozak, G.K., Boerlin, P., Janecko, N., Reid-Smith, R.J. and Jardine, C. (2009) Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Appl Environ Microbiol* **75**, 559–566.
- Levesque, C., Piche, L., Larose, C.L. and Roy, P.H. (1995) PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* **29**, 185–191.
- Lillehaug, A., Bergsjø, B., Schau, J., Bruheim, T., Vikoren, T. and Handeland, K. (2005) *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., verocytogenic *Escherichia coli*, and antibiotic resistance in indicator organisms in wild cervids. *Acta Vet Scand* **46**, 23–32.
- Literak, I., Vanko, R., Dolejska, M., Cizek, A. and Karpiskova, R. (2007) Antibiotic resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* in Russian rooks (*Corvus frugilegus*) wintering in the Czech Republic. *Lett Appl Microbiol* **45**, 616–625.
- Literak, I., Dolejska, M., Rybarikova, J., Cizek, A., Strejckova, P., Vyskocilova, M., Friedman, M. and Klimes, J. (2009) Highly variable patterns of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolates from pigs, rodents and flies. *Microb Drug Resist* **15**, 229–234.
- Livermore, D.M., Warner, M., Hall, L.M.C., Enne, V.I., Projan, S.J., Dunman, P.M., Wooster, S.L. and Harrison, G. (2001) Antibiotic resistance in bacteria from magpies (*Pica pica*) and rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from west Wales. *Environ Microbiol* **3**, 658–661.
- Meunier, D., Jouy, E., Lazizzera, C., Kobisch, M. and Madec, J.Y. (2006) CTX-M-1 and CTX-M-15-type beta-lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France. *Int J Antimicrob Agents* **28**, 402–407.
- Ng, L.K., Mulvey, M.R., Martin, I., Peters, G.A. and Johnson, W. (1999) Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 3018–3021.
- Novais, A., Canton, R., Moreira, R., Peixe, L., Baquero, F. and Coque, T.M. (2007) Emergence and dissemination of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 796–799.
- Olesen, I., Hasman, H. and Aarestrup, F.M. (2004) Prevalence of beta-lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia*

- coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microb Drug Resist* **10**, 334–340.
- Osterblad, M., Norrdahl, K., Korpimäki, E. and Huovinen, P. (2001) Antibiotic resistance. How wild are wild mammals? *Nature* **409**, 37–38.
- Perreten, V. and Boerlin, P. (2003) A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in pig population of Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1169–1172.
- Poeta, P., Radhouani, H., Igrejas, G., Goncalves, A., Carvalho, C., Rodrigues, J., Vinue, L., Somalo, S. et al. (2008) Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta-lactamases. *Appl Environ Microbiol* **74**, 7439–7441.
- Rolland, R.M., Hausfater, G., Marshall, B. and Levy, S.B. (1985) Antibiotic resistant bacteria in wild primates: increased prevalence in baboons feeding on human refuse. *Appl Environ Microbiol* **49**, 791–794.
- Routman, E., Miller, R.D., Phillips-Conroy, J. and Hartl, D.L. (1985) Antibiotic resistance and population structure in *Escherichia coli* from free-ranging African yellow baboons. *Appl Environ Microbiol* **50**, 749–754.
- Saenz, Y., Brinas, L., Dominguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J. and Torres, C. (2004) Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origin. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3996–4001.
- Schierack, P., Romer, A., Jores, J., Kaspar, H., Guenther, S., Filter, M., Eichberg, J. and Wieler, L.H. (2009) Isolation and characterization of intestinal *Escherichia coli* clones from wild boars in Germany. *Appl Environ Microbiol* **75**, 695–702.
- Sherley, M., Gordon, D.M. and Collignon, P.J. (2000) Variations in antibiotic resistance profile in Enterobacteriaceae isolated from wild Australian mammals. *Environ Microbiol* **2**, 620–631.
- Skurnik, D., Ruimy, R., Andreumont, A., Amorin, C., Rouquet, P., Picard, B. and Denamur, E. (2006) Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **57**, 1215–1219.
- Sunde, M. (2005) Class I integron with a group II intron detected in an *Escherichia coli* strain from a free-range reindeer. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2512–2514.
- Swiecicka, I., Buczek, J. and Iwaniuk, A. (2003) Analysis of genetic relationships and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from *Clethrionomys glareolus*. *J Gen Appl Microbiol* **49**, 315–320.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. and Swaminathan, B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**, 2233–2239.
- Thomson, K.S. and Sanders, C.C. (1992) Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 1877–1882.
- White, D.G. (2006) Antimicrobial resistance in pathogenic *Escherichia coli* from animals. In *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin* ed. Aarestrup, F.M. pp. 145–166. Washington, DC: ASM Press.
- White, P.A., McIver, C.J. and Rawlinson, W.D. (2001) Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 2658–2661.
- Wu, S., Chouliara, E., Hasman, H., Dalsgaard, A., Vieira, A. and Jensen, L.B. (2008) Detection of a single isolate of CTX-M-1-producing *Escherichia coli* from healthy pigs in Denmark. *J Antimicrob Chemother* **61**, 747–749.
- Yates, C.M., Brown, D.J., Edwards, G.F. and Amyes, S.G. (2004) Detection of TEM-52 in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated in Scotland. *J Antimicrob Chemother* **53**, 407–408.
- Zhao, S., White, D.G., Ge, B., Ayers, S., Friedman, S., English, L., Wagner, D., Gainers, S. et al. (2001) Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1558–1564.

## Příloha 4

LITERAK, I., DOLEJSKA, M., JANOSZOWSKA, D., HRUSAKOVA, J., WLODZIMIERZ, M., RZYSKA, H., BZOMA, S., CIZEK, A. (2010) Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea coast of Poland: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, p. 8126-8134.

### Souhrn

---

V této studii byly různé druhy vodních ptáků z pobřeží Baltského moře v Polsku vyšetřeny na přítomnost *E. coli* s produkcí ESBL a plazmidově determinovanou rezistencí k fluorochinolonům. Byly izolovány *E. coli* s geny *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> nebo *bla*<sub>SHV-12</sub>, které byly nesený epidemickými IncI1 nebo IncN plazmidy. Snížená citlivost k fluorochinolonům byla spojena s genem *qnrS1* vázaným na IncX1, IncX2 nebo IncN plazmidy. Studie poukazuje na šíření bakterií s klinicky významnými mechanismy plazmidově kódované rezistence k volně žijícím vodním ptákům.





## Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Bacteria, Including Strains with Genes Encoding the Extended-Spectrum Beta-Lactamase and QnrS, in Waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland<sup>∇</sup>

Ivan Literak,<sup>1\*</sup> Monika Dolejska,<sup>1</sup> Dagmar Janoszowska,<sup>1</sup> Jolana Hrusakova,<sup>1</sup> Włodzimierz Meissner,<sup>2</sup> Hanna Rzycka,<sup>2</sup> Szymon Bzoma,<sup>3</sup> and Alois Cizek<sup>4</sup>

Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic<sup>1</sup>; Avian Ecophysiology Unit, Department of Vertebrate Ecology and Zoology, Gdansk University, Al. Legionow 9, 80 441 Gdansk, Poland<sup>2</sup>; Department of Fishery Resources, Sea Fisheries Institute, Kollataja 1, 81 332 Gdynia, Poland<sup>3</sup>; and Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic<sup>4</sup>

Received 17 June 2010/Accepted 11 October 2010

Individual cloacal swabs of mallards (*Anas platyrhynchos*) and of herring gulls (*Larus argentatus*), as well as samples of waterbird feces obtained in 2008 and 2009, were cultivated for *Escherichia coli*. Isolates of *E. coli* were tested for susceptibilities to 12 antimicrobial agents by the disk diffusion method. Moreover, the samples were subcultivated on MacConkey agar (MCA) containing cefotaxime (2 mg liter<sup>-1</sup>) to detect *E. coli* with extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and subsequently on MCA supplemented with ciprofloxacin (0.05 mg liter<sup>-1</sup>) and MCA with nalidixic acid (20 mg liter<sup>-1</sup>) to isolate fluoroquinolone-resistant *E. coli*. PCR was used to detect specific antibiotic resistance genes. We found 9 *E. coli* isolates producing ESBL with *bla* genes: *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (6 isolates), *bla*<sub>CTX-M-9</sub> plus *bla*<sub>TEM-1b</sub> (1 isolate), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> plus *bla*<sub>OXA-1</sub> (1 isolate), and *bla*<sub>SHV-12</sub> (1 isolate). In the isolate with *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, the gene *aac(6)-Ib-cr* was also detected. The *bla* genes were harbored by transferable plasmids of the IncN and IncII groups. Nine quinolone-resistant *E. coli* isolates with *qnrS* genes were found and characterized. The gene *qnrS* was associated with a Tn3-like transposon on the IncX1 plasmid together with *bla*<sub>TEM-1</sub> in two isolates. The gene *qnrS* was also harbored by conjugative plasmids of the IncN and IncX2 groups. Even if populations of wild birds are not directly influenced by antibiotic practice, we have demonstrated that antibiotic-resistant *E. coli* strains, including strains with various ESBL and *qnrS* genes, are found in the feces of wild birds on the coast of the Baltic Sea in Poland.

There is considerable concern about antibiotic resistance in bacteria from humans and farm animals, but the spread of resistance into wider ecosystems has received much less attention (48). Usually, isolates of the common intestinal bacterium *Escherichia coli* are examined to detect antibiotic resistance in populations of wild animals. Wild birds are colonized with various strains of *E. coli*, including strains such as *E. coli* O157 that are pathogenic for humans (83). Fecal strains of *E. coli* resistant to antibiotics have been found at various prevalences in wild bird populations. In particular, bird populations sympatric to areas inhabited by people and areas with a high density of livestock were colonized with antibiotic-resistant *E. coli* strains possibly selected by the antibiotic practice in humans and domestic animals. Antibiotic-resistant *E. coli* isolates have been found in corvids (*Corvus corone*, *C. frugilegus*, *C. macrorhynchos*, *Pica pica*, and *Pyrrhocorax pyrrhocorax*) (3, 46, 48, 53, 74), house sparrows (*Passer domesticus*) (22, 61), house martins (*Delichon urbica*) (73), feral pigeons (*Columba livia*

forma domestica) (68), ducks, geese, and swans (*Anas platyrhynchos*, *Anas acuta*, *Branta canadensis*, and *Cygnus columbianus*) (17, 26, 51, 82), cormorants (*Phalacrocorax auritus* and *P. cristatus*) (20, 71), Egyptian vultures (*Neophron percnopterus*) (2), and, most frequently, in various gull species throughout the world (*Larus argentatus*, *L. atricilla*, *L. audouinii*, *L. cachinans*, *L. crassirostris*, *L. glaucooides*, *L. hyperboreus*, *L. marinus*, *L. ridibundus*, and *L. vagae*) (4, 7, 21, 23, 29, 66, 71, 76, 82). Corvids and gulls feeding on garbage dumps and in urbanized areas are frequently colonized with resistant strains of *E. coli*, and they are considered to be important reservoirs and vectors of these isolates in the environment (23, 46).

The occurrence of antibiotic resistance in *E. coli* from surface water and fecal pollution sources (wastewater treatment plants and bird feces) was studied in the inland Hamilton Harbor on Lake Ontario, Canada (24). Authors of the study suggested that at times, feces of wild geese, ducks, and gulls may be a more prominent contributor of resistant *E. coli* to a beach near Hamilton than are municipal wastewater sources.

Thousands of great cormorants (*Phalacrocorax carbo*), gulls (*Larus argentatus*, *L. ridibundus*, *L. canus*, and *L. marinus*) and mallards (*Anas platyrhynchos*) winter in Puck Bay on the Polish coast of the Baltic Sea (50). Many of them stay near the two biggest cities of this region, Gdynia and Gdansk, in harbors,

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic. Phone: 420 541 562 630. Fax: 420 541 562 631. E-mail: literaki@vfu.cz.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 15 October 2010.

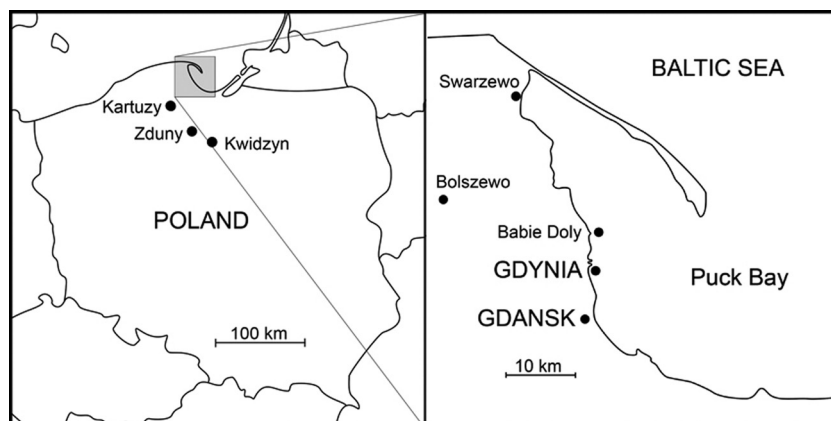


FIG. 1. Map of the Polish coast of the Baltic Sea, where the samples were collected. Mallards (*Anas platyrhynchos*) originated at Gdansk, Bolszewo, Kwidzyn, Zduny, and Kartuzy, herring gulls (*Larus argentatus*) from Gdynia, and samples of waterbird feces from Gdynia, Babie Doly, and Swarzewo.

municipal beaches, build-up areas, and city parks situated near the seacoast. We were concerned about antimicrobial-resistant *E. coli*, including strains producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and carrying class 1 and 2 integrons with resistant gene cassettes in these birds. Resistant *E. coli* isolates producing ESBL have been found in black-headed gulls (*L. ridibundus*) in the Czech Republic, yellow-legged gulls (*Larus michahellis*) in France, and seagulls of diverse species (not determined) in Portugal (4, 23, 66). Resistant isolates carrying class 1 and 2 integrons have been found in Canada geese (*Branta canadensis*) in the United States, black-headed gulls and rooks (*Corvus frugilegus*) in the Czech Republic, Mediterranean herring gulls (*Larus cachinans*) in Italy, and seagulls in Portugal (4, 17, 21, 23, 29, 46, 66). We also were concerned about strains resistant to fluoroquinolones, since such strains have emerged recently in gulls (*L. audouinii*, *L. cachinans*, *L. glaucooides*/*L. hyperboreus*, and *L. ridibundus*) in Italy, Portugal, Greenland, and the Czech Republic (7, 23, 29, 76).

#### MATERIALS AND METHODS

**Locations, birds, and feces samples.** The samples were collected on the Polish coast of the Baltic Sea within or near Gdynia and Gdansk (Fig. 1). Mallards (*Anas platyrhynchos*) were caught in the city parks of Gdansk ( $n = 46$ ) and also in Bolszewo ( $n = 32$ ), Kwidzyn ( $n = 5$ ), Zduny ( $n = 2$ ), and Kartuzy ( $n = 1$ ) during winter 2008/2009 and in November and December 2009. The latter four places are located in a region of lakes around Gdansk within a distance of up to 50 km from that city. Cloacal smears were obtained from 86 mallards in total. Herring gulls (*Larus argentatus*) were caught in Gdynia during winter 2008/2009 (adults) and during the nesting period (pulli) in 2009. Cloacal smears were obtained from 27 herring gulls. There is a large wave breaker within Gdynia's harbor that has no connection with the coast. On the shore at a distance of about 6 km from the harbor, there is also an old and abandoned army building standing on water near (300 m) a coast, near one of the Gdynia districts called Babie Doly. Especially inasmuch as public entry is prohibited to both of these, they are frequently used by waterbirds (gulls, cormorants, and sometimes also ducks) for resting, and many of their feces occur there. We collected samples of bird feces from both of these structures in January 2009. We obtained in total 244 samples (119 and 125 from the wave breaker and army building, respectively). A large roosting place for wintering great cormorants lies along the coast in Swarzewo, about 30 km from Gdynia. Here we collected 125 samples of cormorant feces in January 2009. Cormorants were daily moving from this roosting place to various places near the seacoast, including the sea close to Gdynia and Gdansk.

**Nonselective antibiotic-resistant *E. coli* isolation and characterization.** Individual cloacal swabs and samples of feces were transported to the laboratory and placed overnight in buffered peptone water (BPW) at 37°C and then cultivated

for *E. coli* on selective chromogenic medium for *E. coli* and coliform bacteria (CM0956; Oxoid, United Kingdom). One colony of each plate was tested for susceptibilities to antimicrobial agents by the disk diffusion method in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (16). Susceptibilities to the following antibacterial substances were tested: amoxicillin-clavulanic acid (30 µg), ampicillin (10 µg), cephalothin (30 µg), ceftazidime (30 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), nalidixic acid (30 µg), streptomycin (10 µg), sulfamethoxazole-trimethoprim (25 µg), sulfonamide compounds (300 µg), and tetracycline (30 µg) (Oxoid). In *E. coli* isolates found to be resistant to one or more of the antibiotics listed above, PCR was used to detect specific antibiotic resistance genes, integrase genes *int1* and *int2*, and gene cassettes within class 1 and 2 integrons (47). The presence of the genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OXA-1</sub>* like, *cat*, *cmlA*, *flor*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *strA*, *int1*, *int2*, variable regions of class 1 and class 2 integrons, *dhfr1*, *dhfr12*, *dhfr17*, *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *estX*, and *sat1* and *sat2* were tested with primers and under conditions as described elsewhere (47). All resistant *E. coli* strains were identified by the API 10S test (bioMérieux, France).

**Selective isolation of ESBL and quinolone-resistant isolates.** All samples from BPW were subsequently enriched in MacConkey broth and subcultivated on MacConkey agar (MCA) containing cefotaxime (2 mg liter<sup>-1</sup>) to detect *E. coli* strains with ESBL (84) and subsequently on MCA supplemented with ciprofloxacin (0.05 mg liter<sup>-1</sup>) to isolate fluoroquinolone-resistant *E. coli*. Samples of waterbird feces from BPW were enriched in MacConkey broth and also subcultivated on MCA containing nalidixic acid (20 mg liter<sup>-1</sup>) to detect *E. coli* strains resistant to nalidixic acid and possibly other quinolones.

**PCR for ESBL/quinolone resistance genes.** The colonies grown on MCA with cefotaxime were examined using the double-disk synergy test (DDST) for the production of ESBL (16, 80). The genes responsible for the ESBL phenotype (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, and *bla<sub>CTX-M</sub>*) were identified by PCR as described elsewhere (5, 45, 64). All the PCR products were further analyzed using sequencing (ABI 310 genetic analyzer; Applied Biosystems). The colonies grown on MCA with ciprofloxacin or nalidixic acid were tested for the plasmid-encoded quinolone resistance genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA*, and *aac(6')-Ib* by PCR as described elsewhere (9, 11, 25, 41, 57, 63, 70, 78, 85), and MICs for nalidixic acid and ciprofloxacin were determined by the agar dilution method in accordance with Clinical and Laboratory Standards Institute standards (16). In all the isolates positive for plasmid-harbored quinolone resistance genes with high MIC levels for nalidixic acid and ciprofloxacin, the *gyrA* and *parC* genes were detected by PCR and analyzed by sequencing. All isolates resistant to ampicillin and/or amoxicillin-clavulanic acid, as determined during nonselective isolations, were tested also by DDST for the production of ESBL. All isolates resistant to nalidixic acid and/or ciprofloxacin, as determined during nonselective isolation, were also tested for the presence of the *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA*, and *aac(6')-Ib* genes.

**Molecular characterization of ESBL/quinolone-resistant isolates.** Antimicrobial susceptibilities of the ESBL-positive and quinolone-resistant *E. coli* isolates were examined by the disk diffusion method, and the isolates were tested for additional antibiotic resistance genes (see above). Identification of *E. coli* phylogenetic groups and determination of the presence of the *cib* gene for



TABLE 1. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* obtained by nonselective isolation and numbers of strains with some resistance patterns from mallards, herring gulls, and waterbird feces

Antibiotic resistance phenotype <sup>a</sup>	Antibiotic resistance gene(s) <sup>b</sup>	No. of isolates from:		
		Mallards	Herring gulls	Waterbird feces
A	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	3		
Gn	NT	1		
Na	ND	1	1	
S	<i>aadA1</i>			1
S	ND	6		1
ANa	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>			1
GnS	<i>aadA1</i>	1		
GnS	ND	1		
SSu	<i>strA, sul2</i>	1		1
ANaS	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA</i>			1
ANaT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tetA</i>		1	
AST	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA, tetB</i>	1		
ANaST	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA, tetB</i>	2		
AAcCfCipNa	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	1		
ACipNaSxtT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tetA, tetB, int1</i> ; I1, 1.5 kb: <i>dhfr1-aadA1</i>		1	
NaSSuSxtT	<i>sul1, tetA, int1</i> ; I1, 2.2 kb: <i>aadA1</i>	1		
AAcCfCipNaS	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>aadA1</i>	2		
ACfSSuSxtT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>strA, sul2, aadA1, tetB</i>	1		
ACCfSSuSxtT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>cat, strA, sul1, sul2, tetB, int1</i> ; I1, 2.5 kb: <i>dhfr1-aadA1</i>	1		
Total		23	3	5

<sup>a</sup> A, ampicillin; Ac, amoxicillin-clavulanic acid; C, chloramphenicol; Cf, cephalothin; Cip, ciprofloxacin; Gn, gentamicin; Na, nalidixic acid; S, streptomycin; Su, sulfonamides; Sxt, sulfamethoxazole-trimethoprim; T, tetracycline.

<sup>b</sup> ND, not determined; NT, not tested; I1, class 1 integron.

colicin production were performed using PCR (15). The isolates were typed by XbaI pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (12). Those samples with no band differences were designated indistinguishable and possibly epidemiologically linked.

**Transferability of antibiotic resistance genes.** Transferability of ESBL and plasmid-encoded quinolone resistance genes was tested by conjugation. Plating experiments were done using plasmid-free, rifampin and nalidixic acid-resistant *E. coli* MT102RN and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL5325 as recipients (in the case of a donor strain having resistance to quinolone, recipients resistant to rifampin and sodium azide were used) (1).

**Plasmid analysis.** For plasmid analysis, transformants with a single plasmid carrying ESBL or quinolone resistance genes were prepared. Primarily plasmid DNA was extracted using the Qiagen Plasmid Midi kit (Qiagen, Germany). Plasmid DNA was introduced into competent *E. coli* Top10 (Invitrogen) by chemical transformation, followed by selection of transformants on LB agar supplemented with cefotaxime (2 mg liter<sup>-1</sup>) or ciprofloxacin (0.05 mg liter<sup>-1</sup>). The presence of relevant *bla* and quinolone resistance genes in transformants was confirmed by PCR. The size of plasmids with ESBL or quinolone resistance genes from transformants was designated by S1-PFGE. Plasmids were characterized by replicon typing and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Plasmid DNA from transformants was digested with EcoRV and HincII and then subjected to gel electrophoresis in a 1% agarose gel for 5 h at 100 V/cm. Plasmids were replicon typed as previously described (8). The presence of Tn3-like transposons in *qnrS* transformants was tested by PCR (1).

## RESULTS

**Antimicrobial-resistant *E. coli* in mallards, herring gulls, and waterbird feces.** In total, 65 suspected *E. coli* isolates were obtained from 86 samples from mallards. Antibiotic resistance was detected in 23 *E. coli* isolates. The prevalence of mallards with antimicrobial-resistant *E. coli* was 27% (23 resistant *E. coli* isolates/86 mallards tested). Three of the resistant isolates showed resistance to ciprofloxacin (but plasmid-encoded quinolone resistance genes were not detected). Isolates resistant to ampicillin and amoxicillin-clavulanic acid were

tested for ESBL production by DDST, and three of them were found to produce ESBL. Phenotypes and resistance genes, including integrons and gene cassettes, are summarized in Table 1. With selective cultivation on MCA with cefotaxime, one ESBL-producing *E. coli* isolate was detected (upon further analysis, however, this isolate was found to be identical to an isolate obtained by nonselective cultivation from the identical cloacal swab sample) (Table 2). Resistance to ciprofloxacin was found in 25 isolates by selective cultivation, and the *qnrS* gene was detected in four of these (Table 3).

In total, 18 suspected *E. coli* isolates were detected in 27 samples from herring gulls. Three *E. coli* isolates were antibiotic resistant (Table 1). The prevalence of herring gulls with antimicrobial-resistant *E. coli* was 11% (3/27). While one isolate was resistant to ciprofloxacin, plasmid-encoded quinolone resistance genes were not detected. Three ESBL-producing *E. coli* isolates were found by selective isolation with cefotaxime (Table 2). Using selective isolation with ciprofloxacin, 20 *E. coli* isolates were detected; the *qnrS* gene was detected in three of these (Table 3).

From 365 waterbird feces, 58 suspected *E. coli* isolates were obtained by nonselective cultivation. Antibiotic resistance was detected in five *E. coli* isolates (Table 1). The prevalence of waterbird feces with antimicrobial-resistant *E. coli* was 1.4% (5/365). By selective cultivation with cefotaxime, three ESBL-producing *E. coli* isolates were detected (Table 2). Using selective cultivation with ciprofloxacin, 23 *E. coli* isolates were found, and 2 of these were positive for *qnrS*. Another 5 isolates were obtained by selective cultivation on MCA with nalidixic acid; 1 of these isolates was positive for a mutant variant *aac(6')-Ib-cr*, and moreover, ESBL production was detected in this isolate (Table 2).

TABLE 2. Characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from wild birds on the Baltic Sea coast of Poland

Isolate no.	Origin	Antibiotic resistance phenotype <sup>a</sup>	ESBL <i>bla</i> genes	Antibiotic resistance genes	XbaI PFGE <sup>c</sup>	Presence of colicin (the gene <i>cbb</i> )	Phylogenetic group	Conjugation to <i>E. coli</i>	Conjugation to <i>Salmonella</i>	Plasmid incompatibility group <sup>d</sup>	RFLP pattern (EcoRV)	Plasmid size (kb)	Additional genes on ESBL-carrying plasmid
1 PL	Mallard	AAC/Cip/Na	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<i>strA</i> , <i>aadA1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetB</i>	a	-	A	+	+	IncN	I	35	
5 PL	Mallard	AC/SSu/Sxt	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<i>cat</i> , <i>strA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetB</i> , <i>int1</i> , 11 <sup>e</sup> , 2.5 kb, <i>dhfr17-aadA1</i>	b	-	B1	+	+				
78 PL <sup>a</sup>	Mallard	ACC/SSu/Sxt	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>		c	-	B2	-	-				
17 LA CEF	Herring gull	AC/Su	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<i>sul2</i> , <i>int1</i> , 11, 2.0 kb, <i>dhfr12-aadA2</i>	e	+	A	+	+	IncI1	II	90	<i>cbb</i> , <i>sul2</i>
11 LA CEF	Herring gull	AC/OnSu/Sxt	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>		d	-	B2	+	+	ND	III	80	<i>int1</i> , 11, 2.0 kb, <i>dhfr12-aadA2</i>
6 LA CEF	Herring gull	AC/SSu/Sxt	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>strA</i> , <i>aadA1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetD</i>	ND	-	D	-	-				
88	Waterbird feces	ACF	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	<i>int1</i> , 11, 2.1 kb, <i>aadA2</i>	g	-	A	+	+	IncI1	IV	95	
96	Waterbird feces	AC/Na/Su/Sxt	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>dhfr17</i> , <i>aadA5</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>int1</i>	h	-	B1	+	+	IncI1	V	100	<i>sul2</i> , <i>int1</i> , <i>dhfr17</i> , <i>aadA5</i>
8N <sup>b</sup>	Waterbird feces	AC/Cip/Na/SSu/Sxt	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i> , <i>str1</i> , <i>tetA</i> , <i>int1</i> , 11, 1.7 kb, <i>dhfr17-aadA5</i>	M	-	B2	+	-				

<sup>a</sup> Two identical isolates (designed by PFGE) obtained from one bird using nonselective isolation and selective isolation on MacConkey agar with cefotaxime (2 mg/liter).

<sup>b</sup> The strain was isolated by selective cultivation on MCA with nalidixic acid (20 mg/liter).

<sup>c</sup> A, ampicillin; Ac, amoxicillin-clavulanic acid; C, chloramphenicol; Cf, cephalosin; Cip, ciprofloxacin; Gn, gentamicin; Na, nalidixic acid; S, streptomycin; Su, sulfonamides; Sxt, sulfamethoxazole-trimethoprim; T, tetracycline.

<sup>d</sup> Class 1 integron.

<sup>e</sup> ND, not detected.

**Characterization of ESBL-producing *E. coli* isolates.** Nine ESBL-producing *E. coli* isolates were used for further characterization (see Table 2). The most prevalent gene in these ESBL-producing isolates was *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (6 isolates). The gene *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, or *bla*<sub>SHV-12</sub> was detected in the remaining 3 isolates. In the isolate with *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, the gene *aac(6')-Ib-cr*, responsible for resistance to aminoglycosides and fluoroquinolones, was detected. Most of the isolates were multiresistant, and four isolates contained a class 1 integron with gene cassettes. All the isolates showed unique XbaI-PFGE profiles. Most of the plasmids containing the *bla* genes for ESBL production were transferable by conjugation to *E. coli* and/or *Salmonella*. Transformants or transconjugants with single plasmids carrying the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene were obtained from 5 isolates. Plasmid DNA purified from these transformants was used for replicon typing and RFLP performed by EcoRV (Fig. 2) and HincII digestions. The strain 5PL, from mallards, harbored the 35-kb conjugative plasmid (RFLP type I) of the IncN group. The gene *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, in another 3 isolates from a herring gull (isolate 17 LA CEF) and waterbird feces (isolates 88 and 96), was located on the 90- to 100-kb conjugative plasmids of the IncI1 group. RFLP profiles of the IncI1 plasmids showed many band similarities. A plasmid 80 kb in size from the *E. coli* 11 LA CEF transformant was negative for the incompatibility group by the method used and showed the unique RFLP profile.

**Characterization of quinolone-resistant *E. coli* isolates.** Nine quinolone-resistant isolates with the *qnrS* genes were characterized (Table 3). Four isolates with high MIC levels of quinolones were examined for chromosomal mutations in the genes *gyrA* and *parC*. Mutation of Ser83 to Leu in GyrA and 80Ile to Ser in ParC were the most prevalent. A class 1 integron 1 kb in size was identified in one multiresistant isolate from a herring gull. All the isolates showed unique XbaI PFGE profiles and belonged to the A (6 isolates) or B1 (3 isolates) phylogenetic group as determined by multiplex PCR. Most of the *qnrS* plasmids were transferable by conjugation to *E. coli* and/or *Salmonella*. Transformants or transconjugants with a single *qnrS* plasmid were obtained only from 4 isolates and were used for further testing of the Inc groups and EcoRV (Fig. 2) and HincII plasmid DNA profiling. The isolates 18 PL CIP from a mallard and 6 LA CIP from a herring gull harbored the same 45-kb conjugative plasmid (RFLP type VI) of the X1 incompatibility group. The gene *qnrS* was associated with the Tn3-like transposon on this IncX1 plasmid together with *bla*<sub>TEM-1</sub> in both the isolates. A plasmid 30 kb in size from a transformant of *E. coli* strain 11 belonged to the IncX2 group and showed the unique RFLP profile. The *qnrS* gene in the isolate 58 PL CIP from a mallard was located on a 45-kb conjugative IncN plasmid. The RFLP profile of this plasmid differed from the profiles of other IncN plasmids harboring *bla*<sub>CTX-M-1</sub> genes detected in this study.

DISCUSSION

Even if populations of wild birds are not directly influenced by antibiotic practice, the acquired resistance in bacteria isolated from wild waterbirds occurs in various prevalences. Studies of resistant *E. coli* isolates have been mostly based on phenotype characterization of these isolates (20, 24, 26, 51, 58,

TABLE 3. Characterization of *Escherichia coli* with *qnr* genes from wild birds on the Baltic Sea coast of Poland

Isolate no.	Origin	Antibiotic resistance phenotype <sup>a</sup>	Antibiotic resistance gene(s) <sup>b</sup>	<i>qnr</i> gene	MIC (g/liter) of:		Mutation in <i>gyrA</i> and <i>parC</i>	XbaI PFGE	Presence of colicin ( <i>ctx</i> gene)	Phylogenetic group	Conjugation to <i>E. coli</i>	Conjugation to <i>Salmonella</i>	Plasmid incompatibility group	RFLP pattern	Plasmid size (kb)	Additional antibiotic resistance gene(s) on <i>qnr</i> plasmid
					NAL	CIP										
71 PL CIP	Mallard	AGn	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>qnrS</i>	8	0.25		D	+	A	+	+				
67 PL CIP	Mallard	AAcCf	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>qnrS</i>	8	0.25		C	-	A	+	+				
18 PL CIP	Mallard	ACipNaT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tetA</i> , <i>int1</i>	<i>qnrS</i>	>256	8	<i>gyrA</i> : 83Ser→Leu	A	-	A	+	+	IncX1	VI	45	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>
58 PL CIP	Mallard	ACipNaSSuSxt	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA</i> , <i>aadA1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>int1</i>	<i>qnrS</i>	>256	>8	<i>gyrA</i> : 83Ser→Leu, 87Asp→Asn	B	-	B1	+	+	IncN	VIII	45	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>
19 LA CIP	Herring gull	A	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>qnrS</i>	8	0.25		G	+	A	+	+				
6 LA CIP	Herring gull	ANaT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tetB</i>	<i>qnrS</i>	256	1	<i>gyrA</i> : 83Ser→Leu, <i>parC</i> : 80Ile→Ser	F	+	B1	+	+	IncX1	VI	45	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>
1 LA CIP	Herring gull	ANaSSuT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>int1</i> , <i>II</i> , 1.0 kb, <i>aadA1</i>	<i>qnrS</i>	256	1	<i>gyrA</i> : 83Ser→Leu, <i>parC</i> : 80Ile→Ser	E	+	A	-	-				
11	Waterbird feces	T	<i>tetA</i>	<i>qnrS</i>	16	0.25		I	-	B1	+	+	IncX2	VII	30	<i>tetA</i>
1	Waterbird feces	AST	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA</i> , <i>tetA</i>	<i>qnrS</i>	16	0.25		H	-	A	-	+				

<sup>a</sup> A, ampicillin; Ac, amoxicillin-clavulanic acid; Cf, cephalothin; Cip, ciprofloxacin; Gn, gentamicin; Na, nalidixic acid; S, streptomycin; Su, sulfonamides; Sxt, sulfamethoxazole-trimethoprim; T, tetracycline. Determined by the disk diffusion method.

<sup>b</sup> II, class 1 integron.

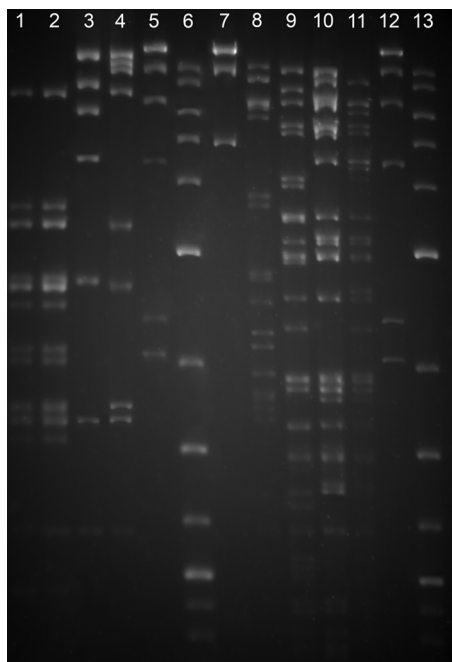


FIG. 2. RFLP analysis of plasmid DNA harboring genes for ESBL or quinolone resistance designed by EcoRV. Lane 1, *E. coli* 18 PL CIP (*qnrS*); lane 2, *E. coli* 6 LA CIP (*qnrS*); lane 3, *E. coli* 11 (*qnrS*); lane 4, *E. coli* 58 PL CIP (*qnrS*); lanes 5 and 12,  $\lambda$  DNA-HindIII Digest (Biolabs, New England); lanes 6 and 13, 2-log DNA marker (Biolabs); lane 7, *E. coli* 5 PL (*bla*<sub>CTX-M-1</sub>); lane 8, *E. coli* 11 LA CEF (*bla*<sub>CTX-M-1</sub>); lane 9, *E. coli* 17 LA CEF (*bla*<sub>CTX-M-1</sub>); lane 10, *E. coli* 88 (*bla*<sub>SHV-12</sub>); lane 11, *E. coli* 96 (*bla*<sub>CTX-M-1</sub>).

71, 75, 76, 82), and the genes determining resistance to old-generation antibiotics were sporadically detected (17, 21, 22, 29). Isolates of *E. coli* from birds on the Polish coast of the Baltic Sea were commonly resistant to old-generation antibiotics, and they were highly variable in phenotype and genotype characteristics. Resistances to streptomycin, ampicillin, and tetracycline were recently found in waterbirds elsewhere in Europe (4, 21, 23, 29). In the United States, resistance to streptomycin and ampicillin has been frequently seen in *E. coli* isolates from Canada geese (17, 51).

Isolates of *E. coli* with class 1 integrons and gene cassettes were found in waterbirds on the Polish coasts of the Baltic Sea. The gene cassettes contained the genes *aadA1*, *aadA2*, *dhfr1-aadA1*, *dhfr12-aadA2*, and *dhfr17-aadA5*. In Portugal, *E. coli* strains with class 1 and 2 integrons have been isolated from gulls (66). In Italy, *E. coli* isolates with class 1 integrons have been found in Mediterranean herring gulls (29). In the Czech Republic, *E. coli* isolates with class 1 and 2 integrons have been found in black-headed gulls (21, 23). We may summarize that the integrons are commonly found in *E. coli* isolates from waterbirds living in European areas inhabited by people and that the gene cassettes detected within these integrons are highly variable even though the genes *aadA1* and *dhfr1* are found regularly.

The emergence and wide dissemination in recent years of *E. coli* resistant to broad-spectrum cephalosporins due to production of ESBL and/or *E. coli* resistant to fluoroquinolones due to a presence of plasmid-encoded quinolone resistance genes

are of great concern and represent a serious problem for the treatment of infectious diseases (59, 79). These strains are also spread into the environment and can colonize wild mammals as well as wild birds, especially omnivorous gulls (4, 18, 23, 29, 47, 66, 67). We have proven the occurrence of *E. coli* isolates producing ESBL, as well as isolates with plasmid-encoded fluoroquinolone resistance, in mallards, herring gulls, and waterbird feces on the Polish coast of the Baltic Sea. Moreover, most isolates showed resistance to multiple antibiotics and contained class 1 integrons. Coresistance to non-beta-lactam antibiotics in the ESBL-producing *Enterobacteriaceae* is commonly described (60). Such multiresistant ESBL-producing strains are a serious problem since they severely limit therapeutic options against human and animal infections (69).

Isolates of *E. coli* producing ESBL found in mallards, in herring gulls, and in waterbird feces had the genes *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (most isolates), *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, and *bla*<sub>SHV-12</sub>. The extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-1 seems to be the most prevalent ESBL in animal *E. coli* strains throughout Europe (6, 30, 77). The various ESBLs have been found in *E. coli* from wild waterbirds on the Atlantic coast of Europe (66), on the coast of the Mediterranean Sea (4), and in the European inland (23). The spectrum of genes associated with the production of ESBL in Polish isolates was closer to the spectrum of genes in isolates from birds originating from the Mediterranean Sea and the European inland than to the spectrum of genes found in *E. coli* isolates from birds originating on the European Atlantic coast. Both gulls and mallards occurring in European areas inhabited by people are commonly colonized with *E. coli* strains resistant to broad-spectrum cephalosporins and having various *bla* genes responsible for the ESBL phenotype.

In the present study, *bla*<sub>CTX-M-1</sub> was found harbored on conjugative plasmids of the incompatibility groups IncN and Inc11. The association between *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and IncN plasmids was recently described (49, 52, 55). IncN plasmids are broad-host-range plasmids that might contribute to the further spread of isolates producing CTX-M-1-like enzymes among other members of the *Enterobacteriaceae*. The *bla*<sub>SHV-12</sub> gene in the *E. coli* isolate from a waterbird was harbored on an IncN conjugative plasmid. The association of SHV-12 and plasmids of this incompatibility group has been previously described (28, 49). In addition to CTX-M-1 and SHV-12, other types of ESBL have been found to be connected with IncN plasmids (28, 33). This indicates their role in disseminating ESBL genes. The Inc11 plasmids have been found to be more frequent in pathogenic than in commensal avian and human *E. coli* strains (35). These plasmids are also characterized by association with virulence and antibiotic resistance genes that can be involved in positive selection of these plasmids (35). Plasmids belonging to Inc11 carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> have recently been found in *E. coli* and *Salmonella* isolates throughout Europe (19, 28, 30, 47, 49).

The beta-lactamase CTX-M-15 is one of the most important ESBLs in human medicine. *E. coli* isolates producing this enzyme have emerged worldwide as an important cause of community-onset urinary tract and bloodstream infections (65). CTX-M-15 is often associated with OXA-1, TEM-1 beta-lactamases, and Aac(6')-Ib-cr, a variant of an aminoglycoside-modifying enzyme that is responsible for reduced susceptibility to both aminoglycosides and fluoroquinolones (70). Similar



findings were seen in the waterbird isolate from our study. This ESBL has been recently identified in the clone ST131, which is responsible in large measure for an international epidemic caused by CTX-M-15-producing *E. coli* (72). The pandemic dissemination of the clone ST131 producing CTX-M-15 was linked to the epidemic's narrow host range of IncFII plasmids (49, 62).

We found *E. coli* isolates with plasmid-encoded quinolone resistance associated with the *qnrS* gene in mallards, herring gulls, and waterbird feces on the Polish coast of the Baltic Sea. Moreover, one *E. coli* isolate from waterbird feces producing ESBL harbored the gene *aac(6)-Ib-cr*. All these findings of *E. coli* with genes responsible for fluoroquinolone resistance in wild birds are described here for the first time. Only recently, *E. coli* strains determined to be resistant to ciprofloxacin based on their resistance phenotype have been noted in waterbirds (23, 29, 76). The *qnrS* gene was first found in *Shigella flexneri* during 2003 in Japan (32), and together with the *qnrB* gene it has been identified as the most prevalent plasmid-mediated fluoroquinolone resistance gene (42). This gene has been detected in quinolone-resistant human, poultry, and swine *E. coli* and *Salmonella* isolates (10, 31, 34, 86).

In our study, *qnrS* genes were carried by plasmids of the N, X1, and X2 incompatibility groups. The association of IncN conjugative plasmids with *qnrS* genes was recently described (28, 37). IncX plasmids have been implicated in the acquisition and dissemination of transferable resistance in pathogenic bacteria (81).

IncX1 plasmids have recently been found to be associated with ESBL genes, such as *bla*<sub>TEM-52</sub> (1, 47), and with increased production of biofilm (54, 56), which could impart to the strains carrying them a greater potential for spreading and surviving in the environment. In our study, two *E. coli* isolates with identical conjugative IncX1 plasmids harboring the *qnrS* and *bla*<sub>TEM-1</sub> genes inside the Tn3-like transposon, from a mallard and a herring gull sampled in different areas of the Polish coast (the distance between the areas is about 20 km), were found. Both isolates showed high levels of resistance to quinolones and contained chromosomal mutations in the *gyrA* and/or *parC* gene. However, the isolates showed different macrorestriction profiles by PFGE and belonged to different phylogenetic groups, A and B1. This suggests a possible role for horizontal spreading of the IncX1 plasmid in the *E. coli* population of wild birds on the Polish coast. The association of plasmid-mediated *qnrS* genes with plasmids of this incompatibility group was recently described (13). The *qnrS1* gene has been found to be located on a 45-kb nonconjugative IncX1 plasmid in one poultry *E. coli* isolate from Italy. The *qnrS1* gene of this isolate was associated with a Tn3-like transposon containing the *bla*<sub>TEM-1</sub> gene, as previously described for an animal isolate of *Salmonella enterica* serovar Infantis (39, 40). Analysis of the IncX1 plasmid carrying this element showed it to resemble that of a plasmid identified in *Salmonella* Dublin (14). Those authors have suggested that genetic exchange among *Salmonella* and *E. coli* has occurred, thus indicating the existence of a potential animal reservoir for the *qnr* genes. Further investigation of our IncX1 plasmids harboring *qnrS* and *bla*<sub>TEM-1</sub> in *E. coli* from wild birds needs to be undertaken to find a possible association with the results presented by the studies mentioned above.

In one waterbird *E. coli* isolate, the *qnrS* gene was found to be located on a 30-kb conjugative plasmid of the IncX2 group. To our knowledge, this is the first report of *qnrS* genes on plasmids of the X2 incompatibility group. We think that our IncX2 plasmid harboring the *qnrS* gene could be related to the pR6K plasmid (36). Plasmids of this group are not very common, and the pR6K plasmid is the only IncX2 member described to date (36).

Mallards and gulls are identified as important bioindicators, as reservoirs and vectors of *E. coli* strains resistant to old-generation antibiotics, broad-spectrum cephalosporins, and fluoroquinolones, and as a potential melting pot for the development of new resistance types. We regard the common occurrence of these isolates as alarming. It provides evidence that these *E. coli* isolates, selected for in humans and domestic animals, are colonizing wild waterbirds and that via these birds, *E. coli* isolates important from a public health viewpoint can be spread into the environment. Although waterbirds do not naturally come into contact with antimicrobials, they are omnivorous and often search for food in agricultural, rural, and urban areas and in communal garbage dumps and sewage water treatment plants. Thus, they can easily be infected with resistant bacteria from domestic animal and human sources. Urban waters, too, can possibly be a source of antibiotic-resistant isolates inasmuch as these waters harbor higher percentages of resistant *E. coli* strains than do rural waters (38).

Waterbirds excrete large quantities of fecal coliforms, and they are theoretically capable, through their feces, of affecting drinking and recreational water quality (27, 43, 44). It is important to keep these birds away from swimming areas by limiting food supplies. Further, it is important to educate owners of beaches and restaurants, as well as the general public. Keeping beaches clean and prohibiting the feeding of birds are simple ways of limiting potential problems. The occurrence of resistant bacteria in populations of wild waterbirds where there is no selective pressure can imply that such resistance will be difficult to displace.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank George Jacoby (Lahey Clinic Inc., Burlington, MA), Lina Cavaco and Henrik Hasman (National Food Institute, Copenhagen, Denmark), Ming-Gui Wang (Institute of Antibiotics, Huashan Hospital, Shanghai, China), and Surbhi Malhotra-Kumar (University of Antwerp, Antwerp, Belgium) for positive-control strains. Our thanks also go to Katerina Dibdakova, Eva Suchanova, Marketa Machalkova, and Katerina Albrechtova for their excellent laboratory work. We thank the Veterinary Research Institute (Brno, Czech Republic) for providing equipment for pulsed-field gel electrophoresis.

This study was funded by grant no. MSM6215712402 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and grant no. P502/10/P083 from the Czech Science Foundation.

Wild birds were caught according to the permission given to Włodzimierz Meissner by the Polish General Director for Environmental Protection, no. 187/2009.

#### REFERENCES

- Bergenholtz, R. D., M. S. Jorgensen, L. H. Hansen, L. B. Jensen, and H. Hasman. 2009. Characterization of genetic determinants of extended-spectrum cephalosporinases (ESCs) in *Escherichia* isolates from Danish and imported poultry meat. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**:207–209.
- Blanco, G., J. A. Lemus, J. Grande, L. Gangoso, J. M. Grande, J. A. Donazar, B. Arroyo, O. Frias, and F. Hiraldo. 2007. Geographical variation in cloacal microflora and bacterial antibiotic resistance in a threatened avian scavenger in relation to diet and livestock farming practices. *Environ. Microbiol.* **9**:1738–1749.

3. Blanco, G., J. A. Lemus, and J. Grande. 2009. Microbial pollution in wildlife: linking agricultural manuring and bacterial antibiotic resistance in red-billed crouches. *Environ. Res.* **109**:405–412.
4. Bonnedahl, J., M. Drobní, M. Gauthier-Clerc, J. Hernandez, S. Granholm, Y. Kayserr, A. Melhus, G. Kahlmeter, J. Waldenstrom, A. Johansson, and B. Olsen. 2009. Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France. *Plos ONE* **4**:e5958.
5. Brinas, L., M. Zaraga, Y. Saenz, F. Ruiz-Larrea, and C. Torres. 2002.  $\beta$ -Lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3156–3160.
6. Brinas, L., M. A. Moreno, T. Teshager, Y. Saenz, M. C. Porrero, L. Dominguez, and C. Torres. 2005. Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1262–1264.
7. Camarda, A., E. Circella, D. Pennelli, A. Madio, G. Bruni, V. Lagrasta, G. Marzano, E. Mallia, and E. Campagnari. 2006. Wild birds as biological indicators of environmental pollution: biotyping and antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from Audouin's gulls (*Larus audouinii*) living in the Bay of Gallipoli (Italy). *Ital. J. Anim. Sci.* **5**:287–290.
8. Carattoli, A., A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K. L. Hopkins, and E. J. Threlfall. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* **63**:219–228.
9. Cattoir, V., L. Poirel, V. Rotimi, C. J. Soussy, and P. Nordmann. 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**:394–397.
10. Cavaco, L. M., N. Frimodt-Moller, H. Hasman, L. Guardabassi, L. Nielsen, and F. M. Aarestrup. 2008. Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and swine in Denmark. *Microb. Drug Resist.* **14**:163–169.
11. Cavaco, L. M., H. Hasman, S. Xia, and F. M. Aarestrup. 2009. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovars Kentucky and Bovismorbificans of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:603–608.
12. CDC. 2004. Standardized molecular subtyping of foodborne bacterial pathogens by pulsed-field gel electrophoresis. National Molecular Network for Foodborne Disease Surveillance, CDC, Atlanta, GA.
13. Cerquetti, M., A. Garcia-Fernandez, M. Giufre, D. Fortini, M. Accogli, C. Graziani, I. Luzzi, A. Caprioli, and A. Carattoli. 2009. First report of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* in an *Escherichia coli* strain of animal origin in Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:3112–3114.
14. Chu, C., Y. Feng, A. C. Chien, S. Hu, C. H. Chu, and C. H. Chiu. 2008. Evolution of genes on the *Salmonella* virulence plasmid phylogeny revealed from sequencing of the virulence plasmids of *S. enterica* serotype Dublin and comparative analysis. *Genomics* **92**:339–343.
15. Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen. 2000. Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4555–4558.
16. CLSI. 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 8th informational supplement. CLSI, Wayne, PA.
17. Cole, D., D. J. V. Drum, D. E. Stallknecht, D. G. White, M. D. Lee, S. Ayers, M. Sobsey, and J. J. Maurer. 2005. Free-living Canada geese and antimicrobial resistance. *Emerg. Infect. Dis.* **11**:935–938.
18. Costa, D., P. Poeta, Y. Saenz, L. Vinue, B. Rojo-Bezares, A. Jouini, M. Zarazaga, J. Rodriguez, and C. Torres. 2006. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**:1311–1312.
19. Dierikx, C., A. van Essen-Zandbergen, K. Veldman, H. Smith, and D. Mevius. 2010. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet. Microbiol.* **145**:273.
20. Dobbins, G., H. Hariharan, P.-Y. Daoust, S. Hariharan, S. Heaney, M. Coles, L. Price, and C. A. Muckle. 2005. Bacterial flora of free-living double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*) chicks on Prince Edward Island, Canada, with reference to enteric bacteria and antibiotic resistance. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **28**:71–82.
21. Dolejska, M., A. Cizek, and I. Literak. 2007. High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from black-headed gulls in the Czech Republic. *J. Appl. Microbiol.* **103**:11–19.
22. Dolejska, M., D. Senk, A. Cizek, J. Rybarikova, O. Sychra, and I. Literak. 2008. Antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates in cattle and house sparrows on two Czech dairy farms. *Res. Vet. Sci.* **85**:491–494.
23. Dolejska, M., B. Biersosova, L. Kohoutova, I. Literak, and A. Cizek. 2009. Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. *J. Appl. Microbiol.* **106**:1941–1950.
24. Edge, T. A., and S. Hill. 2005. Occurrence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* from surface waters and fecal pollution sources near Hamilton, Ontario. *Can. J. Microbiol.* **51**:501–505.
25. Everett, M. J., Y. F. Jin, V. Ricci, and L. J. Piddock. 1996. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2380–2386.
26. Fallacara, D. M., C. M. Monahan, T. Y. Morishita, and R. W. Wack. 2001. Fecal shedding and antimicrobial susceptibility of selected bacterial pathogens and a survey of intestinal parasites in free-living waterfowl. *Avian Dis.* **45**:128–135.
27. Fogarty, L. R., S. K. Haack, M. J. Wolcott, and R. I. Whitman. 2003. Abundance and characteristics of the recreational water quality indicator bacteria *Escherichia coli* and enterococci in gull faeces. *J. Appl. Microbiol.* **94**:865–878.
28. Garcia-Fernandez, A., G. Chiaretto, A. Bertini, L. Villa, D. Fortini, A. Ricci, and A. J. Carattoli. 2008. Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**:1229–1233.
29. Gionchetti, F., P. Zucca, F. Gombac, C. Monti-Bragadin, C. Lagatolla, E. Tonin, E. Edalucci, L. A. Vitali, and L. Dolzani. 2008. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons in Enterobacteriaceae isolated from Mediterranean herring gulls (*Larus cachinans*). *Microb. Drug Resist.* **14**:93–99.
30. Girlich, D., L. Poirel, A. Carattoli, I. Kempf, M. F. Lartigue, A. Bertini, and P. Nordmann. 2007. Extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:4681–4685.
31. Gunell, M., M. A. Webber, P. Kotilainen, A. J. Lilly, J. M. Caddick, J. Jalava, P. Huovinen, A. Siitonen, A. J. Hakanen, and L. J. Piddock. 2009. Mechanisms of resistance in nontyphoidal *Salmonella enterica* strains exhibiting a nonclassical quinolone resistance phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:3832–3836.
32. Hata, M., M. Suzuki, M. Matsumoto, M. Takahashi, K. Sato, S. Ibe, and K. Sakae. 2005. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:801–803.
33. Hopkins, K. L., E. Liebana, L. Villa, M. Batchelor, E. J. Threlfall, and A. Carattoli. 2006. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:3203–3206.
34. Hopkins, K. L., L. Wootton, M. R. Day, and E. J. Threlfall. 2007. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* found in *Salmonella enterica* strains isolated in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**:1071–1075.
35. Johnson, T. J., Y. M. Wannemuehler, S. J. Johnson, C. M. Logue, D. G. White, C. Doetkott, and L. K. Nolan. 2007. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:1976–1983.
36. Jones, C. S., D. J. Osborne, and J. Stanley. 1993. Molecular comparison of the IncX plasmids allows division into IncX1 and IncX2 subgroups. *J. Gen. Microbiol.* **139**:735–741.
37. Karah, N., L. Poirel, S. Bengtsson, M. Sundqvist, G. Kahlmeter, P. Nordmann, A. Sundsfjord, O. Samuelsen, and Norwegian Study Group on PMQR. 2010. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6)-Ib-cr* in *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* from Norway and Sweden. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **66**:425–431.
38. Kaspar, C. W., J. L. Burgess, I. T. Knight, and R. R. Colwell. 1990. Antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify sources of fecal contamination in water. *Can. J. Microbiol.* **36**:891–894.
39. Kehrenberg, C., S. Friederichs, A. de Jong, G. B. Michael, and S. Schwarz. 2006. Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**:18–22.
40. Kehrenberg, C., A. de Jong, S. Friederichs, A. Cloeckert, and S. Schwarz. 2007. Molecular mechanisms of decreased susceptibility to fluoroquinolones in avian *Salmonella* serovars and their mutants selected during the determination of mutant prevention concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**:886–892.
41. Kim, H. B., C. H. Park, C. J. Kim, E. C. Kim, G. A. Jacoby, and D. C. Hooper. 2009. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:639–645.
42. Lavilla, S., J. J. Gonzalez-Lopez, M. Sabate, A. Garcia-Fernandez, M. N. Larrosa, R. M. Bartolome, A. Carattoli, and G. Prats. 2008. Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**:291–295.
43. Levesque, B., P. Brousseau, P. Simard, E. Dewailly, M. Meisels, D. Ramsay, and J. Joly. 1993. Impact of the ring-billed gull (*Larus delawarensis*) on the microbiological quality of recreational water. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1228–1230.
44. Levesque, B., P. Brousseau, F. Bernier, E. Dewailly, and J. Joly. 2000. Study of the bacterial content of ring-billed gull droppings in relation to recreational water quality. *Water Res.* **34**:1089–1096.
45. Lewis, J. S., II, M. Herrera, B. Wickes, and J. E. Petterson. 2007. First report of the emergence of CTX-M-type extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs)

- as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:4015–4021.
46. Literak, I., R. Vanko, M. Dolejska, A. Cizek, and R. Karpiskova. 2007. Antibiotic resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* in Russian rooks (*Corvus frugilegus*) wintering in the Czech Republic. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**:616–621.
  47. Literak, I., M. Dolejska, T. Radimersky, J. Klimes, M. Friedman, F. M. Aarestrup, H. Hasman, and A. Cizek. 2010. Antimicrobial resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multi-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *J. Appl. Microbiol.* **108**:1702–1711.
  48. Livermore, D. M., M. Warner, L. M. C. Hall, V. I. Enne, S. J. Projan, P. M. Dunman, S. L. Wooster, and G. Harrison. 2001. Antibiotic resistance in bacteria from magpies (*Pica pica*) and rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from west Wales. *Environ. Microbiol.* **3**:658–661.
  49. Marcade, G., C. Deschamps, A. Boyd, V. Gautier, B. Picard, C. Branger, E. Denamur, and G. Arlet. 2009. Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**:67–71.
  50. Meissner, W., J. Typiak, A. Kosmicki, and S. Bzoma. 2009. Numbers of waterbirds on the Bay of Gdansk in the span May 2007–April 2008. *Notatki Ornitol.* **50**:65–72. (In Polish.)
  51. Middleton, J. H., and A. Ambrose. 2005. Enumeration and antibiotic resistance patterns of fecal indicator organisms isolated from migratory Canada geese (*Branta canadensis*). *J. Wildl. Dis.* **41**:334–341.
  52. Moodley, A., and L. Guardabassi. 2009. Transmission of IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:1709–1711.
  53. Nakamura, M., H. Yoshimura, and T. Koeda. 1982. Drug resistance and R plasmids of *Escherichia coli* strains isolated from six species of wild birds. *Jpn. J. Vet. Sci.* **44**:465–471.
  54. Norman, A., L. H. Hansen, Q. She, and S. J. Sorensen. 2008. Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid* **60**:59–74.
  55. Novais, A., R. Canton, R. Moreira, L. Peixe, F. Baquero, and T. M. Coque. 2007. Emergence and dissemination of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:796–799.
  56. Ong, C. L., S. A. Beatson, A. G. McEwan, and M. Schembri. 2009. Conjugative plasmid transfer and adhesion dynamics in an *Escherichia coli* biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:6783–6791.
  57. Park, C. H., A. Robicsek, G. A. Jacoby, D. Sahn, and D. C. Hooper. 2006. Prevalence in the United States of *aac(6)Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:3953–3955.
  58. Parveen, S., R. L. Murphree, L. Edmiston, C. W. Kaspar, K. M. Portier, and M. L. Tamplin. 1997. Association of multiple-antibiotic-resistance profiles with point and nonpoint sources of *Escherichia coli* in Apalachicola Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2607–2612.
  59. Paterson, D. L., and R. A. Bonomo. 2005. Extended-spectrum beta lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**:657–686.
  60. Paterson, D. L. 2006. Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am. J. Infect. Control.* **119**:S20–S28.
  61. Pawiak, R., M. Mazurkiewicz, J. Molenda, J. Pinowski, and A. Wieliczko. 1989. The occurrence of *Escherichia coli* strains pathogenic to humans and animals in the eggs and nestlings of *Passer* spp., p. 139–151. In J. Pinowski, B. P. Kavanagh, and W. Górski (ed.), Nestling mortality of granivorous birds due to microorganisms and toxic substances. Proceedings of the International Symposium of the Working Group on Granivorous Birds, INTECOL. Polish Scientific Publishers, Warsaw, Poland.
  62. Peirano, G., M. Costello, J. D. Pitout. 2010. Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from the Chicago area: high prevalence of ST131 producing CTX-M-15 in community hospitals. *Int. J. Antimicrob. Agents* **36**:19–23.
  63. Perichon, B., P. Courvalin, and M. Galimand. 2007. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by *qepA*-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2464–2469.
  64. Pitout, J. D., A. Hossain, and N. D. Hanson. 2004. Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J. Clin. Microbiol.* **42**:5715–5721.
  65. Pitout, J. D. 2010. Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: changing epidemiology and drug treatment choices. *Drugs* **70**:313–333.
  66. Poeta, P., H. Radhouani, G. Igrejas, A. Goncalves, C. Carvalho, J. Rodrigues, L. Vinue, S. Somalo, and C. Torres. 2008. Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta-lactamases. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:7439–7441.
  67. Poeta, P., H. Radhouani, L. Pinto, A. Martinho, V. Rego, R. Rodrigues, A. Goncalves, J. Rodrigues, V. Estepa, C. Torres, and G. Igrejas. 2009. Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups. *J. Basic Microbiol.* **49**:584–588.
  68. Radimersky, T., P. Frolkova, D. Janoszowska, M. Dolejska, P. Svec, E. Roubalova, P. Cikova, A. Cizek, and I. Literak. 2010. Antibiotic resistance in faecal bacteria (*Escherichia coli*, *Enterococcus* spp.) in feral pigeons. *J. Appl. Microbiol.* **109**:1687–1695.
  69. Rice, L. B. 2009. The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**:476–481.
  70. Robicsek, A., J. Strahilevitz, G. A. Jacoby, M. Macielag, D. Abbanat, C. H. Park, K. Bush, and D. C. Hooper. 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* **12**:83–88.
  71. Rose, J. M., R. J. Gast, A. Bogomolni, J. C. Ellis, B. J. Lentell, K. Touhey, and M. Moore. 2009. Occurrence and patterns of antibiotic resistance in vertebrates off the Northeastern United States coast. *FEMS Microbiol. Ecol.* **67**:421–431.
  72. Rossolini, G. M., M. M. D'Andrea, C. Mugnaioli. 2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**:33–41.
  73. Rybarikova, J., M. Dolejska, D. Materna, I. Literak, and A. Cizek. 2010. Phenotypic and genotypic characteristics of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from symbiotic flies, cattle and sympatric insectivorous house martins from a farm in the Czech Republic (2006–2007). *Res. Vet. Sci.* **89**:179–183.
  74. Sato, G., C. Oka, M. Asagi, and N. Ishiguro. 1978. Detection of conjugative R plasmids conferring chloramphenicol resistance in *Escherichia coli* isolated from domestic and feral pigeons and crows. *Zentralbl. Bakteriol. Orig. A* **241**:407–417.
  75. Sayah, R. S., J. B. Kaneene, Y. Johnson, and R. A. Miller. 2005. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1394–1404.
  76. Sjolund, M., J. Bonnedahl, J. Hernandez, S. Bengtsson, G. Cederbrant, J. Pinhassi, G. Kahlmeter, and B. Olsen. 2008. Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the Arctic. *Emerg. Infect. Dis.* **14**:70–72.
  77. Smet, A., A. Martel, D. Persoons, J. Dewulf, M. Heyndrickx, B. Catry, L. Herman, F. Haesebrouck, and P. Butaye. 2008. Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:1238–1243.
  78. Sreedharan, S., M. Oram, B. Jensen, L. R. Peterson, and L. M. Fisher. 1990. DNA gyrase *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*: close similarity with quinolone resistance mutations in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:7260–7262.
  79. Strahilevitz, J., G. A. Jacoby, D. C. Hooper, and A. Robicsek. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**:664–689.
  80. Thomson, K. S., and C. C. Sanders. 1992. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:1877–1882.
  81. Threlfall, E. J., L. R. Ward, and B. Rowe. 1986. R plasmids in *Salmonella typhimurium* in the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.* **18**(Suppl. C):175–177.
  82. Tsubokura, M., A. Matsumoto, K. Otsuki, S. B. Animas, and T. Sanekata. 1995. Drug resistance and conjugative R plasmids in *Escherichia coli* strains isolated from migratory waterfowl. *J. Wildl. Dis.* **31**:352–357.
  83. Wallace, J. S., T. Cheasty, and K. Jones. 1997. Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. *J. Appl. Microbiol.* **82**:399–404.
  84. Wu, S., E. Chouliara, H. Hasman, A. Dalsgaard, A. Vieira, L. B. Jensen. 2008. Detection of a single isolate of CTX-M-1-producing *Escherichia coli* from healthy pigs in Denmark. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**:747–749.
  85. Yamane, K., J. Wachino, S. Suzuki, and Y. Arakawa. 2008. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:1564–1566.
  86. Yue, L., H. X. Jiang, X. P. Liao, J. H. Liu, S. J. Li, X. Y. Chen, C. X. Chen, D. H. Lu, and Y. H. Liu. 2008. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* **132**:414–420.





## Příloha 5

DOLEJSKA, M., DUSKOVA, E., RYBARIKOVA, J., JANOSZOWSKA, D., ROUBALOVA, E., DIBDAKOVA, K., MASECKOVA, G., KOHOUTOVA, L., LITERAK, I., SMOLA, J., CIZEK, A., 2011, Plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from equine clinic and horseback riding centre: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 66, p. 757-764.

### Souhrn

---

Tato studie byla zaměřena na sledování výskytu izolátů *E. coli* u koní a v prostředí na Klinice chorob koní VFU Brno a v hipocentru Koryčany. Byly vyšetřeny vzorky trusu koní, stěry ze stájových boxů, hmyz a rektální výtěry ošetřovatelů koní. Na Klinice chorob koní byl zjištěn vysoký výskyt *E. coli* s produkcí širokospektré beta-laktamázy CTX-M, především v trusu koní a v prostředí kliniky (18-34 %). Kmeny s identickým pulzním profilem byly zjištěny ve všech typech vzorků, což ukazuje na jejich šíření v rámci kliniky. Gen *bla*<sub>CTX-M</sub> byl u všech kmenů nesen na velkém konjugativním multirezistentním plazmidu IncHI1. Tento výsledek podtrhuje význam horizontálního přenosu plazmidů v šíření ESBL mezi různými bakteriálními izoláty na klinice.



## Plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre

Monika Dolejska<sup>1\*</sup>, Eva Duskova<sup>2</sup>, Jana Rybarikova<sup>1</sup>, Dagmar Janoszowska<sup>1</sup>, Eva Roubalova<sup>1</sup>, Katerina Dibdakova<sup>1</sup>, Gabriela Maceckova<sup>3</sup>, Ludmila Kohoutova<sup>2</sup>, Ivan Literak<sup>1</sup>, Jiri Smola<sup>2</sup> and Alois Cizek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic; <sup>2</sup>Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic; <sup>3</sup>Equine Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic

\*Corresponding author. Tel: +420-541-562-643; Fax: +420-541-562-631; E-mail: m.dolejska@centrum.cz

Received 20 July 2010; returned 25 August 2010; revised 1 December 2010; accepted 1 December 2010

**Objectives:** The aim of this study was to determine the occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* at an equine clinic and a horseback riding centre, and to discuss the impact of antimicrobial treatment on resistance selection.

**Methods:** Faeces from horses, environmental smears and flies were sampled at both the clinic and riding centre. Staff at the equine clinic were also examined. The samples were cultivated on MacConkey agar with cefotaxime (2 mg/L) to isolate ESBL-producing *E. coli*. The presence of *bla* and *qnr* genes was tested by PCR, and transferability was determined by conjugation. Replicon typing and restriction analysis of plasmids harbouring ESBL and *qnr* genes were performed.

**Results:** *E. coli* with the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene were isolated from horses, staff, environmental smears and flies at the two sites. *E. coli* isolates from the equine clinic harboured an IncHI1 conjugative 235–285 kb plasmid containing *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *catA1*, *strA*, *sul2* and *tet(B)* genes. Some of these were positive for *qnrS1* and/or *qnrB19*, and were located on 40 or 45 kb IncN or IncX1 conjugative plasmids. The gene *bla*<sub>CTX-M-1</sub> in isolates from the riding centre was carried by IncN (30 kb) and IncI1 (85 kb) conjugative plasmids. Horizontal gene transfer seems to be involved in disseminating *E. coli* with ESBL and *qnr* genes at the clinic and riding centre.

**Conclusions:** The study illustrates that ESBL-producing *E. coli*, as well as plasmids carrying ESBL genes of clinical interest, can be easily transferred among horses, humans and flies living in close contact.

**Keywords:** antibiotics, horses, ESBLs

### Introduction

*Escherichia coli* is a common commensal bacterial species that colonizes the gastrointestinal tracts of both humans and animals. Antibiotic-resistant commensal *E. coli* occur with different frequencies in human and animal populations, and in the environment. Human patients in hospitals and long-term care facilities frequently develop nosocomial infections, often caused by antibiotic-resistant *E. coli* clones.<sup>1</sup> Similarly, an increased frequency of antibiotic-resistant *E. coli* occurrence has been detected in horse faeces in connection with hospitalization and antimicrobial treatment of horses.<sup>2</sup>

Medication of both humans and animals with  $\beta$ -lactam antibiotics, particularly third- and fourth-generation cephalosporins, underlies the selection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase

(ESBL)-producing Enterobacteriaceae, which are among common causative agents of nosocomial infections.<sup>3</sup> Among these, the proportion of CTX-M  $\beta$ -lactamase producers has increased within the last few years.<sup>4</sup> Genes encoding for ESBLs are often parts of integrons, transposons and/or plasmids, and, in the case of multiresistant strains of enterobacteria, these transposable elements often harbour structurally unrelated resistance genes. This enables their co-selection, e.g. by sulphonamides, tetracyclines or aminoglycosides.<sup>5</sup> Another antibiotic resistance mechanism that is recently on the increase in enterobacteria is resistance to fluoroquinolones determined by plasmid-mediated *qnr* genes.<sup>6</sup>

Increased selection of ESBL producers among family members of the Enterobacteriaceae can be expected when using cephalosporins or, by co-selection, even when using

other groups of antimicrobial substances for therapy in horses. As evidenced by recently published findings of ESBL-producing *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* in horses in the Netherlands,<sup>3</sup> it will be necessary to consider ESBL-positive enterobacteria as potential aetiological agents of nosocomial infections in equine clinics.

The aim of this study was to detect the occurrence of antibiotic-resistant *E. coli* in faeces of hospitalized horses and hospital staff, flies and environmental samples from the university equine clinic and from a horseback riding centre, with an emphasis on *E. coli* strains producing ESBLs. The equine clinic and horseback riding centre were selected for the study because of two serious cases of *E. coli* infection and their differing antibiotic policies. A case of metritis in one mare caused by multiresistant *E. coli* was diagnosed at the equine clinic, and a case of sepsis in newborn twin foals was demonstrated at the riding centre. Further goals of this work were to discuss the impact of antimicrobial treatment on the selection of ESBL-producing and fluoroquinolone-resistant *E. coli*, and to evaluate the likelihood of transmission and survival of ESBL-producing *E. coli* isolates in the conditions of the clinic and riding centre.

## Materials and methods

### Equine clinic

The equine clinic is located on the campus of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic. It has been in service since 2000 and has 50 boxes available for the hospitalization of horses. This establishment administers treatment services for >1000 horses per year. The annual usage of antimicrobial substances in 2009 was as follows: procaine benzylpenicillin+streptomycin, 1898 defined daily doses per adult horse (DDDs); enrofloxacin, 594 DDDs; metronidazole, 495 DDDs; gentamicin, 502 DDDs; trimethoprim+sulfadiazine, 384

DDDs; cefquinome, 93 DDDs; marbofloxacin, 69 DDDs; oxytetracycline, 48 DDDs; rifampicin, 17 DDDs; clarithromycin, 9 DDDs; ceftazolin, 2 DDDs; and penicillin G, 2 DDDs. Data for 2009 are representative for the year 2007–08, when the samples were taken. A case of metritis in one mare caused by multiresistant *E. coli* (ESBL negative) was diagnosed at the equine clinic on 6 June 2007. In subsequent screening tests, faecal samples from hospitalized horses, rectal swab samples from clinic staff, environmental samples from the stables (biofilm smears from the waterers) and samples of flies (*Musca domestica*) were taken (Table 1). An ESBL-positive *E. coli* strain isolated from a wound of a horse hospitalized in this clinic was included in the examination.

### Horseback riding centre

The monitored horseback riding centre is located in the south-east of the Czech Republic, in the municipal territory of the town of Korycany, ~60 km from Brno. The riding centre has no relation to the equine clinic. At the time of sampling, 35 horses were kept at the centre. Horses were stabled in boxes in two stables. The antibiotic therapy of the horses was evaluated over 2007 and 2008. According to the data provided by a veterinarian, antibiotics were administered only in the course of castrations and respiratory infections, and to treat flesh wounds. Benzylpenicillin+streptomycin (76 DDDs), trimethoprim+sulfadiazine (7 DDDs), oxytetracycline (5 DDDs) and first-generation cephalosporins (1/2 DDDs) were used. A case of sepsis in newborn twin foals was demonstrated here in April 2008. These twin foals were treated with the fourth-generation cephalosporin cefquinome. One of the foals had to be euthanized due to progressive general infection on 14 April 2008. The necropsy and subsequent cultivation examination proved *E. coli* sepsis caused by ESBL-producing *E. coli* (sample no. 62510). Within this context, three subsequent samplings were taken, including faecal samples from horses (including the mother of the antibiotic-treated twins), environmental smears from boxes (waterers), samples of flies (*M. domestica*) and a rectal swab of a cat (Table 1).

**Table 1.** ESBL-producing *E. coli* in the equine clinic and the horseback riding centre

Sampling place	Date of visit	Sample type (no.)	No. of <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> -positive isolates	Pulsotype (no.) <sup>a</sup>
Equine clinic	July 2007	horses (14)	3	B (1), C (1), E (1)
	February 2008	horses (12)	2	<u>A (1)</u> , U (1)
		surface swabs (32)	8	<u>A (7)</u> , Q (1)
		humans (10)	1	<u>A (1)</u>
	June 2008	wound infection (1)	1	<u>S (1)</u>
	September 2008	horses (11)	7	D (1), F (2), I (1), J (1), <u>N (1)</u> , P (1)
		surface swabs (18)	9	H (1), L (2), <u>N (3)</u> , <u>O (2)</u> , <u>R (1)</u>
		flies (179)	33	G (22), M (1), <u>N (1)</u> , <u>O (1)</u> , <u>R (1)</u> , <u>S (4)</u> , T (3)
humans (2)		—	—	
Horseback riding centre	April 2008	foal—necropsy (1)	1	f (1)
		horses (10)	4	a (1), b (1), c (1), <u>d (1)</u>
		surface swabs (18)	2	<u>d (1)</u> , e (1)
	May 2008, June 2008	horses (33)	—	—
		surface swabs (2)	—	—
		flies (187)	—	—
		cat (1)	—	—

<sup>a</sup>Identical pulsotypes from different sample types (horses, humans, surface swabs and flies) are underlined.

### Isolation of ESBL-producing *E. coli* and antibiotic susceptibility testing

Samples were enriched in MacConkey broth and cultivated on MacConkey agar with cefotaxime (2 mg/L). Selected isolates (1 isolate per 1 sample) were examined for the production of ESBL using the double-disc synergy test<sup>7,8</sup> and identified by the API 10S test kit (bioMérieux, France). The disc diffusion method<sup>9</sup> was used to test for susceptibility to 12 selected antimicrobial substances: ampicillin (10 µg); streptomycin (30 µg); sulphonamides compound (300 µg); tetracycline (30 µg); sulfamethoxazole/trimethoprim (23.75/1.25 µg); chloramphenicol (30 µg); cefalotin (30 µg); nalidixic acid (30 µg); ceftazidime (30 µg); gentamicin (10 µg); amoxicillin/clavulanic acid (30 µg); and ciprofloxacin (5 µg). In horses with proven excretion of ESBL-producing *E. coli*, the concentration of cefotaxime-resistant *E. coli* per gram of faeces was determined. For this purpose, the faecal samples were weighed, homogenized in phosphate-buffered saline, 10 times diluted and then cultivated on MacConkey agar with cefotaxime (2 mg/L). ESBL production was proven in cefotaxime-resistant colonies using a double-disc synergy test.

### PCR and testing of antibiotic resistance genes

The genes responsible for the ESBL phenotype (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub>) were identified by PCR (Table S1, available as Supplementary data at JAC Online), and the products were sequenced on both strands using primers CTX-M-1seq-F and CTX-M-1seq-R (ABI 310 Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Belgium). All the ESBL isolates were examined for additional resistance and antibiotic resistance genes and integrons by PCR with specific primers (Table S2, available as Supplementary data at JAC Online), as described previously.<sup>9,10</sup> All the isolates were also tested for plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes, and the products were sequenced on both strands using the following primers: *qnrS1*.seq1F, *qnrS1*.seq1R, *qnrS1*.seq2F and *qnrS1*.seq2R for the *qnrS1* gene; and *qnrB19*.seq1F, *qnrB19*.seq1R, *qnrB19*.seq2F and *qnrB19*.seq2R for the *qnrB19* gene. The list of primers for PMQR is shown in Table S1. The nucleotide sequences of the complete *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (876 bp), *qnrS1* (657 bp) and *qnrB19* (645 bp) genes have been submitted to GenBank (accession numbers HQ456393, HQ640661 and HQ640660, respectively). Identification of *E. coli* phylogenetic groups was performed using a multiplex PCR assay.<sup>11</sup>

### PFGE and transferability of ESBL/quinolone resistance genes by conjugation

The isolates were typed by XbaI-PFGE following CDC guidelines.<sup>12</sup> The transferability of *bla* genes and quinolone resistance genes was tested by conjugation. Plate-mating experiments were performed using plasmid-free, rifampicin- and nalidixic acid-resistant or, in the case of quinolone resistance, rifampicin- and sodium azide-resistant *E. coli* MT102RN and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium SL5325 as recipients.<sup>13</sup>

### Plasmid characterization

Plasmid DNA from *E. coli* was isolated by the alkaline extraction procedure.<sup>14</sup> Plasmid DNA was introduced to competent *E. coli* DH5α or *E. coli* Top10 (both Invitrogen, USA) by chemical transformation, followed by selection of transformants on brain heart infusion agar supplemented with cefotaxime (2 mg/L) or ciprofloxacin (0.05 mg/L), respectively. The presence of a relevant *bla* gene/quinolone resistance gene in the transformants was confirmed by PCR. All transformants, transconjugants and their corresponding donors were examined for MICs of ciprofloxacin and nalidixic acid using an agar dilution method following CLSI guidelines.<sup>7</sup> The presence of a Tn3-like transposon in *qnrS1*-positive

transformants was tested by PCR.<sup>15</sup> The size of the plasmid with the ESBL gene from transformants or transconjugants was designated by S1 nuclease PFGE.<sup>16</sup> Plasmid DNA from transformants/transconjugants was digested with EcoRV and HincII before gel electrophoresis in 1% agarose gel for 16 h at 67 V/cm. Plasmids were replicon typed as described previously.<sup>17</sup>

### Statistical analysis

All data were used to calculate the prevalence of antimicrobial resistance and analysed by the  $\chi^2$  test. Differences with  $P \leq 0.05$  were considered significant.

## Results

### Equine clinic

#### Isolation of ESBL-producing *E. coli*

From the total of 37 horse faecal samples, 12 (32%) ESBL-producing *E. coli* isolates were found (Table 1). Seventeen (34%) out of 50 isolates from the stables environment, 33 (18%) of samples from 179 flies and 1 (8%) of 12 rectal swabs from clinic staff were positive for ESBL-producing *E. coli*. Isolates belonged to phylogenetic groups A (20), B1 (40) and B2 (3).

#### Distribution of ESBL isolate pulsotypes

The total 64 ESBL-producing *E. coli* isolates thus obtained were compared using PFGE. These were isolates from horse faeces (12 isolates), the stables environment (17), clinic staff (1), the wound infection (1) and flies (33). The isolates were divided into 20 different pulsotypes designated with letters A–U (Tables 1 and 2). All except for two *E. coli* isolates acquired from horses during the sampling period showed unique PFGE profiles. Isolates with the same PFGE profile (designated A) were found in one horse, a staff member and several surface swabs, suggesting clonal dissemination of this isolate in the equine clinic during the period investigated. Most *E. coli* isolates from flies showed pulsotype G, which was not detected in horse and stables environment samples. However, several isolates from flies did show identical pulsotypes, as did a horse isolate (pulsotype N) and three stables environment isolates (pulsotypes N, O and R). The wound infection *E. coli* isolate 63743 showed the same pulsotype (S) as four fly isolates.

#### Antibiotic resistance genes and integrons in ESBL isolates

All the ESBL isolates were multiresistant, with resistance to 7–12 of the antimicrobial agents tested, and their ESBL phenotype was caused by the presence of the gene *bla*<sub>CTX-M-1</sub>. No *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> ESBL genes were detected. Additional resistance to chloramphenicol, gentamicin, streptomycin, sulphonamides and tetracycline was detected in all isolates, and all the isolates were positive for the *catA1*, *strA*, *sul2* and *tet(B)* genes. Most isolates also contained class 1 integrons with variable gene cassettes. A 1.7 kb integron with *dfrA17-aadA5* was most prevalent, followed by a 1.6 kb integron with *dfrA12-aadA2* and a 1.5 kb integron with *dfrA1-aadA1*. Class 2 integrons (2.5 kb in size) with the *dfrA1-sat-aadA1* cassette were also found. All the ESBL-positive isolates were examined for plasmid-mediated

**Table 2.** Characterization of *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-positive *E. coli* isolates from the equine clinic and the horseback riding centre

PFGE	Source	Strain no.	Additional AR genes and integrons <sup>a</sup>	Plasmid with <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>			
				Inc	size (kb)	RFLP <sup>b</sup>	AR genes on plasmid <sup>a</sup>
Equine clinic							
A	personnel (1), horse (1), surface (7)	L4, T4, N6, N13, N17, N29, N30 N23 N31	X X, I1a X, <i>qnrB19</i> , I1a	HI1	235	V <sub>(L4)</sub>	X
B	horse (1)	3K	X, <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , I1c	HI1	235		X
C	horse (1)	9K	X, I1c	HI1	235		X
D	horse (1)	T20	X, <i>qnrB19</i>	HI1	235	V	X
E	horse (1)	6K	X, <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	HI1	235		X
F	horse (2)	T21 T22	X X, <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>qnrS1</i> , I2	HI1	235		X
G	fly (22)	MV <sup>c</sup>	X, <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , I1c	HI1	235		X
H	surface (1)	N35	X	HI1	235		X
I	horse (1)	T14	X	HI1	235	V	X
J	horse (1)	T15	X, <i>qnrB19</i>	HI1	235		X
L	surface (2)	N33, N34	X	HI1	235		X
M	fly (1)	MV173	X	HI1	235		X
N	horse (1), surface (3), fly (1)	MV111, N36 N42 N50 T19	X, <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>qnrS1</i> , I1c, I2 X, <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>qnrB19</i> , <i>qnrS1</i> , I1c, I2 X, <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>qnrS1</i> , I2 X, <i>qnrS1</i>	HI1	235	V <sub>(N36)</sub>	X
O	surface (2), fly (1)	N39, N41, MV34	X, <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , I1c	HI1	265	V <sub>(N39, MV34)</sub>	X
P	horse (1)	T23	X, <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , I1d	HI1	235	V	X
Q	surface (1)	N10	X	HI1	235	V	X
R	surface (1), fly (1)	N44, MV105	<i>cmlA</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul3</i> , <i>aadA1</i> , I1a <sup>1</sup>	HI1	235		X
S	fly (4), wound (1)	MV38, MV117, MV153 MV128 63743	X, <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , I1b X, <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>qnrS1</i> , I1b X, <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>qnrS1</i> , I1b	HI1 HI1/X1	235 285		X X, <i>qnrS1</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>
T	fly (3)	MV48, MV113, MV130	X	HI1	235	V <sub>(MV48)</sub>	X
U	horse (1)	T10	X, <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , I1c	HI1	235	V <sup>1</sup>	X
Horseback riding centre							
a	horse (1)	KK4	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , I2	N	30	III	<i>aadA1</i>
b	horse (1)	KK5	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , I2	I1	85	IV	<i>aadA1</i>
c	horse (1)	KK6	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , I2	N	30	III	<i>aadA1</i>
d	horse (1)	KK8	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>tet(B)</i> , I2	N	30	III	<i>aadA1</i>
e	surface (1)	NK6	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , I2	N	30	III	<i>aadA1</i>
d	surface (1)	NK7	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i> , I2	N	30	III	<i>aadA1</i>
f	foal—necropsy (1)	62510	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>tet(B)</i> , I2	N	30	III	<i>aadA1</i> , <i>tet(B)</i>

Inc, incompatibility group; AR, antibiotic resistance.

<sup>a</sup>X, *catA1*, *strA*, *sul2*, *tet(B)*, I1a, *sul1*, *int1*, class 1 integron 1.6 kb: *dfrA12-aadA2*; I1a<sup>1</sup>, *int1*, *dfrA12-aadA2* (PCR for variable region of integron using 5CS-3CS primers was negative); I1b, *sul1*, *int1*, class 1 integron 1.5 kb: *dfrA1-aadA1*; I1c, *sul1*, *int1*, class 1 integron 1.7 kb: *dfrA1A17-aadA5*; I1d, *sul1*, *int1*, *dfrA1-orf-aadA5* (PCR for variable region of integron using 5CS-3CS primers was negative); I2, *int2*, class 2 integron 2 kb: *dfrA1-sat-aadA1*.

<sup>b</sup>RFLP profile determined by EcoRV and HincII digestion.

<sup>c</sup>MV1, MV3, MV16, MV17, MV18, MV20, MV26, MV37, MV39, MV46, MV47, MV49, MV50, MV70, MV95, MV96, MV125, MV131, MV155, MV171, MV174 and MV179.



**Table 3.** Characterization of *qnr*-positive *E. coli* isolates from the equine clinic

Source of the strain	<i>E. coli</i> strain	PFGE profile	<i>qnr</i> gene	Conjugation		<i>qnr</i> plasmid			
				<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	Inc group	size (kb)	RFLP	AR genes on plasmid
Horses	T15/B	J	<i>qnrB19</i>	+	+	N	40	II	
	T19/B	N	<i>qnrS1</i>	–	–	X1	45	Ia	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>
	T20/B	D	<i>qnrB19</i>	+	+	N	40	II	
	T22/B	F	<i>qnrS1</i>	+	–	X1	45	I	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>
Surface swabs	N31/B	A	<i>qnrB19</i>	–	–	NT	NT	NT	
	N36/B	N	<i>qnrS1</i>	+	+	X1	45	I	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>
	N42/B	N	<i>qnrB19</i>	+	+	N	40	II	
			<i>qnrS1</i>	–	–	X1	45	I	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>
N50/B	N	<i>qnrS1</i>	+	+	X1	45	I	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	
Flies	MV128	S	<i>qnrS1</i>	–	–	X1	45	I	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>
	MV111	N	<i>qnrS1</i>	–	–	X1	45	I	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>
Wound infection	63743	S	<i>qnrS1</i>	+	–	HI1/X1	285	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , X

NT, not tested; AR, antibiotic resistance; X, *catA1*, *strA*, *sul2*, *tet(B)*.

All of the *qnr*-positive isolates carried *bla*<sub>CTX-M-1</sub> on a 235 kb plasmid (apart from 63743).

RFLP profile determined by EcoRV and HincII digestion.

quinolone resistance genes. In 11 isolates from the stables environment ( $n=4$ ), horse faeces ( $n=4$ ), flies ( $n=2$ ) and wound infection ( $n=1$ ), the genes *qnrS1* and/or *qnrB19* were detected (Table 2).

#### Analysis of ESBL plasmids

The gene *bla*<sub>CTX-M-1</sub> was transferred to *E. coli* by conjugation, but it was not transferred to *Salmonella*. Most of the transconjugants contained a large plasmid of 235 kb in size. In the isolates of pulsotype O and pulsotype S (strain 63743 from the wound infection), respectively, larger plasmids of 265 and 285 kb in size were detected. Plasmids of all sizes belonged to the IncHI1 group, and additional antibiotic resistance genes *catA1*, *strA*, *sul2* and *tet(B)* were found to be co-located on this plasmid along with *bla*<sub>CTX-M-1</sub> using PCR. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of IncHI1 plasmids was performed only in 10 transconjugants, because of unsuccessful isolation of large plasmid DNA. Using EcoRV digestion, most plasmids showed an identical pattern ( $n=9$ , profile V) or a several band difference was found ( $n=1$ , profile V<sup>1</sup>).

#### Characterization of plasmids harbouring *qnr* genes

The transferability of the *qnr* genes was tested and the plasmids carrying the *qnr* genes were analysed in all 11 *qnr*-positive isolates (Table 3). In most of the isolates, the *qnr* genes were transferred to *E. coli* and *Salmonella* by conjugation. Chemical transformation of a *qnr*-carrying plasmid was successful in most of the isolates. The MICs of nalidixic acid and ciprofloxacin for donor strains, transconjugants and transformants are shown in Table S3 (available as Supplementary data at JAC Online). The *qnr* genes were located on plasmids of 40 or 45 kb in size. All the plasmids with *qnrB19* belonged to incompatibility group IncN and had the same RFLP profiles. Plasmids with the *qnrS1* gene

also showed the same indistinguishable RFLP profiles (in one isolate a two band difference was found of type Ia) and belonged to the IncX1 group. The gene *bla*<sub>TEM-1</sub> and a Tn3-like transposon were found to be located on this IncX1 plasmid. In the isolate from the wound infection, the *qnrS1* gene was located on a large IncHI1/X1 plasmid of 285 kb in size, together with the *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *catA1*, *strA*, *sul2* and *tet(B)* genes, although the PCR for Tn3-like transposon was negative.

#### Excretion of ESBL-producing *E. coli* in the horse faeces

Concentrations of ESBL-producing *E. coli* isolates ranged from  $8.18 \times 10^3$  to  $7.73 \times 10^6$  cfu per gram of horse faeces.

#### Horseback riding centre

##### Isolation of ESBL-producing *E. coli*

From the samples taken during the first sampling, we isolated ESBL-positive *E. coli* from faeces of four (9%) of the horses examined. These samples originated from the mother of the antibiotic-treated foals (sample no. KK6) and from the horses stabled in the neighbouring boxes (KK4, KK5 and KK8). Of 20 samples examined from the waterers, ESBL-positive *E. coli* were detected in two (10%) boxes (NK6 and NK7), one of which belonged to the mother of the antibiotic-treated foals (NK6). The following two samplings resulted in no ESBL-positive *E. coli* detection (Table 1).

##### Characterization of ESBL-producing *E. coli* isolates

All the ESBL-positive isolates were multiresistant, with resistance to five to nine of the antibiotics tested, and were positive for the *bla*<sub>TEM-1</sub> and *bla*<sub>CTX-M-1</sub> genes. The isolates belonged to phylogenetic group B1. Class 2 integrons of 2.5 kb in size with *dfrA1-sat-aadA1* gene cassettes were found in all of the isolates

(Table 2). Most of the ESBL-positive *E. coli* isolates showed unique PFGE profiles. The gene *bla*<sub>CTX-M-1</sub> was transferred to *E. coli* by conjugation, but it was not transferred to *Salmonella*. The *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene was localized on a small (30 kb) IncN plasmid ( $n=6$ ) or on an 85 kb Inc11 plasmid along with the streptomycin resistance gene *aadA1*. All the plasmids of the IncN group showed the same restriction profile. No *qnr* genes were found in these ESBL-producing *E. coli* isolates.

### Statistical analysis

The prevalence of ESBL-producing *E. coli* in horses and environmental smears at the equine clinic was significantly higher ( $P<0.001$ ) than in horses and environmental smears at the horseback riding centre.

## Discussion

We consider the common finding of ESBL-positive and fluoroquinolone-resistant isolates with plasmid-mediated *qnr* genes among *E. coli* isolates in horses at two horse facilities alarming. Cephalosporins are important antibiotics in both human and veterinary medicine. In horses, third- and fourth-generation cephalosporins are advised, with specific cautions, only for the treatment of foal septicaemia.<sup>18</sup> Our results showed that this therapeutic intervention in the riding centre implicated the excretion of ESBL-producing *E. coli* by the mother of the antibiotic-treated foals and by the horses from the neighbouring boxes, as well as the contamination of the stables environment. No ESBL-producing *E. coli* strains were detected during the following two samplings in May and June, which indicates a temporary colonization of these horses by ESBL-producing strains, probably as a result of cephalosporin selective pressure. High prevalence of antimicrobial-resistant isolates from hospital-treated horses compared with untreated and a non-hospitalized community group of horses has been documented.<sup>2</sup> High risk for faecal carriage of resistant *E. coli* in horses during hospitalization has been recently identified.<sup>19</sup> This includes a high prevalence of ESBL-producing *E. coli* in faecal samples of hospitalized horses, with a significantly increased prevalence during hospitalization compared with at time of admission. We assume that the effect of hospitalization on colonization by antibiotic-resistant bacteria in horses has also played an important role in our study. At the equine clinic, various antibiotics, including small portions of extended-spectrum cephalosporins, were used for therapy of horses. Metronidazole, sulphonamides, aminoglycosides and fluoroquinolones were the antibiotics with the highest consumption. It appears that co-selection promoted by the usage of these non- $\beta$ -lactam antibiotics is the reason for the high prevalence of multidrug-resistant ESBL isolates in horses.

The horse colon can provide an environment suitable for the survival and propagation of the causative agents for nosocomial infections.<sup>20</sup> The high concentrations of *E. coli* isolates in horse faeces detected in our study markedly increase environmental contamination and enable subsequent colonization of other species, such as flies, occurring in the contaminated environment. Our results indicate a high level of contamination of the stables environment, which affected colonization of flies by ESBL-producing *E. coli*. Such colonized flies can further serve as

vectors of resistant bacterial strains. A high prevalence of antibiotic-resistant *E. coli* strains has been observed in flies captured on cattle and pig farms.<sup>21,22</sup>

In our study, the same PFGE profiles were occasionally observed in *E. coli* from horses, environmental samples and flies, indicating a role for clonal spreading of some strains. However, the high genetic diversity observed among *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-positive *E. coli* isolated from horses, the stables environment and flies indicated that the spread of isolates harbouring the gene *bla*<sub>CTX-M-1</sub> within the equine clinic resulted not only from clonal dissemination, but that horizontal gene transfer is also involved in the dissemination of ESBL-positive *E. coli* at the equine clinic. This was confirmed by the plasmid analysis. Clonal spread of *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-positive *E. coli*, as well as horizontal gene transfer of *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, was also demonstrated at the riding centre. The same observation has been made in hospitalized horses in the UK.<sup>19</sup>

Various associations among the plasmids and  $\beta$ -lactamase genes have been observed. In the present study, *bla*<sub>CTX-M-1</sub> was harboured on conjugative plasmids of three different incompatibility groups—IncN, Inc11 and IncHI1.<sup>23,24</sup> Our study provides the first demonstration of an association between ESBL-encoding genes and large IncHI1 multiresistance plasmids. Large plasmids (usually >160 kb) of incompatibility group HI1 are important vectors of antibiotic resistance in both major causal agents of enteric fever (*Salmonella* Typhi and *Salmonella* Paratyphi A).<sup>25</sup> It has been demonstrated that these IncHI1 plasmids allow major human pathogens to acquire genes available in the environment and in the human gut, and that they are maintained by enhancing the competitive advantage of the bacterial host.<sup>26</sup> Association of IncHI1 plasmids with antibiotic resistance to chloramphenicol, tetracycline, aminoglycosides and sulphonamides, and relevant genes [*catA1*, *tet(B)*, *strA* and *sul2*] has been demonstrated.<sup>27</sup>

High prevalence of *qnr* genes has been described in *E. coli* isolates carrying other resistance determinants, such as ESBL-producing strains, probably due to co-transfer in the same genetic elements.<sup>28</sup> In our study, *qnrS1* and *qnrB19* genes carried by plasmids of the IncN and IncX1 incompatibility groups were detected in multiresistant ESBL-producing *E. coli* from horses, surface environmental samples and flies at the equine clinic. The *qnrS1* gene has been recently detected also on a 45 kb non-conjugative IncX1 plasmid in one poultry *E. coli* isolate in Italy and, similar to in our study, the *qnrS1* gene in this poultry isolate was associated with a Tn3-like transposon containing the *bla*<sub>TEM-1</sub> gene.<sup>29</sup> IncX1 plasmids have recently also been found to be associated with ESBL genes, such as *bla*<sub>TEM-52</sub>.<sup>15</sup>

This study illustrates that ESBL-producing *E. coli*, as well as plasmids carrying ESBL genes of clinical interest, can be easily transferred among horses, humans and flies living in close contact. The presence of ESBL-producing and fluoroquinolone-resistant bacteria in the horse hospital environment increases the health risk and raises essential questions about the control of nosocomial infections. The results of the presented study indicate the essential importance of infection control strategies, such as frequent hand hygiene, barrier nursing, and proper cleaning and disinfection. Such practices should minimize the spread of antibiotic-resistant bacteria as well as of mobile genetic determinants harbouring antibiotic resistance genes in a hospital environment.<sup>30</sup>



## Acknowledgements

We would like to thank George Jacoby (Lahey Clinic Inc., Burlington, MA, USA), Lina Cavaco and Henrik Hasman (National Food Institute, Copenhagen, Denmark), Ming-Gui Wang (Institute of Antibiotics, Huashan Hospital, Shanghai, People's Republic of China), and Surbhi Malhotra-Kumar (University of Antwerp, Belgium) for positive control strains. Our thanks also go to Iveta Zadrazilova for excellent laboratory work, to Milan Dolinek and Miloslav Slesinger from the horseback riding centre, and to employees of the equine clinic for their cooperation. We would like to thank the Veterinary Research Institute in Brno (Czech Republic), which provided equipment for PFGE analysis (Bio-Rad CHEF-DR).

## Funding

This work was supported by the Czech Science Foundation (grant number P502/10/P083), the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM6215712402) and the Internal Grant Agency of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno (162/2008 FVL).

## Transparency declarations

None to declare.

## Supplementary data

Tables S1, S2 and S3 are available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

## References

- 1 March A, Aschbacher R, Dhanji H *et al.* Colonization of residents and staff of a long-term-care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2009; **16**: 934–44.
- 2 Dunowska M, Morley PS, Traub-Dargatz JL *et al.* Impact of hospitalization and antimicrobial drug administration on antimicrobial susceptibility patterns of commensal *Escherichia coli* isolated from the feces of horses. *J Am Vet Med Assoc* 2006; **228**: 1909–17.
- 3 Vo AT, van Duijkeren E, Fluit AC *et al.* Characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from horses. *Vet Microbiol* 2007; **124**: 248–55.
- 4 Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M *et al.* CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007; **59**: 165–74.
- 5 Deschamps C, Clermont O, Hipeaux MC *et al.* Multiple acquisitions of CTX-M plasmids in the rare D2 genotype of *Escherichia coli* provide evidence for convergent evolution. *Microbiology* 2009; **155**: 1656–68.
- 6 Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 2009; **22**: 664–89.
- 7 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement M100-S18*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
- 8 Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; **36**: 1877–82.
- 9 Dolejska M, Cizek A, Literak I. High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from black-headed gulls in the Czech Republic. *J Appl Microbiol* 2007; **103**: 11–9.
- 10 Dolejska M, Biersova B, Kohoutova L *et al.* Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in surface water and sympatric black headed gulls. *J Appl Microbiol* 2009; **106**: 1941–50.
- 11 Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; **66**: 4555–8.
- 12 Center for Disease Control and Prevention. *One-Day (24–28 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of Escherichia coli O157:H7, non-typhoidal Salmonella serotypes, and Shigella sonnei by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)*. [http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli\\_salmonella\\_shigella\\_protocols.pdf](http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli_salmonella_shigella_protocols.pdf) (1 May 2008, date last accessed).
- 13 Olesen I, Hasman H, Aarestrup FM. Prevalence of  $\beta$ -lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microb Drug Resist* 2004; **10**: 334–40.
- 14 Birnboim HL, Doily J. A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; **7**: 1513–23.
- 15 Bergenholtz RD, Jørgensen MS, Hansen LH *et al.* Characterization of genetic determinants of extended-spectrum cephalosporinases (ESCs) in *Escherichia coli* isolates from Danish and imported poultry meat. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 207–9.
- 16 Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* 1995; **226**: 235–40.
- 17 Carattoli A, Bertini A, Villa L *et al.* Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; **63**: 219–28.
- 18 European Medicines Agency. *Revised Reflection Paper on the Use of 3rd and 4th Generation Cephalosporins in Food Producing Animals in the European Union: Development of Resistance and Impact on Human and Animal Health*. London: EMEA, 2009.
- 19 Maddox TW, Clegg PD, Pinchbeck GL *et al.* Prevalence and risk factors for faecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in hospitalised horses. In: *Abstracts of the Second ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens in Animals, Humans and the Environment, Toronto, Canada, 2010*. Abstract A183, p. 114. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- 20 House JK, Mainer-Jaime RC, Smith BP *et al.* Risk factors for nosocomial *Salmonella* infection among hospitalized horses. *J Am Vet Med Assoc* 1999; **214**: 1511–6.
- 21 Literak I, Dolejska M, Rybarikova J *et al.* Highly variable patterns of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolates from pigs, sympatric rodents, and flies. *Microb Drug Resist* 2009; **15**: 229–37.
- 22 Rybarikova J, Dolejska M, Materna D *et al.* Phenotypic and genotypic characteristics of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from symbiotic flies, cattle and sympatric insectivorous house martins from a farm in the Czech Republic (2006–2007). *Res Vet Sci* 2010; **89**: 179–83.
- 23 Moodley A, Guardabassi L. Transmission of IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 1709–11.
- 24 Marcadé G, Deschamps C, Boyd A *et al.* Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 67–71.
- 25 Hampton MD, Ward LR, Rowe B *et al.* Molecular fingerprinting of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhi. *Emerg Infect Dis* 1998; **4**: 317–20.
- 26 Dionisio F, Conceição IC, Marques AC *et al.* The evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness. *Biol Lett* 2005; **1**: 250–2.

**27** Phan MD, Kidgell C, Nair S et al. Variation in *Salmonella enterica* serovar Typhi InCHI1 plasmids during the global spread of resistant typhoid fever. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 716–27.

**28** Cavaco LM, Hansen DS, Friis-Møller A et al. First detection of plasmid-mediated quinolone resistance (*qnrA* and *qnrS1*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans in Scandinavia. *J Antimicrob Chemother* 2007; **59**: 804–5.

**29** Cerquetti M, García-Fernández A, Giufrè M et al. First report of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* in an *Escherichia coli* strain of animal origin in Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 3112–4.

**30** Bartley JM, Olmsted RN, Haas J. Current views of health care design and construction: practical implications for safer, cleaner environments. *Am J Infect Control* 2010; **38** Suppl 1: S1–12.

## Příloha 6

DOLEJSKA, M., JURCICKOVA, Z., LITERAK, I., POKLUDOVA, L., BURES, J., KOHOUTOVA, L., SMOLA, J., CIZEK, A., 2011, IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> in *Escherichia coli* isolates on a dairy farm: *Veterinary Microbiology*, v. 149, p. 513-516.

### Souhrn

---

V této studii byla zjištěna vyšší prevalence *E. coli* s ESBL v rektálních výtěrech dojnic na konvenční farmě s vysokou spotřebou cefalosporinů (39 %) v porovnání s organickou farmou bez použití této skupiny antibiotik (<1 %). U všech izolátů byla zjištěna beta-laktamáza CTX-M. Genotypizace ESBL kmenů prokázala šíření jedné dominantní linie mezi zvířaty na farmě a rovněž význam IncN plazmidů v přenosu genu *bla*<sub>CTX-M</sub> mezi nepříbuznými kmeny *E. coli*. Studie dokumentuje negativní dopady použití cefalosporinů pro terapii a prevenci mastitid na šíření producentů ESBL na úrovni farmy.





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

# Veterinary Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)

Short communication

## IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> in *Escherichia coli* isolates on a dairy farm

Monika Dolejska<sup>a,\*</sup>, Zuzana Jurcickova<sup>b,c</sup>, Ivan Literak<sup>a</sup>, Lucie Pokludova<sup>c</sup>, Jiri Bures<sup>c</sup>, Alfred Hera<sup>c</sup>, Ludmila Kohoutova<sup>b</sup>, Jiri Smola<sup>b</sup>, Alois Cizek<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Palackeho 1–3, 612 42 Brno, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Palackeho 1–3, 612 42 Brno, Czech Republic

<sup>c</sup> Institute for State Control of Veterinary Biologicals and Medicaments, Hudcova 56a, Brno 621 00, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 August 2010

Received in revised form 23 November 2010

Accepted 25 November 2010

#### Keywords:

Cephalosporins

Dairy farm

ESBL

*Escherichia coli*

Plasmids

IncN

### ABSTRACT

The aim of the study was to compare the prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* bovine isolates on a conventional dairy cattle farm with high consumption of parenteral and intramammary cephalosporins (farm A) and on an organic dairy farm with no cephalosporin use (farm B). ESBL-producing *E. coli* were isolated from rectal swabs and milk filters by selective cultivation on MacConkey agar with cefotaxime (2 mg/l). ESBL genes were identified by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing, and the genetic diversity of the isolates was determined by *Xba*I pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Conjugative transfer, incompatibility group, and restriction fragment length polymorphism (RFLP) profiles of the ESBL-carrying plasmids were studied. Higher prevalence (39%,  $n_{\text{rectal samples in cows}} = 309$ ) of CTX-M-1-producing *E. coli* isolates was found on farm A compared to farm B (<1%,  $n_{\text{rectal samples in cows}} = 154$ ; 0%,  $n_{\text{rectal samples in calves}} = 46$ ). Using PFGE, the isolates from farm A were divided into nine pulsotypes. In all ESBL-positive isolates, the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene was carried on 40 kb IncN conjugative plasmids of three related *Hinc*II restriction profiles. Horizontal gene transfer through transmission of IncN plasmids harboring *bla*<sub>CTX-M-1</sub> as well as clonal dissemination of a particular clone seems to be involved in dissemination of CTX-M-1-producing *E. coli* isolates in cows on the farm using cephalosporins in treating bacterial infections. The study demonstrates a possible role of cephalosporin use in the widespread occurrence of CTX-M-1-producing *E. coli* on the conventional dairy cattle farm compared to the organic farm.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Therapeutic use of cephalosporins in veterinary medicine may select for extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in animals, ultimately resulting in an increased risk for zoonotic transmission of ESBL-carrying bacteria and plasmids (Moodley and Guardabassi, 2009). Third generation

parenteral cephalosporins are used extensively in cattle for treating acute undifferentiated bovine pneumonia and coliform mastitis (EMA, 2009). Several compounds belonging to the third and fourth generation cephalosporins are contained in veterinary medicinal products used in the Czech Republic. Injectable products containing ceftiofur are currently authorized for the following indications in cattle: respiratory disease, interdigital necrobacillosis, and puerperal metritis. Cefoperazone is available as an intramammary suspension for mastitis indication only. Cefquinome is used for respiratory disease, interdigital necrobacillosis, severe mastitis, sepsis and other general-

\* Corresponding author. Tel.: +420 541 562 643; fax: +420 541 562 631.  
E-mail address: [m.dolejska@centrum.cz](mailto:m.dolejska@centrum.cz) (M. Dolejska).

ized infections, as well as urogenitary tract infections (EMA, 2009; USKVBL, 2010).

In this study, we investigated the occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* on two Czech dairy farms with different livestock management practices and antibiotic policies. Clonal spread and horizontal transfer of ESBL determinants were investigated by molecular characterization of ESBL-producing *E. coli* isolates from rectal swabs and milk filters obtained at the two farms.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sampling

Two dairy farms in the Czech Republic with different antibiotic policies were chosen for the study. Farm A housed 360 dairy cows and 80 calves in 2008. This was a conventional intensive farm characterized by high consumption of cephalosporin antibiotics. Ceftiofur (third generation cephalosporin) was the antibiotic with the highest frequency of use for treatment in several indications, followed by amoxicillin–clavulanic acid, cefoperazone, and a penicillin plus neomycin combination during recent years (2005–2008). For dry cow therapy, cloxacillin and cefquinome were frequently used. During 2008, a total of 69 treatment courses using ceftiofur, cefoperazone or cefquinome were recorded from a total of 132 antibiotic administrations in 43 cows. Individual treatment courses varied between 1 and 5 administrations.

Farm B housed 180 dairy cows, 80 beef cows and 50 calves in 2008. This farm was certified as an organic farm and had low antibiotic consumption. Tetracycline was the most frequently used antibiotic and was administered using an injectable product. The farm had limited individual medications. It used an oxytetracycline-containing veterinary medicinal product for administration to calves. Also administered on the farm were oxytetracycline and neomycin in combination, a streptomycin and sulphonamide combination, a penicillin and dihydrostreptomycin combination, and a cloxacillin and neomycin combination. No third and fourth generation cephalosporins were used on the farm. On both farms, the cattle turnover involved only animals born on the respective farm, as no animals were purchased from outside. Rectal swabs were collected from 309 dairy cows on farm A and 154 dairy cows and 46 calves on farm B in December 2008. Two milk filters were sampled on each farm.

### 2.2. Selective isolation and genotyping of ESBL-producing *E. coli*

Rectal swabs and milk filters were enriched in MacConkey broth and subcultivated onto MacConkey agar (MCA) containing cefotaxime (2 mg/l) for detection of presumptive ESBL-producing *E. coli*. A single colony growing on MCA with cefotaxime was subcultured and examined using the double-disk synergy test for the production of ESBL according to Clinical and Laboratory Standards Institute specifications (CLSI, 2008) and identified by API10S test kit (bioMérieux, France). Genes responsible for the ESBL phenotype (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and

*bla*<sub>CTX-M</sub>) were identified by polymerase chain reaction (PCR) as previously described (Literak et al., 2010) and further analyzed using sequencing (ABI 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA). The isolates were typed by XbaI pulsed field gel electrophoresis (PFGE) (CDC, 2002) and their relatedness was analyzed using Bionumerics (Applied Maths, Belgium).

### 2.3. Transferability of genes encoding ESBL, plasmid analysis

Transferability of ESBL genes was tested by conjugation (Literak et al., 2010). Plate-mating experiments were conducted using plasmid-free, rifampicin- and nalidixic acid-resistant *E. coli* MT102RN and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL5325 as recipients. Plasmid DNA from *E. coli* was isolated by alkaline extraction procedure (Birnboim and Doly, 1979) and introduced into competent *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen, USA). The size of the plasmid with the ESBL gene from transformants was determined by S1-PFGE. Plasmid DNA from transformants was digested with *HincII* and replicon typed (Carattoli et al., 2005).

### 2.4. Statistical analysis

All data were used to calculate the prevalence of ESBL-producing *E. coli* in cows and analyzed using chi-square test. Differences with  $p \leq 0.05$  were considered significant.

## 3. Results and discussion

Among the 309 rectal swabs from farm A, 119 (39%) were found to be positive for ESBL-producing *E. coli*. One of the two milk filters collected from this farm was also positive. In contrast, only one (<1%) of the 154 rectal swab samples from dairy cows and none of the milk filters from farm B yielded growth of ESBL-producing *E. coli*. Additional resistance to other antibiotic groups including antibiotic resistance genes were detected only in two *E. coli* isolates from cows and one isolate from a milk filter on farm A. The isolates were resistant to streptomycin, sulfonamides and tetracycline and carried the genes *strA*, *sul2* and *tetB*. Statistically higher prevalence of ESBL-producing *E. coli* isolates was detected on farm A, where third and fourth generation cephalosporins were frequently administered, in comparison to farm B, where no cephalosporins were used ( $p \leq 0.05$ ). This suggests a possible influence of cephalosporin use in the widespread occurrence of ESBL-producing *E. coli* on farm A. *In vivo* effects of veterinary cephalosporins (ceftiofur and cefquinome) on selection of CTX-M-1-producing *E. coli* have been demonstrated in pigs under experimental conditions (Cavaco et al., 2008). The results of our study of cephalosporins' effect in the natural conditions of a dairy farm are consistent with the recent study by Lanzas and Grohn (2010) evaluating the effect of intramuscular administration of ceftiofur while following the label recommendation (2.2 mg/kg/day for 5 d) on the gastrointestinal *E. coli* population in cattle. They had found that the presence of residual levels of ceftiofur in the gastrointestinal tract favored the selection and clonal dissemination of ceftiofur-resistant bacteria during treatment. As only a single conventional and a single organic

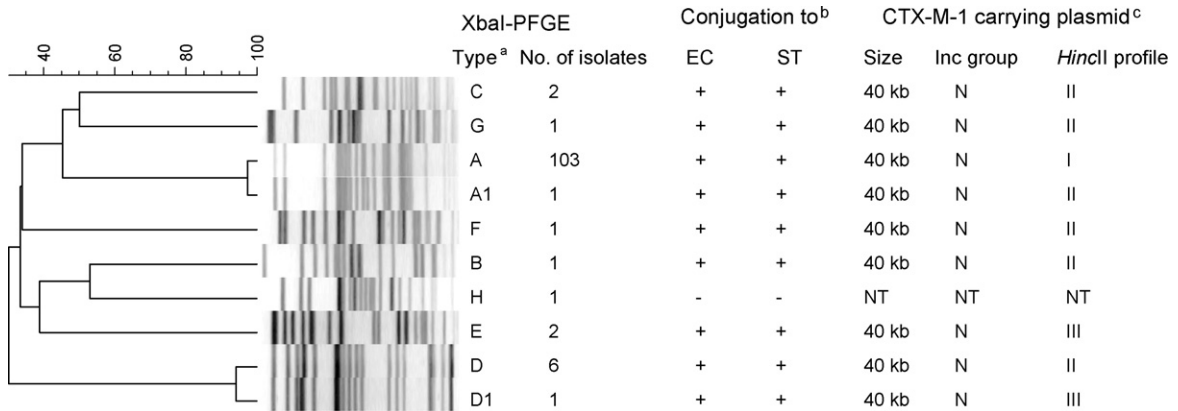


Fig. 1. PFGE analysis and molecular characterization of CTX-M-1-producing *E. coli* isolates from cows on two Czech dairy farms. Dice (Tol. 0.625%) ( $H > 0.0\%$   $S > 0.0\%$ ). <sup>a</sup>Isolates with pulsotypes A, A1, D, D1, C, G, B, E, and F originated from farm A. The isolate with pulsotype H originated from farm B. <sup>b</sup>EC, *E. coli* MT102RN; ST, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium SL5325. <sup>c</sup>NT, not tested.

farm were examined in our study, further study is needed in order to draw conclusions as to a possible role of selective pressure from cephalosporins on spreading of ESBL-producing isolates in these farms. Recently, an occurrence of ESBL-producing isolates in organic chicken egg production but not in conventional farms has been documented (Bortolaia et al., 2010). Thus, it also seems that factors other than antibiotics usage, perhaps including management practices, are involved in the spreading of ESBL isolates in food production.

The *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene was detected in the cases of all the cattle testing positive for ESBL-producing *E. coli*. The beta-lactamase CTX-M-1 has become one of the most widespread CTX-M types in animal *E. coli* isolates worldwide. This ESBL has also been isolated from diseased and healthy cattle elsewhere in Europe (Brinas et al., 2005; Meunier et al., 2006). In the Czech Republic, CTX-M-1-producing *E. coli* have been reported in poultry (Kolar et al., 2010; Dolejska et al., in press), wild birds, and mammals (Dolejska et al., 2009; Literak et al., 2010).

Using XbaI PFGE, CTX-M-1-producing *E. coli* isolates from farm A were divided into nine pulsotypes labeled A–G (Fig. 1). Most of the CTX-M-1-producing *E. coli* isolates from cows (87%, 103 positive/119 examined) belonged to the dominant pulsotype A. One isolate from a cow untypable by PFGE was excluded from further characterization. The isolate from a milk filter belonged to pulsotype E. The CTX-M-1-producing *E. coli* isolate from farm B showed a unique pulsotype (labeled H). We suppose that the dissemination of a particular clone (pulsotype A) was involved in the spread of CTX-M-1-producing *E. coli* among cows on farm A.

One randomly selected CTX-M-1-positive isolate from each of the nine pulsotype groups from farm A and the one isolate from farm B were used for conjugative transfer and CTX-M-1-carrying plasmid characterization. The *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene was transferred by conjugation to *E. coli* and *Salmonella* in all the isolates from farm A, but the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene of the isolate from farm B was located on a nonconjugative plasmid (Fig. 1). Because of the unsuccessful transfer (using conjugation and transformation) of the plasmid harboring the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene, the isolate from farm B had to be

excluded from further plasmid characterizations. In all the transformants from farm A, single 40 kb conjugative plasmids of the IncN group were detected (Fig. 1). An association between *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and IncN plasmids has also been observed in Europe among porcine (Moodley and Guardabassi, 2009), canine (Schink et al., 2010) and human *E. coli* isolates (Novais et al., 2007). IncN plasmids are broad-host-range plasmids that might contribute to the further spread of the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene among other members of Enterobacteriaceae (Novais et al., 2007).

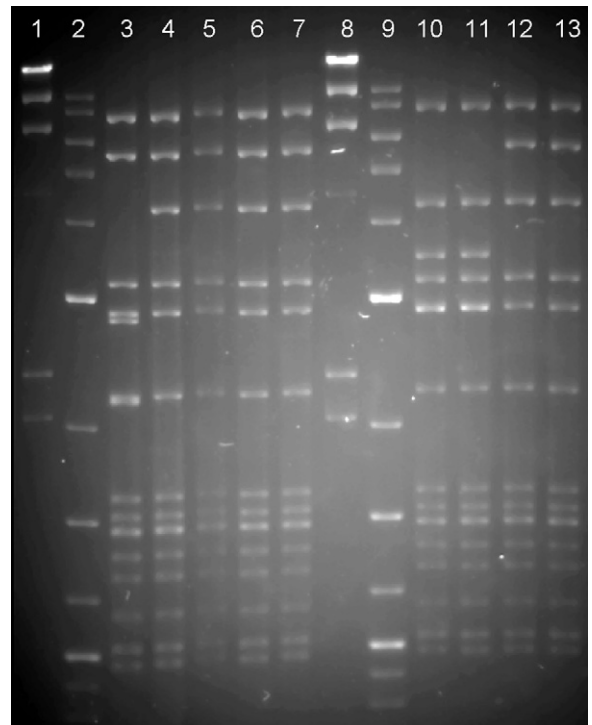


Fig. 2. RFLP analysis of plasmid DNA harboring the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene designed by HincII. Lanes 1 and 8, Lambda DNA digested with HindIII; lanes 2 and 9, DNA marker (2-log marker, New England Biolabs, UK); lane 3, RFLP type I; lanes 4–7, 12–13, RFLP type II; lanes 10 and 11, RFLP type III.



By restriction analysis of plasmid DNA using *HincII*, the IncN plasmids were divided into three groups (I–III) with small band differences (Figs. 1 and 2). As previously described (Liebana et al., 2006), plasmid analysis has indicated that horizontal transfer of these elements is a very efficient mechanism involved in the spread of CTX-M-mediated resistance at the farm. These authors had found that dissemination of CTX-M genes through IncK plasmids of undistinguishable restriction fragment length polymorphism (RFLP) profiles was involved in spreading ESBL-producing *E. coli* on a dairy farm in the United Kingdom. A role of horizontal gene transfer of *bla*<sub>CTX-M-1</sub> mediated by IncN plasmids among *E. coli* isolates associated with prophylactic use of ceftiofur in pigs has been recently described on Danish farms (Moodley and Guardabassi, 2009). We must consider a possible risk that IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, and which are typically conjugative and broad-host-range plasmids, can be transferred from commensal *E. coli* to cattle pathogens, and thus result in veterinary therapeutic problems. In addition, the findings of this study could have potential occupational health implications for cattle farmers since direct transfer of IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> has previously been described between pigs and pig farmers (Moodley and Guardabassi, 2009).

Modern, industrialized food production should accept low use of antibiotics in order to reduce selection and spreading of antibiotic-resistant bacteria. Principles of prudent use should be followed and prophylactic and off-label use (especially in terms of non-approved indications, shorter or longer duration of treatment, or inaccurate dosing) of cephalosporins should be discouraged in dairy cattle farming.

## Acknowledgements

We would like to thank to Lina Cavaco and Henrik Hasman (National Food Institute, Copenhagen, Denmark). Our thanks also go to Petra Slamova, Jana Soukupova and Marie Slavikova for excellent laboratory work, to Pavel Svec for PFGE data analysis, and to employees of both the studied cattle farms for their cooperation. Our thanks also go to the Veterinary Research Institute in Brno (Czech Republic), which provided equipment for PFGE analysis (Bio-Rad CHEF-DR). This study was funded by grant no. P502/10/P083 of the Czech Science Foundation, grant no. MSM6215712402 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, and grant IGA VFU 162/2008 FVL of the Internal Grant Agency of the university of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic. This study was also supported by project ESBL 01 of the Institute for State Control of Veterinary Biologicals and Medicaments of the Czech Republic.

## References

Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.

- Bortolonia, V., Guardabassi, L., Bisgaard, M., Larsen, J., Bojesen, A.M., 2010. *Escherichia coli* producing CTX-M-1, -2, and -9 group beta-lactamases in organic chicken egg production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3527–3528.
- Brinas, L., Moreno, M.A., Teshager, T., Saenz, Y., Porrero, M.C., Dominguez, L., Torres, C., 2005. Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1262–1264.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L., Threlfall, E.J., 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* 63, 219–228.
- Cavaco, L.M., Abatih, E., Aarestrup, F.M., Guardabassi, L., 2008. Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3612–3616.
- CDC, 2002. One-day (24–28 h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). In: The National Molecular Network for Foodborne Disease Surveillance CDCP, Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 15 pp.
- CLSI, 2008. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 8th Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Dolejska, M., Biersova, B., Kohoutova, L., Literak, I., Cizek, A., 2009. Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black headed gulls. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1941–1950.
- Dolejska, M., Duskova, E., Rybarikova, J., Janoszowska, D., Roubalova, E., Dibdakova, K., Maceckova, G., Kohoutova, L., Literak, I., Smola, J., Cizek, A., 2011. Plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from equine clinic and horseback riding centre. *J. Antimicrob. Chemother.*, doi:10.1093/jac/DKQ500.
- EMA, 2009. Revised Reflection Paper on the Use of 3rd and 4th Generation Cephalosporins in Food Producing Animals in the European Union: Development of Resistance and Impact on Human and Animal Health. European Medicines Agency, London, 37 pp.
- Kolar, M., Bardon, J., Chroma, M., Hricova, K., Stosova, T., Sauer, P., Koukalova, D., 2010. ESBL and AmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in poultry in the Czech Republic. *Vet. Med.* 55, 119–124.
- Lanzas, C., Grohn, Y.T., 2010. The effect of antimicrobial exposure on the dissemination of antimicrobial resistance among enteric commensal bacteria. In: 2nd ASM Conference. Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens in Animals, Humans and the Environment, Toronto, Canada, p. 18.
- Liebana, E., Batchelor, M., Hopkins, K.L., Clifton-Hadley, F.A., Teale, C.J., Foster, A., Barker, L., Threlfall, E.J., Davies, R.H., 2006. Longitudinal farm study of extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1630–1634.
- Literak, I., Dolejska, M., Radimersky, T., Klimes, J., Friedman, M., Aarestrup, F.M., Hasman, H., Cizek, A., 2010. Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1702–1711.
- Meunier, D., Jouy, E., Lazizzera, C., Kobisch, M., Madec, J.Y., 2006. CTX-M-1- and CTX-M-15-type beta-lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France. *Int. J. Antimicrob. Agents* 28, 402–427.
- Moodley, A., Guardabassi, L., 2009. Transmission of IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1709–1711.
- Novais, A., Canton, R., Moreira, R., Peixe, L., Baquero, F., Coque, T.M., 2007. Emergence and dissemination of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 796–799.
- Schink, A., Kadlec, K., Schwarz, S., 2010. Analysis of *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-carrying plasmids from *Escherichia coli* isolates collected in the BfT-GermVet study in Germany. In: 2nd ASM Conference. Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens in Animals, Humans and the Environment, Toronto, Canada, p. 19.
- USKVBL, 2010. Registrovane veterinarni lecive pripravky 2010 (in Czech, Authorised Veterinary Medicinal Products 2010), Ustav pro statni kontrolu veterinarnich biopreparatu a leciv. Institute for State Control of Veterinary Biologicals and Medicaments, Prion, Hradec, Hralove, Czech Republic.



## Příloha 7

LITERAK, I., PETRO, R., DOLEJSKA, M., GRUBEROVA, E., DOBIASOVA, H., PETR, J., CIZEK, A., 2011, Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy urban children of two age categories with a view to their antibiotic therapy: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, p. 3005-3007.

### Souhrn

---

V této studii byl sledován výskyt *E. coli* s rezistencí k antibiotikům ve střevě zdravých dětí různých věkových kategorií v ČR. U 36 % dětí ve věku šesti týdnů byly izolovány bakterie s rezistencí k jednomu až sedmi antibiotikům, naopak u dětí věkové kategorie 6-17 let byla prevalence 24 %. Byly prokázány kmeny *E. coli* s beta-laktamázou CTX-M-1 a genem plazmidově determinované rezistence k fluorochinolonům *qnrS1*.



## Antimicrobial Resistance in Fecal *Escherichia coli* Isolates from Healthy Urban Children of Two Age Groups in Relation to Their Antibiotic Therapy<sup>∇</sup>

Ivan Literak,<sup>1\*</sup> Radim Petro,<sup>2</sup> Monika Dolejska,<sup>1</sup> Erika Gruberova,<sup>1</sup> Hana Dobiasova,<sup>1</sup> Jan Petr,<sup>1</sup> and Alois Cizek<sup>3</sup>

Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic<sup>1</sup>; Pediatric Working Group, Karvina, Czech Republic<sup>2</sup>; and Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic<sup>3</sup>

Received 13 December 2010/Returned for modification 11 February 2011/Accepted 28 March 2011

**The study was performed in the Czech Republic during 2007 to 2009. Of *Escherichia coli* isolates from 275 children aged 6 weeks, 36% ( $n = 177$ ) were resistant to 1 to 7 antibiotics. Of isolates from 253 children aged 6 to 17 years, 24% ( $n = 205$ ) were resistant to 1 to 5 antibiotics. There was no significant difference in the prevalences of antibiotic-resistant *E. coli* isolates between these groups of children, even though the consumptions of antibiotics were quite different.**

Since the introduction of antibiotics, the resistance of human intestinal flora has become a common finding. In 1967, nonpathogenic strains of *Escherichia coli* with multiple transferable antibiotic resistances were isolated from the feces of a small number of infants in Dublin, Ireland, who had not been in hospital and had not been treated with antibiotics (7). From that time, the presence of antibiotic-resistant *E. coli* isolates among children has been studied in various countries, and it was found that *E. coli* strains colonizing healthy children in communities may be resistant far more often in some regions than in others. The aim of our work was to characterize and analyze antibiotic resistance in fecal *E. coli* strains isolated from two groups of urban children differing in age while also comparing the antibiotic practices applied for these children.

The two groups of healthy children examined were from the town of Karvina in the Czech Republic. Karvina has about 60,000 inhabitants living in an urban habitat. One group consisted of 275 children aged 6 weeks, and the other group consisted of 253 children aged 6 to 17 years. The children were examined during 2007 to 2009. Samples were taken by individual rectal swabs, which were transported to the laboratory and placed overnight in buffered peptone water at 37°C. The samples were then cultivated for *E. coli* on a chromogenic medium selective for *E. coli* and coliform bacteria (CM0956; Oxoid, United Kingdom). One colony of each plate was tested for susceptibility to 12 antimicrobial agents by the disk diffusion method as described elsewhere previously (5). For *E. coli* isolates found to be resistant to one or more of the antibiotics, PCR was used to detect specific antibiotic resistance genes, the integrase genes *int1* and *int2*, variable regions of class 1 and

class 2 integrons, and gene cassettes within class 1 and 2 integrons, as described elsewhere previously (5). The samples from buffered peptone water were enriched in MacConkey broth and subcultivated onto MacConkey agar (MCA) containing cefotaxime (2 mg liter<sup>-1</sup>) to detect *E. coli* strains with extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and subsequently onto MCA supplemented with ciprofloxacin (0.06 mg liter<sup>-1</sup>) to isolate fluoroquinolone-resistant *E. coli* isolates. These *E. coli* isolates were further characterized; specifically, the transferabilities of their ESBL and plasmid-encoded quinolone resistance genes was tested by conjugation as described elsewhere previously (1, 2). Plasmids of ESBL and quinolone-resistant strains were characterized by replicon typing and EcoRV digestion (1, 2). All *E. coli* strains were identified by using the API 10S test (bioMérieux, France).

The antibiotics given to the children throughout their lives until the time of examination were searched for by using the archives of the proper pediatricians. The pediatricians in the Czech Republic are obligated to record and archive all therapies used for children. The term “antibiotic application” was defined as one administration of a usual dosage of some antibiotic prescribed for a therapeutic or prophylactic purpose to one child. The impact of antibiotics was expressed as the total number of antibiotic applications for those children examined.

A total of 177 *E. coli* isolates were obtained from 275 children aged 6 weeks. Sixty-three (36%) isolates were resistant to 1 to 7 antibiotics (Table 1). From 253 children aged 6 to 17 years, a total of 205 *E. coli* isolates were obtained. Forty-nine (24%) isolates were resistant to 1 to 5 antibiotics. There was no significant difference in the total prevalences of antibiotic-resistant *E. coli* isolates between children aged 6 weeks and children aged 6 to 17 years. The prevalences of antibiotic-resistant *E. coli* for individual antibiotics were significantly higher for children aged 6 weeks than for children aged 6 to 17 years (applicable for ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, cephalothin, and nalidixic acid), or the differences were not significant.

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Czech Republic. Phone: 420 541 562 630. Fax: 420 541 562 631. E-mail: literaki@vfu.cz.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 4 April 2011.

TABLE 1. Prevalences of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolates from urban children of two age groups

Antibiotic	No. of resistant isolates (prevalence [%]) in children aged:		P value <sup>a</sup>
	6 wk (n = 177)	6–17 yr (n = 205)	
Ampicillin	50 (28)	34 (17)	0.0061
Tetracycline	32 (18)	25 (12)	NS
Sulfonamides	29 (16)	21 (10)	NS
Streptomycin	24 (14)	20 (10)	NS
Sulfamethoxazole-trimethoprim	13 (7)	6 (3)	0.0476
Cephalothin	10 (6)	2 (1)	0.0090
Nalidixic acid	9 (5)	3 (1)	0.0430
Chloramphenicol	7 (4)	4 (2)	NS
Amoxicillin-clavulanic acid	4 (2)	2 (1)	NS
Ciprofloxacin	1 (1)	0 (0)	NS
Gentamicin	1 (1)	0 (0)	NS
Ceftazidime	1 (1)	0 (0)	NS

<sup>a</sup> Differences in prevalences were compared by using the chi-square test and Fisher's exact test. Statistical significance is indicated at a P value of  $\leq 0.05$ . NS, not significant.

The antibiotic-resistant *E. coli* isolates from both groups of children were highly variable in their resistance patterns. The *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, and *bla*<sub>CTX-M-1</sub> genes were detected in isolates with ampicillin resistance. The only proven tetracycline resistance determinants among *E. coli* isolates resistant to tetracycline were the *tetA* and *tetB* genes. The *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes were found among the isolates resistant to sulfonamides. Resistance to streptomycin was linked to the *strA* gene and the *aadA1*, *aadA2*, and *aadA5* gene cassettes. Resistance to chloramphenicol was linked to the *cat* and *cmlA* genes. Various types of class 1 integrons (with the gene cassettes *aadA1*, *aadA2*, *dfr17*, *dfr1-aadA1*, *dfr17-aadA5*, and *dfr12-orf-aadA2*) and class 2 integrons (with *sat-aadA1*, *dhfr1-sat-aadA1*, and *estX-sat-aadA1*) were identified among the antibiotic-resistant *E. coli* isolates.

Two ESBL-producing *E. coli* isolates were obtained from one 6-week-old child and one 11-year-old child. Both isolates contained the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene. The *bla*<sub>CTX-M-1</sub> genes were localized on a 30-kb conjugative plasmid of the IncN group along with the tetracycline resistance gene *tetA* and on a 95-kb conjugative plasmid of the IncI1 group along with the class 1 integron containing the *dfr1-aadA1* gene cassettes and the *cib* gene for colicin production, respectively. Another *E. coli* isolate, from a 10-year-old child, selected using MCA with ciprofloxacin had the plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrS1*. The *qnrS1* gene was transferred by conjugation and was located on a 45-kb plasmid of the IncX1 group.

Only five antibiotic applications were recorded for children at the age of 6 weeks (Table 2). A total of 1,965 antibiotic applications were recorded for children aged 6 to 17 years. Beta-lactam antibiotics were used most frequently, followed by macrolides and sulfonamides with trimethoprim. The use of other antibiotics was exceptional.

Commensal *E. coli* strains in children represent an important reservoir of antibiotic resistance determinants. Relatively low prevalences of antibiotic-resistant *E. coli* were observed for the Czech children compared to the findings from a large

TABLE 2. Antibiotics given to the children examined during their lives up to the time of examination

Antibiotic	No. of antibiotic applications for children aged:	
	6 wk <sup>a</sup>	6–17 yr
Beta-lactams		
Penicillins (penicillin, penamercillin, phenoxymethylpenicillin, oxacillin)		491
Aminopenicillins (ampicillin, amoxicillin)		311
Aminopenicillins with beta-lactamase inhibitors (ampicillin + sulbactam, amoxicillin + clavulanic acid)	3	376
Narrow-spectrum cephalosporins (cephalexin, cefadroxil)		59
Expanded-spectrum cephalosporins (cefactor, cefprozil, cefuroxime, including axetilcefuroxime)		200
Broad-spectrum cephalosporins (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone)		5
Macrolides (erythromycin, spiramycin, roxithromycin, clarithromycin, azithromycin)	1	387
Sulfonamides, trimethoprim (sulfamethoxazole + trimethoprim, trimethoprim)		122
Aminoglycosides (neomycin, gentamicin, netilmycin)	1	5
Others (clindamycin, nitrofurantoin, vancomycin, bacitracin)		9
Total	5	1,965

<sup>a</sup> One antibiotic application means an application of a usual therapeutic dose of some antibiotic prescribed during a child's single therapeutic situation.

number of other studies on this topic, and they were in good agreement with results of one recent study from Germany (4).

At 36%, we consider the high prevalence of antibiotic-resistant *E. coli* strains in Czech children aged 6 weeks to be disturbing. These children had scarcely been exposed directly to antibiotics, and yet they were frequently colonized by antibiotic-resistant *E. coli*. The range of sources for antibiotic-resistant *E. coli* is very limited for this age group of children. The fetal intestine is sterile and bathed in swallowed amniotic fluid. Following delivery, multiple bacteria challenge the intestine of the newborn (3). Microbes from the vaginal canal and perineum enter the mouth and stomach of vaginally delivered infants, and within few minutes after birth, the gastric content of the newborn is influenced by and reflects the cervical flora of the mother. All children in our study were born in maternity hospitals with high hygienic standards. Such deliveries proceed with a physician in attendance, and during the time important for bacterial colonization of the newborns' gastrointestinal tracts, the children are in nearly exclusive contact with their mothers. Mothers and their children usually leave the maternity hospitals in the Czech Republic when the child is 4 days old, and the child must be colonized primarily at that time. We strongly believe that the sources for the colonization of 6-week-old children with antibiotic-resistant *E. coli* isolates were their mothers.

Among the children aged 6 to 17 years surveyed, there was a 24% prevalence of antibiotic-resistant *E. coli*, even though the children had been treated with antibiotics during their life-

times a total of 1,965 times. The prevalences of *E. coli* isolates resistant to tetracycline, streptomycin, and chloramphenicol were 12%, 10%, and 2%, respectively, even if no such antibiotics had been administered to these children. In the United Kingdom as well, healthy children 8 to 9 years old were shown to carry bacteria resistant to antibiotics to which children were not usually exposed (6). The authors of that study considered that bacteria resistant to ceftazidime, chloramphenicol, and tetracycline may be coselected by exposure to other antibiotics used for children or may be acquired from family members, pets, other children, or food.

The *E. coli* isolates harboring the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene, responsible for the production of ESBL, and the *qnrS1* gene have been documented for the first time in children anywhere in the world. Various associations among the plasmids and beta-lactamase genes have been observed. The associations between *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and IncN plasmids, *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and IncI1 plasmids, and *qnrS1* and IncX1 plasmids have been observed recently in the Czech Republic among human and animal *E. coli* isolates (1, 2).

This study was funded by grants MSM6215712402 from the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic; IGA69/2007/FVHE from the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno; and P502/10/P083 from the Czech Science Foundation.

#### REFERENCES

1. Dolejska, M., et al. 2011. Plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**:757–764.
2. Dolejska, M., et al. 2011. IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> in *Escherichia coli* isolates on a dairy farm. *Vet. Microbiol.* **149**:513–516.
3. Fanaro, S., R. Chierici, P. Guerrini, and V. Vigi. 2003. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr. Suppl.* **441**:48–55.
4. Lietzau, S., E. Raum, H. von Baum, R. Marre, and H. Brenner. 2007. Household contacts were key factor for children's colonization with resistant *Escherichia coli* in community setting. *J. Clin. Epidemiol.* **60**:1149–1155.
5. Literak, I., et al. 2010. Antimicrobial resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *J. Appl. Microbiol.* **108**:1702–1711.
6. Millar, M. R., et al. 2001. Carriage of antibiotic-resistant bacteria by healthy children. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**:605–610.
7. Moorhouse, E. C., and L. McKay. 1968. Hospital study of transferable drug resistance. *Br. Med. J.* **2**:741–742.



## Příloha 8

DOLEJSKA , M., MATULOVA, M., KOHOUTOVA, L., LITERAK, I., BARDON, J., CIZEK, A., 2011, Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in turkey meat production flocks in the Czech Republic: National survey reveals widespread isolates with *bla*<sub>SHV-12</sub> genes on IncFII plasmids: Letters in Applied Microbiology, v. 53, p. 271-277.

### Souhrn

---

Cílem studie bylo zjistit výskyt *E. coli* s produkcí ESBL na krůtích farmách v ČR. Ze čtyřiceti vyšetřených farem byly tyto kmeny izolovány v prostředí osmi farem (20 %). Fenotyp rezistence byl u většiny izolátů spojen s genem *bla*<sub>SHV</sub> neseným na konjugativních IncFII plazmidech. Nález izolátů s identickým genotypem a plazmidovým profilem na různých farmách ukazuje na jejich pravděpodobný společný zdroj v líhních. Cefalosporiny nejsou v ČR pro použití u drůbeže autorizovány, frekventovaný výskyt rezistence k této skupině antibiotik může ukazovat na jejich off-label použití.





ORIGINAL ARTICLE

# Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in turkey meat production farms in the Czech Republic: National survey reveals widespread isolates with *bla*<sub>SHV-12</sub> genes on IncFII plasmids

M. Dolejska<sup>1,2</sup>, M. Matulova<sup>3</sup>, L. Kohoutova<sup>3</sup>, I. Literak<sup>1,2</sup>, J. Bardon<sup>4</sup> and A. Cizek<sup>3</sup>

1 Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho, Czech Republic

2 CEITEC, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

3 Institute of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho, Brno, Czech Republic

4 State Veterinary Institute, Jakoubka ze Stribra, Olomouc, Czech Republic

## Keywords

antimicrobial resistance, extended-spectrum beta-lactamase, integron, plasmid, poultry.

## Correspondence

Monika Dolejska, Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, Palackeho 1–3, 612 42Brno, Czech Republic.  
E-mail: dolejskam@vfu.cz

2011/0412: received 11 March 2011, revised 2 June 2011 and accepted 2 June 2011

doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03099.x

## Abstract

**Aim:** The occurrence and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in the environment of turkey farms in the Czech Republic were studied.

**Methods and Results:** Extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* isolates were found on 8 (20%) of 40 turkey farms surveyed. A total of 200 environmental smears were examined, and a total of 25 ESBL-producing *E. coli* were isolated. These isolates were analysed using *Xba*I pulsed-field gel electrophoresis and divided into nine pulsotypes. Most of the isolates harboured the gene *bla*<sub>SHV-12</sub> on a 40-kb plasmid of the IncFII group with an identical *Eco*RV restriction profile. Indistinguishable or clonally related SHV-12-producing isolates belonging to the same pulsotypes were found at some unrelated farms.

**Conclusions:** Widespread occurrence of ESBL-producing *E. coli* isolates with *bla*<sub>SHV-12</sub> carried on IncFII plasmids in meat production flocks in the Czech Republic was demonstrated.

**Significance and Impact of the Study:** Results indicate vertical transmission of ESBL-producing *E. coli* within the turkey production pyramid. The study shows the risk of multiresistant ESBL-producing bacteria and antibiotic-resistance genes being transmitted to humans via the food chain.

## Introduction

Intestinal commensal enterobacteria in chickens and turkeys reared on large-scale farms are commonly under selective pressure caused by the use of antimicrobial agents to treat or prevent bacterial infections (Schwarz *et al.* 2001). Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* strains originating from poultry can be transmitted to humans both directly and via the food chain (van den Bogaard *et al.* 2001). At slaughter, poultry meat can be contaminated with antimicrobial-resistant *E. coli* from the gut of poultry carcasses. These bacteria may colonize humans

and/or may become sources of antimicrobial-resistance genes for human endogenous flora (van den Bogaard *et al.* 2001; Trobos *et al.* 2009). The use of cephalosporins in food-producing animals could be a selective factor for the appearance of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing bacteria in animals (Cavaco *et al.* 2008). Because of their critical importance for human and veterinary medicine, resistance to cephalosporins is of special interest (FAO/WHO/OIE 2007).

Some recent studies have documented frequent occurrence of ESBL-producing *E. coli* isolates in poultry (Dierikx *et al.* 2010; Randall *et al.* 2011). The aim of this

study was to characterize the ESBL-producing *E. coli* isolates in the environment of turkey farms within the Czech Republic and to analyse the antimicrobial-resistance genes responsible for the ESBL production in relation to plasmids present in isolates and their conjugative ability.

## Materials and methods

### Sampling

As of 2006, the Czech Republic had 183 registered turkey meat production flocks. A baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in these flocks was carried out by the Czech State Veterinary Authority during a 2006–2007 investigation period. Five pooled environmental faeces samples were taken from each flock. Each pooled sample, comprising faecal material taken by swab from boots of workers on the farms, was tested by an authorized laboratory in accordance with ISO 6579 (Sanco 2006). For purposes of this study, 200 samples enriched in buffered peptone water (Oxoid, UK) originating from 40 turkey meat production flocks were randomly selected and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### Isolating ESBL-producing *E. coli* and testing of resistance genes

The specimens were cultivated on MacConkey agar (MCA, Oxoid) containing cefotaxime ( $2\text{ mg l}^{-1}$ ) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h. All the isolates growing on MCA with cefotaxime were examined for the production of ESBL using the double-disc synergy test (CLSI 2008). The cultures were identified using API 10S (bioMérieux, France). Identification of *E. coli* phylogenetic groups and the presence of the *cib* gene for colicin production using primers eibF (5'-CTGAGAGAATACGGATTCC-3') and cibR (5'-CAG-AATATTGCGTTTATAGTCC-3') were performed using polymerase chain reaction (PCR) (Clermont *et al.* 2000). The genes responsible for the ESBL phenotype (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>) were identified by PCR (for the list of primers, see Literak *et al.* 2010a), and PCR products were analysed using sequencing (ABI 310 Genetic Analyser; Applied Biosystems, Foster city, CA). The antibiotic susceptibility of ESBL-producing *E. coli* isolates was tested by disc diffusion method on Mueller–Hinton agar (Oxoid) (CLSI 2008) using 12 antimicrobial substances (Literak *et al.* 2010b). In these isolates, PCR was used for detecting specific antibiotic-resistance genes, the class 1 and 2 integrase genes *int1/int2* and gene cassettes within class 1 and 2 integrons (Literak *et al.* 2010b). Isolates were also tested for plasmid-mediated quinolone-resistance genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA* and *aac*-(6')-Ib-cr by PCR (for the list of primers, see Literak *et al.* 2010a).

### Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and transferability of ESBL-resistance genes by conjugation

The isolates were typed by *Xba*I PFGE (CDC 2002). Profiles were analysed using the BioNumerics fingerprinting software (Applied Maths, Ghent, Belgium). Cluster analysis of the Dice similarity indices performed to generate a dendrogram describing the relationships among PFGE profiles. Isolates were considered to be related and to belong to the same PFGE cluster if their Dice similarity index was  $\geq 85\%$  according to Tenover's criteria ( $\leq 6$  bands of difference) (Tenover *et al.* 1995). Transferability of *bla* genes was tested by conjugation. Plate-mating experiments were performed using plasmid-free, rifampicin and sodium azide-resistant *E. coli* MT102RN and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium SL5325 as recipients (Literak *et al.* 2010b).

### Characterization of ESBL-carrying plasmids

Plasmid DNA from ESBL-producing *E. coli* was isolated by alkaline extraction procedure (Birnboim and Doly 1979). Plasmid DNA was introduced to competent *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen, Carlsbad, USA) by chemical transformation followed by the selection of transformants on BHI agar (Oxoid) supplemented with cefotaxime ( $2\text{ mg l}^{-1}$ ). The presence of the relevant *bla* gene in transformants was confirmed by PCR. The size of the plasmid with the ESBL gene from transformants was determined by S1-PFGE (Barton *et al.* 1995). Plasmids were replicon-typed as described previously (Carattoli *et al.* 2005). Plasmid DNA from transformants was digested with *Eco*RV, and the fragments were separated by gel electrophoresis in 1% agarose gel for 16 h at 67 V/cm.

## Results

### ESBL-producing *E. coli* characterization

A total of 25 ESBL-producing *E. coli* isolates were isolated from the 200 pooled samples examined (Table 1). ESBL-producing *E. coli* isolates originated from 8 (20%) of 40 turkey farms surveyed. ESBL production was associated with the presence of *bla*<sub>SHV-12</sub> gene in 23 of the 25 *E. coli* isolates, while the remaining two ESBL-positive isolates contained *bla*<sub>CTX-M-1</sub> or *bla*<sub>CTX-M-14</sub>. Most isolates belonged to phylogenetic groups A and B1. The isolate with *bla*<sub>CTX-M-14</sub> belonged to group D. The gene *cib* for colicin Ib production was found in 15 ESBL-producing isolates. Resistance to additional antibiotic groups was detected (Table 1). Resistance to nalidixic acid and ciprofloxacin was most prevalent, even if no plasmid-mediated

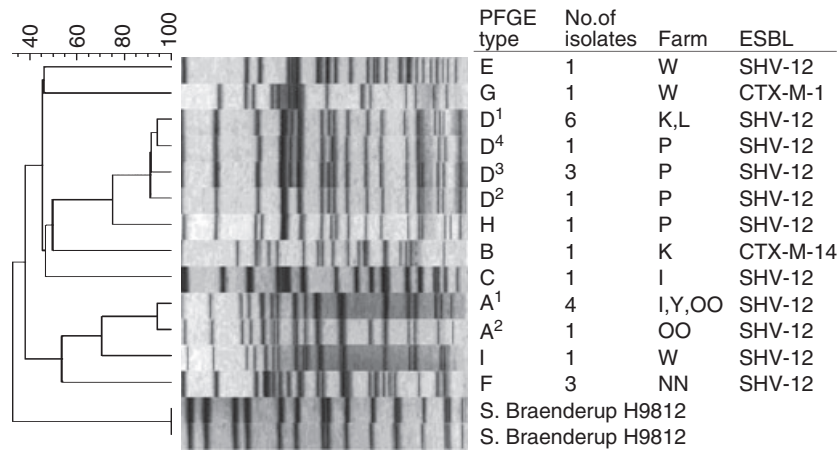
**Table 1** Characterization of ESBL-producing *E. coli* isolates from turkey farms in the Czech Republic

Farm	PFGE type	No. of isolates	ESBL type	Additional resistance*	Additional antibiotic-resistance genes and integrons, gene for colicin production ( <i>cib</i> )	Phylogenetic group	Plasmid harbouring ESBL gene†				
							EC	ST	Size (kb)	Inc	
											Conjugation
I	A <sup>1</sup>	1	SHV-12	CipNaSuSxt	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>strA</i> , <i>sul2</i> , <i>cib</i>	A	-	-	40	FII	I
	C	1	SHV-12	T	<i>tetB</i> , <i>cib</i>	B1	+	+	40	FII	I
K	D <sup>1</sup>	4	SHV-12		<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>cib</i>	B1	+	+	40	FII	I
		1	SHV-12		<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>cib</i>		+	+	130	FII-11	II
B		1	CTX-M-14	CipNaSuSxtT	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetD</i> , <i>int1</i> , integron 1-7 kb: <i>aadA1</i>	D	+	+	60	FII	III
L	D <sup>1</sup>	1	SHV-12		<i>cib</i>	B1	+	+	40	FII	I
P	D <sup>2</sup>	1	SHV-12			B1	-	-	40	FII	I
	D <sup>3</sup>	3	SHV-12			B1	-	-	40	FII	I
	D <sup>4</sup>	1	SHV-12		<i>cib</i>	B1	-	-	40	FII	I
	H	1	SHV-12		<i>cib</i>	B1	+	+	40	FII	I
W	E	1	SHV-12	CipNa		B1	+	+	40	FII	I
	I	1	SHV-12			A	-	-	40	FII	I
	G	1	CTX-M-1	CipGnNaSuSxtT	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>catA1</i> , <i>strA</i> , <i>sul1</i> , <i>tetA</i> , <i>int1</i> , integron 1-6 kb: <i>dfrA1</i> - <i>aadA1</i> , <i>cib</i>	A	-	+	NT	NT	NT
Y	A <sup>1</sup>	1	SHV-12	CipNaSuSxtT	<i>sul1</i> , <i>tetA</i> , <i>cib</i>	A	-	-	40	FII	I
NN	F	3	SHV-12	CipNa		A	+	-	40	FII	I
OO	A <sup>1</sup>	1	SHV-12	CipNaSuSxtT	<i>sul1</i> , <i>tetA</i> , <i>cib</i>	A	-	-	40	FII	I
		1	SHV-12	CipNa	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>cib</i>		-	-	40	FII	I
	A <sup>2</sup>	1	SHV-12	CipNaSuSxtT	<i>sul1</i> , <i>tetA</i> , <i>int1</i> , integron 1-6 kb: <i>dfrA1</i> - <i>aadA1</i> , <i>cib</i>	A	-	-	40	FII	I

ESBL, extended-spectrum beta-lactamase; PFGE, Pulsed-field gel electrophoresis.

\*Cip, ciprofloxacin; Gn, gentamicin; Na, nalidixic acid; S, streptomycin; Su, sulfonamides compound; Sxt, sulfamethoxazole-trimethoprim; T, tetracycline.

†EC, *Escherichia coli* MT102RN; ST, *Salmonella* Typhimurium SL5325; Inc Incompatibility group; EcoRV, restriction profiles designed by plasmid DNA digestion by enzyme EcoRV; NT, plasmid harbouring *bla*<sub>CTX-M-1</sub> was not typed because of unsuccessful transformation and conjugation of single CTX-M-1 plasmid to recipient cells.



**Figure 1** Pulsed-field gel electrophoresis analysis of ESBL-producing *E. coli* isolates from turkey farms in the Czech Republic.

quinolone-resistance genes were detected. Five multiresistant *E. coli* isolates also contained a class 1 integron, which is 1.6 kb in size with *dfr1-aadA1* gene cassettes (4 isolates) or 1.7 kb in size with the *aadA1* gene cassette. Class 2 integrons were not detected.

#### Macrorestriction profile analysis

Using PFGE, the 25 ESBL-producing *E. coli* isolates from eight farms were divided into nine different groups using letters A–I based on their *Xba*I macrorestriction profiles (Fig. 1). Clonally related isolates (defined as having 85–90% similarity of PFGE profiles) were detected and marked by index numbers. Dissemination of some pulsotypes (A, D, F) inside one farm was also demonstrated. Interestingly, indistinguishable or clonally related SHV-12-producing isolates belonging to pulsotypes A and D were detected in three unrelated farms.

#### Plasmid profiling

In 22 SHV-12-producing *E. coli* isolates of seven different pulsotypes, the gene *bla*<sub>SHV-12</sub> was located on a plasmid 40 kb in size belonging to incompatibility group FII (Table 1). All the plasmids showed the same *Eco*RV restriction profiles. In most of the strains, conjugative transfer of SHV-12-harbouring plasmids to *E. coli* and/or *Salmonella* was demonstrated. Transfer of additional resistance genes together with ESBL genes was not detected. In one isolate, a large 130-kb plasmid carrying the *bla*<sub>SHV-12</sub> gene was found. Surprisingly, two positive PCRs during replicon typing showed that the gene *bla*<sub>SHV-12</sub> was probably located on a fused FII-II plasmid. In a CTX-M-14-producing isolate, a conjugative IncFII plasmid 60 kb in size with unique *Eco*RV restriction profile was also detected.

#### Discussion

We report a widespread occurrence of ESBL-producing *E. coli* isolates in meat production flocks in the Czech Republic. Presence of ESBL-producing *E. coli* in turkey farms had been studied also by Randall *et al.* (2011), who had isolated CTX-M-carrying *E. coli* from 5% of turkey meat production farms and 7% of turkey breeder farms in Great Britain. The frequency of ESBL-producing *E. coli*'s occurrence at chicken farms or slaughterhouses in various European countries has been shown to range from 10 to 40% (Blanc *et al.* 2006; Machado *et al.* 2008; Costa *et al.* 2009; Dierikx *et al.* 2010).

SHV-12- as well as CTX-M-1-producing *E. coli* were recently found in poultry at slaughterhouses in the Czech Republic (Kolar *et al.* 2010). Similarly to the situation in the Czech Republic, isolates with SHV-12 were recently dominant among ESBL-producing *E. coli* and *Salmonella* isolates from poultry in Italy (Chiaretto *et al.* 2008; Bortolaia *et al.* 2010). The ESBL genes have been frequently observed among *E. coli* belonging to the phylogenetic groups B1 and A, which are associated with animal or human commensal *E. coli* strains (Clermont *et al.* 2000). We also detected one CTX-M-14-producing *E. coli* strain from phylogenetic group D, however, which is associated with extraintestinal human infection (Mora *et al.* 2011). To our knowledge, this is the first detection of an *E. coli* strain with CTX-M-14 in the Czech Republic. CTX-M-14 has been identified as most frequent in poultry farms in Spain and the UK (Briñas *et al.* 2005; Blanc *et al.* 2006; Randall *et al.* 2011). Isolates with CTX-M-14 also have been increasingly found in human clinical *E. coli* isolates in various European countries in recent years (Coque *et al.* 2008).

We attributed the presence of *E. coli* isolates of the same pulsotypes from different farms to contamination of

the turkey production pyramid. We have learned that turkey eggs or 1-day-old turkey chicks upon which the turkey broiler production in these Czech farms was based had been bought from the same foreign producer. Antimicrobial practice in the production pyramid of this supplier is unknown. Our hypothesis is supported by the results of a recent Italian study in which dissemination of genetically identical clones of ESBL-producing *E. coli* in different poultry farms has been demonstrated even though no cephalosporins were used on those farms (Bortolaia *et al.* 2010).

The wide distribution of ESBL-positive *E. coli* among faecal isolates of healthy food-producing animals presents a food safety problem, and it is important to analyse the factors that could contribute to this situation (Costa *et al.* 2009). The major factor selecting for antibiotic-resistant bacteria is antibiotic use, and of additional importance are the high concentration and poor sanitation that are typical for intense poultry farming (van den Bogaard *et al.* 2001). The use of cephalosporins in food-producing animals could be a selective factor for the appearance of ESBL-containing bacteria in animals, and this has been previously documented (Cavaco *et al.* 2008; Dolejska *et al.* 2011). Ceftiofur use in chickens has resulted in ESBL-based cephalosporin resistance in salmonellae from chickens, and these resistant bacteria have subsequently infected humans (Dutil *et al.* 2010). Ceftiofur was previously authorized for injection of day-old chickens to prevent septicaemia, but there are currently no cephalosporin-containing products authorized for the use in poultry species within the EU (thus including the Czech Republic). Off-label *in ovo* use of ceftiofur and prophylactic use of cephalosporins in day-old chickens have been reported at chicken hatcheries in North America and Europe (EMA 2009; Dutil *et al.* 2010). No cephalosporins were administered on turkey farms in the Czech Republic during the course of the study (Lucie Pokludova from the Institute for State Control of Veterinary Biologicals and Medicaments in the Czech Republic, personal communication).

The clonal diversity of isolates with *bla*<sub>SHV-12</sub> carried by IncFII plasmids suggests that horizontal gene transmission may have contributed to the recent spread of these variants in the country. Recently, it has been documented that both the genes *bla*<sub>SHV-12</sub> and *bla*<sub>CTX-M-14</sub> can be located on plasmids of different Inc groups including II, FII, FIB, K, A/C and HI2 in both human and animal isolates (Carattoli 2009). IncF plasmids are usually conjugative with narrow host range specificity, and they are well adapted for *E. coli*.

Taking into account that no cephalosporins are administered in turkey production within the Czech Republic and that we do not know the antimicrobial practice in

the producer of turkey eggs or 1-day-old chicks, we considered also another hypothesis to explain the presence of ESBL-producing *E. coli* isolates on Czech turkey farms. In that, some of the ESBL-producing *E. coli* isolates harboured also a wide variety of other antimicrobial-resistance genes, and there exists the possibility of coselection owing to the use of nonbeta-lactams. Tetracyclines, penicillins, macrolides, quinolones, diterpenes and sulfonamides are the antibiotics most frequently used on turkey farms in the Czech Republic (Lucie Pokludova, personal communication) and may help to coselect isolates resistant to both old-generation antimicrobials and cephalosporins. However, most *E. coli* isolates produced SHV-12 and did not harbour other antibiotic-resistance genes; thus, our first hypothesis of dissemination of genetically identical clones in turkey production pyramid from a foreign producer seems more likely.

These results indicate vertical transmission of ESBL-producing *E. coli* within the turkey production pyramid. A colonization of turkey breeding lines of primary flocks acquired from the same producer was regarded as the reason for widespread occurrence of these isolates within the turkey broiler production system in the Czech Republic. The risk of multiresistant ESBL-producing bacteria being transmitted to humans via the food chain, including through turkey meat, should be evaluated. Monitoring of ESBL-producing enterobacteria should be continued at various levels (animals, human, and environment), while investigating the factors that contribute to their selection and dissemination.

## Acknowledgements

This study was funded by the Czech Science Foundation (P502/10/P083), the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM6215712402), the Internal Grant Agency of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic (162/2008 FVL) and the project "CEITEC—Central European Institute of Technology" (CZ.1.0511.1.00102.0068) from the European Regional Development Fund. We thank Lenka Slowiczzkova, Simona Krepelova, Katerina Dibdakova and Marie Slavikova for excellent laboratory work. Our thanks also go to Lucie Pokludova from the Institute for State Control of Veterinary Biologicals and Medicaments, Brno, Czech Republic for providing data on antimicrobial practice in poultry in the Czech Republic and European Union. Our thank goes to Henrik Hasman and Lina Cavaco from the National Food Institute, Copenhagen, Denmark for providing control strains, to Department of Food and Feed Safety, Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic and Czech Collection of Microorganisms, Brno, Czech Republic, for PFGE analysis.



## References

- Barton, B.M., Harding, G.P. and Zuccarelli, A.J. (1995) A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* **226**, 235–240.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513–1523.
- Blanc, V., Mesa, R., Saco, M., Lavilla, S., Prats, G., Miró, E., Navarro, F., Cortés, P. *et al.* (2006) ESBL- and plasmidic class C  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Vet Microbiol* **118**, 299–304.
- van den Bogaard, A.E., London, N., Drissen, C. and Stobberingh, E.E. (2001) Antibiotic resistance of fecal *E. coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemother* **47**, 763–771.
- Bortolaia, V., Guardabassi, L., Trevisani, M., Bisgaard, M., Venturi, L. and Bojesen, A.M. (2010) High diversity of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from Italian broiler flocks. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 1623–1626.
- Briñas, L., Moreno, M.A., Teshager, T., Sáenz, Y., Porrero, M.C., Domínguez, L. and Torres, C. (2005) Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1262–1264.
- Carattoli, A. (2009) Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 2227–2238.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L. and Threlfall, E.J. (2005) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* **63**, 219–228.
- Cavaco, L.M., Abitith, E., Aarestrup, F.M. and Guardabassi, L. (2008) Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 3612–3616.
- CDC (2002). *One-day (24–28 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of Escherichia coli O157:H7, Non-Typhoidal Salmonella Serotypes, and Shigella Sonnei by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)*. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA: The National Molecular Network for Foodborne Disease Surveillance CDCP, 15 p.
- Chiaretto, G., Zavagnin, P., Bettini, F., Mancin, M., Minorello, C., Saccardin, C. and Ricci, A. (2008) Extended spectrum  $\beta$ -lactamase SHV-12-producing *Salmonella* from poultry. *Vet Microbiol* **128**, 406–413.
- Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E. (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4555–4558.
- CLSI (2008). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 8th Informational Supplement*. CLSI, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Coque, T.M., Baquero, F. and Canton, R. (2008) Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance* **13**, 1–11.
- Costa, D., Vinué, L., Poeta, P., Coelho, A.C., Matos, M., Sáenz, Y., Somalo, S., Zarazaga, M. *et al.* (2009) Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Vet Microbiol* **138**, 339–344.
- Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., Veldman, K., Smith, H. and Mevius, D. (2010) Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet Microbiol* **145**, 273–278.
- Dolejska, M., Jurcickova, Z., Literak, I., Pokludova, L., Bures, J., Hera, A., Kohoutova, L., Smola, J. *et al.* (2011) IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> in *Escherichia coli* isolates on a dairy farm. *Vet Microbiol* **149**, 513–516.
- Util, L., Irwin, R., Finley, R., Ng, L.K., Avery, B., Boerlin, P., Bourgault, A.M., Cole, L. *et al.* (2010) Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerg Infect Dis* **14**, 48–54.
- EMA (2009) *Revised Reflection Paper on the use of 3rd and 4th Generation Cephalosporins in Food-Producing Animals in the European Union: Development of Resistance and Impact on Human and Animal Health*. London: European Medicines Agency.
- FAO/WHO/OIE (2007) Joint FAO/WHO/OIE expert meeting on critically important antimicrobials. 2008. Report of a meeting held in FAO, Rome, Italy, 26–30 November 2007. FAO, Rome, Italy and WHO, Geneva, Switzerland.
- Kolar, M., Bardon, J., Chroma, M., Hricova, K., Stosova, T., Sauer, P. and Koukalova, D. (2010) ESBL and AmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in poultry in the Czech Republic. *Vet Med* **55**, 119–124.
- Literak, I., Dolejska, M., Janoszowska, D., Hrusakova, J., Meissner, W., Rzycka, H., Bzoma, S. and Cizek, A. (2010a) Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. *Appl Environ Microbiol* **76**, 8126–8134.
- Literak, I., Dolejska, M., Radimersky, T., Klimes, J., Friedman, M., Aarestrup, F.M., Hasman, H. and Cizek, A. (2010b) Antimicrobial resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *J Appl Microbiol* **108**, 1702–1711.
- Machado, E., Coque, T.M., Cantón, R., Sousa, J.C. and Peixe, L. (2008) Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among Enterobacteriaceae isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *J Antimicrob Chemother* **6**, 296–302.
- Mora, A., Blanco, M., López, C., Mamani, R., Blanco, J.E., Alonso, M.P., García-Garrote, F., Dahbi, G. *et al.* (2011) Emergence of clonal groups O1:HNM-D-ST59, O15:H1-

- D-ST393, O20:H34/HNM-D-ST354, O25b:H4-B2-ST131 and ONT:H21,42-B1-ST101 among CTX-M-14-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Galicia, northwest Spain. *Int J Antimicrob Agents* **37**, 16–21.
- Randall, L.P., Clouting, C., Horton, R.A., Coldham, N.G., Wu, G., Clifton-Hadley, F.A., Davies, R.H. and Teale, C.J. (2011) Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. *J Antimicrob Chemother* **66**, 86–95.
- Sanco, D.G. (2006) European Commission Directorate General for Health and Consumer Affairs. Baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in flocks of turkeys in the European Union: Technical specifications. SANCO/2083/2006. Working document. Available at: [http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/tech\\_spec\\_sanco-2083-2006\\_rev1\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/tech_spec_sanco-2083-2006_rev1_en.pdf) (accessed 18 July 2006).
- Schwarz, S., Kehrenberg, C. and Walsh, T.R. (2001) Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimicrob Agents* **17**, 431–437.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. and Swaminathan, B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**, 2233–2239.
- Trobos, M., Lester, C.H., Olsen, J.E., Frimodt-Møller, N. and Hammerum, A.M. (2009) Natural transfer of sulphonamide and ampicillin resistance between *Escherichia coli* residing in the human intestine. *J Antimicrob Chemother* **63**, 80–86.





## Příloha 9

DOLEJSKA, M., FLOREK, M., FLORKOVA, P., JAMBOROVA, I., PURGERTOVA, M., KUTILOVA, I., CIZEK, A., GUENTHER, S., LITERAK, I., 2011, CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, p. 2784-2790.

### Souhrn

---

V rámci této studie byl sledován výskyt enterobakterií rezistentních k cefalosporinům ve vzorcích přečištěné odpadní vody odebrané na odtoku z brněnské Čistírny odpadních vod. Tři čtvrtiny vyšetřených vzorků obsahovaly kmeny s produkcí ESBL, nejčastěji CTX-M-15. Jedná se o první studii, která upozorňuje na riziko šíření pandemického multirezistentního kmene *E. coli* B2-O25b-ST131 do vodního prostředí. Výsledky zároveň dokumentují nedostatečnou funkčnost procesu čištění v odstranění některých patogenních a rezistentních bakterií.



## CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents

Monika Dolejska<sup>1,2\*</sup>, Petra Frolkova<sup>1</sup>, Magdalena Florek<sup>1,3</sup>, Ivana Jamborova<sup>1</sup>, Michaela Purgertova<sup>1</sup>, Iva Kutilova<sup>1</sup>, Alois Cizek<sup>2,4</sup>, Sebastian Guenther<sup>5</sup> and Ivan Literak<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic; <sup>2</sup>CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic; <sup>3</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, C.K. Norwida 30, 50-375 Wrocław, Poland; <sup>4</sup>Institute of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic; <sup>5</sup>Institute of Microbiology and Epizootics, Veterinary Faculty, Free University Berlin, Philippstr. 13, 10115 Berlin, Germany

\*Corresponding author. Tel: +420-541-562-643; Fax: +420-541-562-631; E-mail: m.dolejska@centrum.cz

Received 29 July 2011; returned 3 August 2011; revised 10 August 2011; accepted 11 August 2011

**Objectives:** The global occurrence of antibiotic resistance genes in bacteria in water environments is an increasing concern. Treated wastewater was sampled daily over a 45 day period from the outflow of a municipal wastewater treatment plant in Brno, Czech Republic, and examined for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing bacteria.

**Methods:** Water samples were cultivated on MacConkey agar with cefotaxime (2 mg/L) and individual colonies were examined for ESBL production. Phenotypic ESBL-positive bacteria identified as *Escherichia coli* or *Klebsiella* spp. were tested for the presence of antibiotic resistance genes, the virulence gene *afa/dra* and the *bla*<sub>CTX-M</sub> upstream region. Genetic relatedness was analysed by PFGE, multilocus sequence typing and plasmid analysis.

**Results:** A total of 68 ESBL-producing Enterobacteriaceae isolates were detected in 34 out of 45 wastewater samples. ESBL-producing isolates included 26 *E. coli* isolates, 4 *Klebsiella pneumoniae* isolates and 1 *Klebsiella oxytoca* isolate. The pandemic and multiresistant B2-O25b-ST131 clone was predominant, being detected among 19 *E. coli* isolates, and 17 of the B2-O25b-ST131 isolates were positive for the FIA replicon and the *afa/dra* operon and had an IS26 element flanking *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Seventeen of the B2-O25b-ST131 isolates showed closely related PFGE profiles (defined by 84% band similarity) and belonged to identical clonal groups.

**Conclusions:** The results highlight the inadequacy of the treatment process in removing multiresistant bacteria from municipal wastewater and point to a risk of transmission of clinically important multiresistant strains, such as the pandemic ST131 clone, to the environment. This is the first study demonstrating the pandemic ST131 clone in wastewater.

**Keywords:** antibiotic resistance, MLST, plasmids

### Introduction

The global occurrence of antibiotic resistance genes in bacteria in water environments is an increasing concern. Microorganisms that carry genes encoding resistance to a broad range of antibiotics have been found in hospital wastewater and animal production wastewater as well as in sewage, wastewater treatment plant (WWTP) effluents, surface water, river water, groundwater and drinking water.<sup>1</sup> Aquatic environments are described as natural reservoirs of antibiotic-resistant bacteria, and WWTPs are among the

leading water reservoirs of these microorganisms.<sup>2</sup> Conditions such as pH, temperature, nutrient concentration and high bacterial biomass, favouring close contact of bacterial cells, make WWTPs ideal locations for gene transfer and the spread of resistance. In addition, the presence of antibiotics and their metabolites in sewage may promote both the selection of resistant strains and the horizontal transfer of antibiotic resistance genes.<sup>3</sup>

Wastewater treatment does not eliminate all pathogens and resistant bacteria.<sup>2</sup> Consequently, introducing treated wastewater effluents into natural water resources escalates the risk

of human exposure to resistant bacteria via drinking water systems<sup>4</sup> and the dissemination of these strains into wildlife.<sup>4</sup>

Emerging extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing and fluoroquinolone-resistant bacteria have become a main issue in current human medicine. In 2008, worldwide pandemic spread of *Escherichia coli* sequence type (ST) 131, which produces CTX-M  $\beta$ -lactamase and is resistant to fluoroquinolones, was identified.<sup>5</sup> The clone belongs to pathogenic group B2 and mainly causes urinary tract infections in humans. Strains of this ST harbour a broad range of virulence and resistance genes on a transferable plasmid, most of which are of the IncF group.<sup>6</sup> While broad distribution has been demonstrated among antimicrobial-resistant *E. coli* from humans<sup>7</sup> our knowledge of the dissemination of ST131 remains limited.

The aim of this study was to isolate ESBL-producing and plasmid-mediated fluoroquinolone-resistant bacteria from treated water at a municipal WWTP with particular attention to *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae*. To our knowledge, this was the first study investigating the occurrence of the multiresistant epidemiological uropathogenic clone *E. coli* B2-O25b-ST131 in municipal wastewater.

## Materials and methods

### Sampling

The municipal WWTP used for this study is situated in Brno, the second largest city in the Czech Republic, with a population of about 400 000. The WWTP is a two-stage facility using a combined mechanical and biological treatment process with anaerobic sludge stabilization. It serves most districts of the city and its suburban areas, including several hospitals and long-term care facilities. Treated wastewater was sampled at the outflow of the WWTP, from which the effluents go directly into the Svatka River. The water samples were taken daily (except weekends) over a 45 day period between 26 November 2008 and 2 February 2009. The samples were taken using the Moore swab method.<sup>8</sup> The cotton swabs were exposed to the water effluents for 24 h, after which the swabs were collected, placed into sterile bags, then transported to the laboratory.

### Isolation of ESBL-producing Enterobacteriaceae and antibiotic susceptibility testing

Wastewater samples diluted to  $10^{-3}$  were cultured on MacConkey agar (MCA; Oxoid, UK) with cefotaxime (2 mg/L) to isolate ESBL-producing bacteria. All colonies showing differing morphology were selected from each plate, identified using the API 10S test kit (bioMérieux, France) and tested for ESBL production by the double-disc synergy test and for susceptibility to 12 antimicrobial agents according to the CLSI method,<sup>9</sup> as described previously.<sup>10</sup> Colonies identified as *E. coli* or *Klebsiella* spp. were further characterized.

### Antibiotic resistance gene testing

PCR and sequencing were used to test for the presence of *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>OXA</sub> genes in the ESBL-positive *E. coli* and *Klebsiella* spp. isolates.<sup>11</sup> Isolates resistant to additional antibiotics (aminoglycosides, chloramphenicol, sulphonamides and tetracycline) were tested for selected antibiotic resistance genes by PCR. For a list of primers and positive controls see Table S1 (available as Supplementary data at JAC Online). Isolates were screened for the presence of integrons; the genes *int1* and *int2*, the variable region of the class 1 integron, the variable region of the class 2 integron and the gene cassettes *dfr1*, *dfr12*, *dfr17*, *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *estX* and *sat1/2* were tested for by PCR

(Table S1). MICs of ciprofloxacin and nalidixic acid were determined for all strains using the CLSI agar dilution method<sup>9</sup> and strains were tested for the plasmid-mediated quinolone resistance genes *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* and *qnrS* by PCR and sequencing.<sup>10</sup>

### Upstream region of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes

The genetic context of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes was investigated by testing for the presence of and linkage with sequences previously reported to be associated with the CTX-M group genes, such as upstream regions *ISEcp1* and *IS26*. PCR and sequencing using previously described primers were employed to investigate these surrounding regions. The *ISEcp1* region was searched using *ISEcp1* 5' primer (5'-TTCAAAAAGCATAATCAAAGCC-3')<sup>12</sup> binding in the 5' region of *ISEcp1* and using *ISEcp1* UP primer (5'-AAAAATGATTGAAAGGTGGT3')<sup>13</sup> binding to the transposase gene *tnpA* of *ISEcp1*, located in the immediate *bla*<sub>CTX-M</sub> upstream region. The presence of *IS26* linked to *bla*<sub>CTX-M</sub> was tested using *tnpA* *IS26* primer (5'-AGCGGTAATCGTGGAGTGA-3')<sup>12</sup> recognizing the transposase gene of the *IS26* element. All primers were used in combination with reverse primer CTX-M-RJ (5'-AGCGGCACACTTCTAAC-3'), recognizing the 5' region of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes.<sup>14</sup>

### Phenotypic and molecular typing methods

Identification of *E. coli* phylogenetic groups was performed using a multiplex PCR assay.<sup>15</sup> All isolates were subjected to serotyping.<sup>16</sup> Allele-specific PCR was performed to identify the O25-ST131 clone of *E. coli*.<sup>17</sup> The presence of replicons was tested by multiplex PCR.<sup>18</sup> *E. coli* and *Klebsiella* spp. isolates were typed by XbaI PFGE.<sup>19</sup> Profiles were analysed using BioNumerics fingerprinting software (Applied Maths, Belgium). Cluster analysis of the Dice similarity indices was done to generate a dendrogram describing the relationships among PFGE profiles. Isolates were considered to be related and to belong to the same PFGE cluster if their Dice similarity index was  $\geq 80\%$ . Multilocus sequence typing (MLST) was carried out as described previously.<sup>20</sup> Gene amplification and sequencing were performed using primers specified at the *E. coli* MLST web site (<http://mlst.ucc.ie/mlst/mlst/dbs/Ecoli>). Sequences were analysed using the software package Ridom SeqSphere 0.9.19 (<http://www3.ridom.de/seqsphere>) and STs were computed automatically. MLST typing of *K. pneumoniae* strains was performed using the Institute Pasteur (Paris, France) scheme.<sup>21</sup>

### Conjugation and transformation experiments

Conjugative transfer of ESBL genes was tested. Plate-mating experiments were performed using plasmid-free, rifampicin- and sodium azide-resistant *E. coli* and *Salmonella* recipients.<sup>22</sup> The strains were grown to the exponential phase and then mixed (1:1), and 500  $\mu$ L of the donor and recipient mixture was incubated using a bacteriological filter on the surface of Luria-Bertani (LB) agar at 37°C overnight. Transconjugants were selected on LB agar supplemented with rifampicin, nalidixic acid and cefotaxime. Plasmid DNA from *E. coli* was isolated by the alkaline extraction procedure<sup>23</sup> and introduced to competent *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen, USA) by chemical transformation followed by selection of transformants on LB agar (Difco, USA) supplemented with cefotaxime (2 mg/L). The presence of the relevant *bla* gene in transformants and transconjugants was confirmed by PCR. Co-transfer of other antibiotic resistance genes during transformation and conjugation was tested by the disc diffusion test followed by PCR.

### Plasmid characterization

The size of plasmids with ESBL genes from transformants or transconjugants was determined by S1-PFGE.<sup>24</sup> Plasmid DNA from transformants or transconjugants was digested with EcoRV, followed by gel electrophoresis in 1% agarose gel for 16 h at 67 V/cm. Plasmids were replicon typed.<sup>18,25</sup>

Plasmids belonging to incompatibility group FIIK were typed using a plasmid MLST scheme.<sup>25</sup>

## Results

### Isolation of cefotaxime-resistant and ESBL-producing Enterobacteriaceae

Forty-five water samples were taken between November 2008 and February 2009. A total of 114 cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolates were obtained by incubation on MCA with cefotaxime (2 mg/L). Apart from resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics, cefotaxime-resistant isolates showed resistance to nalidixic acid (90% of the isolates), followed by resistance to ampicillin/clavulanic acid and sulphonamides (46%), ciprofloxacin (45%), tetracycline (44%), sulfamethoxazole/trimethoprim (39%), streptomycin (27%), gentamicin (12%) and chloramphenicol (10%). ESBL production was detected in 68 (60%) Enterobacteriaceae isolates. At least one ESBL-producing isolate was detected in 34 (76%) out of 45 wastewater samples. ESBL producers included 26 isolates of *E. coli*, 4 isolates of *K. pneumoniae* and 1 isolate of *Klebsiella oxytoca*.

### Determination of phenotypic and genotypic resistance in *E. coli* isolates

From the total of 26 ESBL-producing *E. coli* isolates, the gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> was detected in 23 (88%) isolates, while *bla*<sub>CTX-M-14b</sub> and *bla*<sub>CTX-M-1</sub> were detected in 1 and 2 isolates, respectively. All the isolates were multiresistant (resistant to two or more antibiotic groups); resistance to nalidixic acid and ciprofloxacin was the most prevalent (26 isolates), followed by sulphonamides (21), sulfamethoxazole/trimethoprim (19), tetracycline (19) and streptomycin (8) (Figure 1). In 21 isolates, the MIC of nalidixic acid was >256 mg/L and that of ciprofloxacin was >8 mg/L. Corresponding antibiotic resistance genes were detected using PCR, revealing that resistance to sulphonamides was connected mainly with the gene *sul1* (16 isolates). Only one isolate contained the gene *sul2*, and the combination of *sul1* and *sul2* was found in four isolates. Resistance to tetracycline was connected with the presence of the gene *tet(A)*. Most ESBL-producing isolates also contained *bla*<sub>OXA-1</sub> and the *aac(6')-Ib-cr* aminoglycoside-quinolone resistance gene.

Class 1 and class 2 integrons were detected in 23 ESBL-producing *E. coli*. Class 1 integrons 1.7 kb in size with *dfr17-aadA5* gene cassettes were the most common, being found in 19 isolates. Two isolates contained a 2.5 kb integron with *dfr17-aadA5* or an integron 1 kb in size containing the *aadA1* gene cassette. Class 2 integrons 2.5 kb in size and containing a *dfr1-sat-aadA1* gene cassette were detected in two of the isolates.

### Phylogenetic grouping and O typing

Twenty of the CTX-M-producing isolates belonged to phylogenetic group B2. Isolates of A (four isolates) and D (two) phylogenetic groups were also detected. Nineteen isolates of the B2 group were typed as O25 by serotyping. Allele-specific PCR confirmed the presence of the *rfbO25b* locus in these isolates, showing that all of them belonged to the O25b type. Another

four isolates belonged to the O55 (one), O101 (two) and O153 (one) serotypes and three isolates were not typeable by standard agglutination tests.

### PFGE analysis and MLST

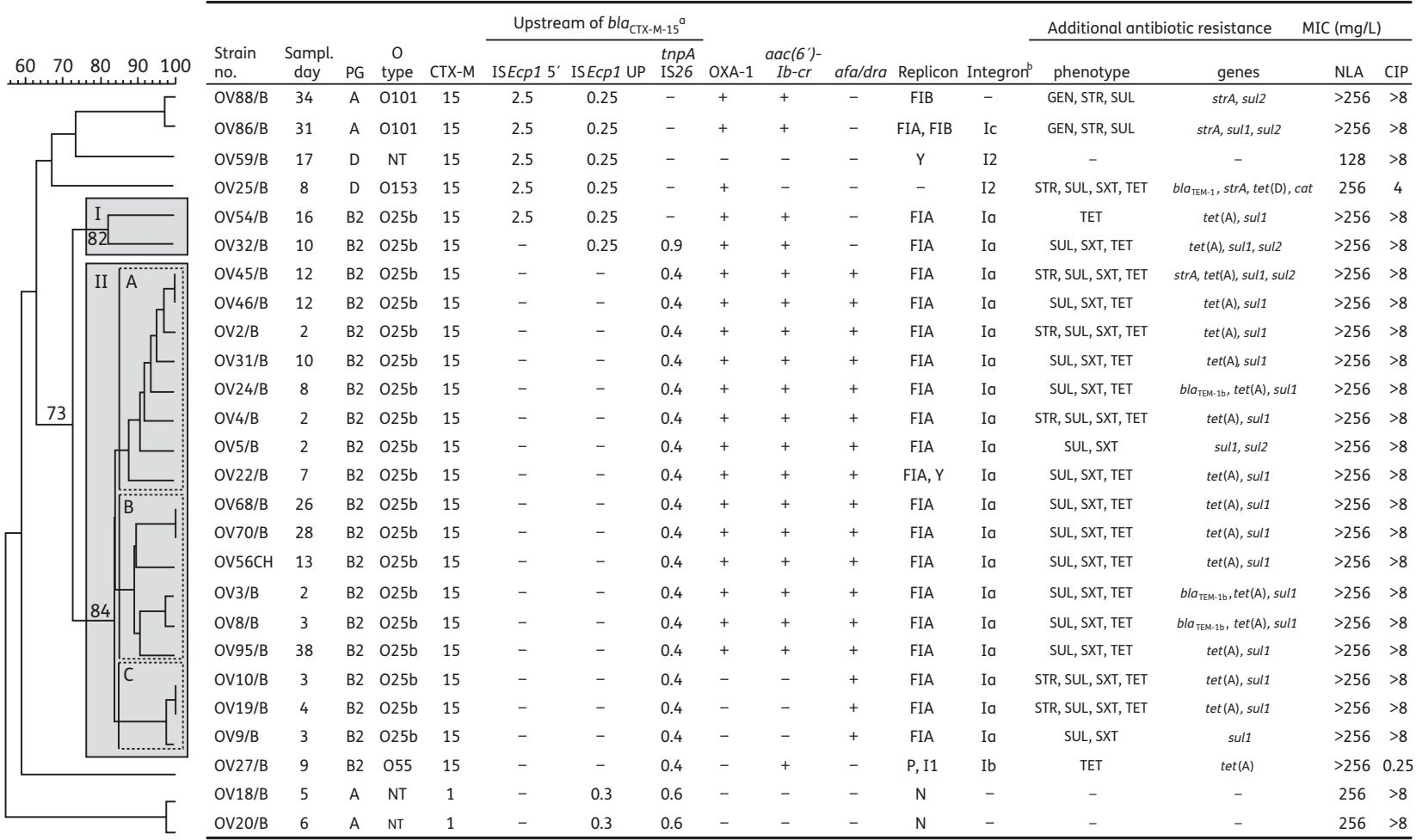
Cluster analysis of macrorestriction patterns was performed on all 26 ESBL-producing *E. coli* isolates. Nineteen CTX-M-15-producing B2-O25b *E. coli* isolates revealed two main clusters, I and II, at a genetic linkage of 73% (Figure 1). Cluster I consisted of just two isolates and both of them differed from cluster II in the absence of the *afa/dra* operon and different constitutions of the upstream region of *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Isolates belonging to cluster II shared 84% banding pattern similarity. Three PFGE groups, A–C, were found inside cluster II. Group A comprised eight isolates with genetic linkage of 88%, group B comprised six isolates with 89% band similarity, and group C comprised three isolates with 98% band similarity. All 17 B2-O25b *E. coli* isolates from cluster II were positive for the *afa/dra* operon and contained an integron 1.7 kb in size with *dfr17-aadA5* gene cassettes, and the IS26 element was found upstream of *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. The isolates from groups A and B both carried *aac(6')-Ib-cr* and *bla*<sub>OXA-1</sub> genes, whereas isolates from group C were negative for these genes. MLST analysis in all isolates from cluster I and five selected isolates from cluster II showed that they belonged to the epidemiologically important clone ST131.

### Plasmids associated with *bla*<sub>CTX-M</sub> in *E. coli*

From a total of 26 CTX-M-producing isolates, conjugation to *E. coli* and/or *Salmonella* was demonstrated only in 4. Transconjugants to *E. coli* and *Salmonella* were obtained from one ST131 strain (OV54/B). In this strain, the gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> was located on a 140 kb IncFIA conjugative plasmid together with *aac(6')-Ib-cr*, *bla*<sub>OXA-1</sub> and *tet(A)* genes. Another transconjugant was obtained from a B2-O101 isolate (OV86/B), where the gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> was harboured by a 120 kb FIB plasmid along with *aac(6')-Ib-cr* and *bla*<sub>OXA-1</sub> genes. The two CTX-M-1-positive isolates showing related PFGE profiles (OV9/B, OV10/B) conjugated to *E. coli* and *Salmonella*, and 40 kb IncN plasmids of identical HincII profiles were found in these isolates. No transconjugants were obtained from CTX-M-15-producing B2-O25b-ST131 isolates of cluster II. Chemical transformation of B2-O25b-ST131 isolates was successful only in isolate OV22/B from cluster II, where a 95 kb plasmid of IncFIA with *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *aac(6')-Ib-cr*, *bla*<sub>OXA-1</sub> and *tet(A)* genes was found. This OV22/B transformant showed an IncF plasmid EcoRV profile related to the OV54/B transconjugant.

### ESBL-producing *Klebsiella* spp.

Four ESBL-producing *K. pneumoniae* and one *K. oxytoca* were isolated (Table 1). All isolates were multiresistant and produced CTX-M-15, and *ISEcp1* was identified upstream of *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. The XbaI PFGE profile of each *K. pneumoniae* isolate was unique except that two isolates, OV17/B and OV28/B, showed only one band difference. Using MLST, *K. pneumoniae* isolates were identified as ST14 (one isolate), ST321 (two isolates) and ST323 (one isolate). Conjugative transfer of ESBL plasmids to



**Figure 1.** Characterization of 26 ESBL-producing *E. coli* isolates from a WWTP. The dendrogram consists of two main PFGE clusters, I and II, with genetic relatedness of 73%; cluster II contains three groups of isolates, named A, B and C, with 84% band similarity. PG, phylogenetic group; O type, serotype of *E. coli* determined by conventional serotyping and/or PCR; NT, not typeable; GEN, gentamicin; STR, streptomycin; SUL, sulphonamides; SXT, sulfamethoxazole/trimethoprim; TET, tetracycline; NAL, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin. <sup>a</sup>ISEcp1 5', linkage between the 5' region of ISEcp1 and *bla*<sub>CTX-M</sub>; ISEcp1 UP, linkage between ISEcp1 and *bla*<sub>CTX-M</sub> using forward primer for transposase gene of ISEcp1 and reverse primer for *bla*<sub>CTX-M</sub>; *tnpA* IS26, linkage between IS26 and *bla*<sub>CTX-M</sub>. <sup>b</sup>Ia, class 1 integron 1.7 kb: *dfr17-aadA5*; Ib, class 1 integron 1 kb: *aadA1*; Ic, class 1 integron 2.5 kb: *dfr17-sat-aadA1*.



**Table 1.** CTX-M-15-carrying plasmids from *E. coli* and *Klebsiella* isolates from a WWTP

Strain no.	Donor strain					Plasmid				
	species	PG	O type	MLST	CTX-M	Inc	RFLP	size (kb)	additional antibiotic resistance genes	
OV18/B.tc	<i>E. coli</i>	A	NT	ND	1	N	I	40	—	
OV20/B.tc	<i>E. coli</i>	A	NT	ND	1	N	I	40	—	
OV22/B.tf	<i>E. coli</i>	B2	O25b	ST131	15	FIA	IIa	95	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac</i> (6′)-Ib-cr, <i>tet</i> (A)	
OV54/B.tc	<i>E. coli</i>	B2	O25b	ST131	15	FIA	Iib	140	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac</i> (6′)-Ib-cr, <i>tet</i> (A)	
OV86/B.tc	<i>E. coli</i>	B2	O101	ND	15	FIB	III	120	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac</i> (6′)-Ib-cr	
OV17/B.tf	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND	ST321	15	FIIK	V	110	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>strA</i> , <i>tet</i> (A), <i>aac</i> (6′)-Ib-cr, <i>aac</i> (3′)-II, <i>qnrB1</i>	
OV28/B.tf	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND	ST321	15	FIIK	V	110	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>strA</i> , <i>tet</i> (A), <i>aac</i> (6′)-Ib-cr, <i>aac</i> (3′)-II, <i>qnrB1</i>	
OV60/B.tf	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND	ST323	15	FIIK	V	110	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>strA</i> , <i>tet</i> (A), <i>aac</i> (6′)-Ib-cr, <i>aac</i> (3′)-II, <i>qnrB1</i>	
OV88/B.tc	<i>K. oxytoca</i>	ND	ND	ND	15	FIA/FIB	IV	130	—	

tc, transconjugant; tf, transformant; PG, phylogenetic group; O type, serotype of *E. coli* determined by conventional serotyping and/or PCR; NT, not typeable; ND, not determined; Inc, plasmid incompatibility group; RFLP, restriction fragment length polymorphism profile of plasmid DNA using EcoRV or HincII.

*E. coli* and/or *Salmonella* was demonstrated. Characterization of ESBL-carrying plasmids showed the presence of *bla*<sub>CTX-M-15</sub> on a 110 kb IncFIIK conjugative plasmid in the *K. pneumoniae* isolates. Multiple antibiotic resistance genes [*bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *strA*, *tet*(A), *aac*(6′)-Ib-cr, *aac*(3′)-II and *qnrB1*] were located on this FIIK plasmid together with *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. FIIK plasmids showed related EcoRV profiles. The nucleotide sequence of the *copA* gene of all FIIK plasmids was identical and showed a novel allele. The sequence of the new *copA* gene allele differed from those of alleles K3 (AJ009980) and K5 (FJ628167) (available at <http://pubmlst.org/plasmid/>) at one and two nucleotides, respectively, and has been assigned to the allele K6. In the transformant of the *K. oxytoca* isolate, OV88/B, the gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> was found on a 130 kb conjugative plasmid of the FIA/FIB incompatibility group. No other antibiotic resistance genes were found on this plasmid.

### Upstream region of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes

PCR using different primer combinations identified the insertion sequence *ISEcp1*, entirely or partially truncated, upstream of the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene in eight isolates (Figure 1). PCR using the *ISEcp1* 5′ primer showed a 2.5 kb fragment of the entire *ISEcp1* in four non-ST131 *E. coli* isolates and one ST131 (OV54/B) *E. coli* isolate as well as in all *Klebsiella* isolates. The upstream region of *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in all ST131 isolates from cluster II, analysed by PCR, contained the transposase gene of the insertion sequence IS26. However, PCR with the *ISEcp1* 5′ primer as well as a primer binding to the *tnpA* gene of *ISEcp1* were negative. As confirmed by sequencing, these strains had IS26 flanking a partially truncated *ISEcp1*, thus separating the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> from its usual promoter. Two CTX-M-1-positive isolates (OV18/B, OV20/B) and one ST131 isolate (OV32/B) also showed the presence of IS26 disrupted by *ISEcp1* at a different position compared with isolates from cluster II and not separating *bla*<sub>CTX-M-15</sub> from its promoter. Both CTX-M-1-positive isolates had a 48 bp region (W sequence) upstream of the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene and an additional 32 bp X sequence, as observed in a previous sequence reported in the GenBank database (accession no. AM003904). The CTX-M-15-positive *E. coli* and *Klebsiella* isolates

were characterized by the presence of only the 48 bp W sequence, as previously described (AM040707).

### Discussion

Human sewage represents an important source of pathogenic and antibiotic-resistant bacteria and of antibiotic residues in the environment. We documented the frequent presence of bacteria of the Enterobacteriaceae with emerging resistance mechanisms in treated water from a municipal WWTP. There are only a few reports on the isolation of ESBL-producing bacteria from wastewater ecosystems.<sup>26</sup>

The presence of low concentrations of antibiotics in WWTPs has been documented,<sup>27</sup> and these antibiotics may exert selective pressure favouring resistant strains. Cephalosporins and fluoroquinolones hold the third and fourth positions on the European antibiotics market and their use is tending to increase.<sup>28</sup> They are extracted into the urine and discharged into hospital and municipal wastewater.<sup>29</sup> Fluoroquinolones, trimethoprim and sulphonamides have been found to be poorly removed during wastewater treatment<sup>30,31</sup> and therefore might exert selective pressure on bacteria within the sewage plant.

Using sequencing and MLST analysis, we found that 73% of CTX-M-15, phylogroup B2 *E. coli* strains corresponded to the worldwide emerging O25b-ST131 clonal group. This clone was detected in almost 25% of treated wastewater samples during the 45 day sampling period. Recently, ST131, O25:H4 and phylogenetic group B2 were shown to characterize the major clone (88% of total) among CTX-M-15-producing *E. coli* isolates in Europe, Asia and North America.<sup>32</sup> To our knowledge, this is the first evidence of this emerging multiresistant clone in municipal wastewater. The multiresistant CTX-M-producing ST131 clone has recently been isolated from river water in the UK,<sup>33</sup> probably resulting from significant influx of raw sewage contamination. This provides evidence of the survival of the ST131 clone in river water and its potential further dissemination into the environment and wildlife.

Association of IS26 and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in the ST131 clone has been observed previously.<sup>34</sup> The *afa/dra* operon is a virulence

gene encoding Dr family adhesins found in diffusely adhering *E. coli* strains, including CTX-M-15-producing O25b-ST131 clones.<sup>35</sup> In our study, IS26 linked to the gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> as well as the *afa/dra* operon were found in all the ST131 strains from the dominant cluster II. CTX-M-15-producing O25b-ST131 *E. coli* clones with the *afa/dra* operon and IS26 element flanking *bla*<sub>CTX-M-15</sub> have been isolated from human urinary tract infections in Spain.<sup>34</sup> Interestingly, *E. coli* isolates from cluster II/PFGE group A exhibited PFGE patterns closely related (having one- and two-band differences) to a human B2-O25b-ST131 CTX-M-15-producing, *afa/dra* operon-positive strain, DSM22664, representing the human pandemic virulent group of clonally related strains isolated from a case of bloody enteritis in Germany.<sup>32,35</sup> It seems that this diffusely adhering ST131 clone with IS26 flanking *bla*<sub>CTX-M-15</sub> is successfully spreading in the human population as well as in companion animals in some European countries.<sup>35</sup>

Interestingly, all ST131 *E. coli* isolates in our study harboured an FIA plasmid. Other studies also show that the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in ST131 clones is not only located on FII plasmids but also on plasmids of the FI incompatibility group.<sup>35,36</sup> It has been demonstrated that a temperature of 20°C is more conducive than 37°C (the temperature used in our study) to the transfer of resistance plasmids between *E. coli* strains contained in river water in the laboratory,<sup>37</sup> which may explain the low level of conjugative transfer of FIA plasmids in ST131 clones observed in our study. Nevertheless, plasmid analysis of one transconjugant and one transformant of two ST131 strains showed the presence of *bla*<sub>CTX-M-15</sub> on multiresistance plasmids along with *bla*<sub>OXA-1</sub>, aminoglycoside-fluoroquinolone gene *aac(6′)-Ib-cr* and the tetracycline resistance determinant *tet(A)*. Association of *bla*<sub>CTX-M-15</sub> with these antibiotic resistance genes present on IncF plasmids is well documented.<sup>6</sup> Both the CTX-M-1-positive isolates from WWTP harboured the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene on a conjugative plasmid of incompatibility group N. It is noteworthy that IncN plasmids with related restriction fragment length polymorphism profiles of plasmid DNA have been isolated from CTX-M-1-producing animal and human *E. coli* strains in the Czech Republic.<sup>11,38,39</sup>

In our study, four CTX-M-15-producing *K. pneumoniae* strains of three different MLST STs (ST14, ST321 and ST323) were isolated from treated wastewater and all the isolates harboured large FIIK plasmids with multiple antibiotic resistance genes and conjugative ability to *E. coli*. These FIIK plasmids identified in *Klebsiella* are mostly regarded as virulence plasmids.<sup>25</sup> Association of *bla*<sub>CTX-M-15</sub> with IncFIIK has recently been documented and a high capacity for these plasmids to diffuse and persist over time has been suggested.<sup>40</sup> IncFII plasmids harbouring the CTX-M-15 gene and associated with multiple resistance genes [*bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *tet(A)*, *aac(6′)-Ib-cr* and *aac(3)-II*], as found in *Klebsiella* isolates in our study, have been found previously also in mainly human *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates from different continents, thus demonstrating their worldwide dissemination.<sup>41,42</sup> To our knowledge, this is the first study documenting these multiple antibiotic resistance elements on FIIK plasmids. The differences in the presence of particular antibiotic resistance genes in our plasmids compared with other studies suggest new genetic rearrangements. The results highlight the evolution of IncF plasmids into new variants containing novel antibiotic resistance elements. Further studies are needed to examine the dissemination of FIIK multiple resistance plasmids and their role in spreading ESBL and

quinolone resistance genes in Enterobacteriaceae in the Czech Republic and elsewhere.

This study demonstrated the insufficient effect of the treatment process in removing bacteria harbouring antibiotic resistance, increased survival of specific multiresistant clones, such as CTX-M-15-producing *E. coli* ST131, and the risk of transmitting clinically important antibiotic-resistant strains into the environment through municipal wastewater. Further studies are needed to understand the dissemination of ST131 pandemic clones in water ecosystems and their impact on human health.

## Acknowledgements

We would like to thank Lucie Novakova, Simona Krepelova, Petra Slamova, Daniela Kohutova, Eva Suchanova and Marie Slavikova for excellent laboratory cooperation. Our thanks go to Pavel Alexa (Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic) for serotyping of *E. coli*, to Henrik Hasman and Lina Cavaco (National Food Institute, Copenhagen, Denmark) and Alessandra Carattoli (Istituto Superior di Sanita, Rome, Italy) for positive control strains, to Pavel Svec (Czech Collection of Microorganisms, Brno, Czech Republic) for help with PFGE analysis and to Jan Kyzlink from the WWTP in Brno, Czech Republic. This publication made use of the Plasmid MLST web site (<http://pubmlst.org/plasmid/>) developed by Keith Jolley and sited at the University of Oxford.

## Funding

This study was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM6215712402), the Czech Science Foundation (P502/10/P083) and the project ‘CEITEC - Central European Institute of Technology’ (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) of the European Regional Development Fund.

## Transparency declarations

None to declare.

## Supplementary data

Table S1 is available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

## References

- Zhang X, Zhang T, Fang HHP. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009; **82**: 397–414.
- Ferreira da Silva M, Vaz-Moreira I, Gonzalez-Pajuelo M *et al.* Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol* 2007; **60**: 166–76.
- Andersen SR. Effects of waste water treatment on the species composition and antibiotic resistance of coliform bacteria. *Curr Microbiol* 1993; **26**: 97–103.
- Guenther S, Grobbel M, Beutlich J *et al.* Detection of pandemic B2-O25-ST131 *Escherichia coli* harbouring the CTX-M-9 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase type in a feral urban brown rat (*Rattus norvegicus*). *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 582–4.
- Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 1–14.



- 6 Woodford N, Carattoli A, Karisik E et al. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 4472–82.
- 7 Naseer U, Sundsfjord A. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb Drug Resist* 2011; **17**: 83–97.
- 8 Moore B. The detection of paratyphoid carriers in towns by means of sewage examination. *Mon Bull Minist Health Public Health Lab Serv* 1948; **9**: 72–8.
- 9 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement M100-S18*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
- 10 Literak I, Dolejska M, Janoszowska D et al. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea coast of Poland. *Appl Environ Microbiol* 2010; **76**: 8126–34.
- 11 Dolejska M, Duskova E, Rybarikova J et al. Plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 757–64.
- 12 Eckert C, Gautier V, Arlet G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**: 14–23.
- 13 Eckert C, Gautier V, Saladin-Allard M et al. Dissemination of CTX-M-type  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 1249–55.
- 14 Diestra K, Juan C, Curiao T et al. Characterization of plasmids encoding *bla*<sub>ESBL</sub> and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 60–6.
- 15 Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; **66**: 4555–8.
- 16 Salajka E, Salajkova Z, Alexa P et al. Colonization factor different from K88, K99, F41 and 987P in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from postweaning diarrhea in pigs. *Vet Microbiol* 1992; **32**: 163–75.
- 17 Clermont O, Dhanji H, Upton M et al. Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 274–7.
- 18 Carattoli A, Bertini A, Villa L et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; **63**: 219–28.
- 19 *One-Day (24–28 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of Escherichia coli O157:H7, non-typhoidal Salmonella serotypes, and Shigella sonnei by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)*. [http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli\\_salmonella\\_shigella\\_protocols.pdf](http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli_salmonella_shigella_protocols.pdf) (1 May 2008, date last accessed).
- 20 Wirth T, Falush D, Lan R et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 2006; **60**: 1136–51.
- 21 Diancourt L, Passet V, Verhoef J et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4178–82.
- 22 Olesen I, Hasman H, Aarestrup FM. Prevalence of  $\beta$ -lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microb Drug Resist* 2004; **10**: 334–40.
- 23 Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; **7**: 1513–23.
- 24 Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* 1995; **226**: 235–40.
- 25 Villa L, Garcia-Fernandez A, Fortini D et al. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 2518–29.
- 26 Reinthaler FF, Feierl G, Galler H et al. ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Res* 2010; **44**: 1981–5.
- 27 Watkinson AJ, Micalizzi GB, Graham GM et al. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in wastewaters, surface waters, and oysters from an urban riverine system. *Appl Environ Microbiol* 2007; **73**: 5667–70.
- 28 Sande-Bruinsma N, Grundmann H, Verloo D et al. Antimicrobial drug use and resistance in Europe. *Emerg Infect Dis* 2008; **14**: 1722–30.
- 29 Lindberg R, Jarnheimer P, Olsen B et al. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere* 2004; **57**: 1479–88.
- 30 Gobel A, Thomsen A, McCardell CS et al. Extraction and determination of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in sewage sludge. *J Chromatogr A* 2005; **1085**: 179–89.
- 31 Golet EM, Strehler A, Alder AC et al. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. *Anal Chem* 2002; **74**: 5455–62.
- 32 Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 273–81.
- 33 Dhanji H, Murphy NM, Akhigbe C et al. Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from UK river water. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 512–6.
- 34 Oteo J, Orden B, Bautista V et al. CTX-M-15-producing urinary *Escherichia coli* O25b-ST131-phylogroup B2 has acquired resistance to fosfomycin. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 712–7.
- 35 Ewers C, Grobbel M, Stamm I et al. Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 651–60.
- 36 Gonullu N, Aktas Z, Kayacan CB et al. Dissemination of CTX-M-15  $\beta$ -lactamase genes carried on Inc FI and FII plasmids among clinical isolates of *Escherichia coli* in a university hospital in Istanbul, Turkey. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 1110–2.
- 37 Grabow WO, Prozesky OW. Drug resistance of coliform bacteria in hospital and city sewage. *Antimicrob Agents Chemother* 1973; **3**: 175–80.
- 38 Dolejska M, Jurcickova Z, Literak I et al. IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> in *Escherichia coli* isolates on a dairy farm. *Vet Microbiol* 2011; **149**: 513–6.
- 39 Literak I, Petro R, Dolejska M et al. Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy urban children of two age groups in relation to their antibiotic therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 3005–7.
- 40 Coelho A, González-Lopez JJ, Miro E et al. Characterisation of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: plasmid diversity and chromosomal integration. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **36**: 73–8.
- 41 Ruiz E, Rojo-Bezarez B, Sáenz Y et al. Outbreak caused by a multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain of new sequence type ST341 carrying new genetic environments of *aac(6′)-Ib-cr* and *qnrS1* genes in a neonatal intensive care unit in Spain. *Int J Med Microbiol* 2010; **300**: 464–9.
- 42 Karisik E, Ellington MJ, Pike R et al. Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15  $\beta$ -lactamases from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 2006; **58**: 665–8.



## Příloha 10

TAUSOVA, D., DOLEJSKA, M., CIZEK, A., HANUSOVA, L., HRUSAKOVA, J., SVOBODA, O., CAMLIK, G., LITERAK, I., 2012, *Escherichia coli* with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and plasmid mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, p. 1103-1107.

### Souhrn

---

Studie dokumentuje bakterie s klinicky významnou rezistencí k cefalosporinům a fluorochinolonům u vodních ptáků (kachna divoká a kormorán velký) ze Slovenské a České republiky. U izolátů byly detekovány geny kódující beta-laktamázy CTX-M-15 a CTX-M-27 a geny *qnrS* a *aac(6′)-Ib-cr* pro sníženou citlivost k fluorochinolonům, které byly nesený epidemickými plazmidy z různých inkompatibilních skupin.



## *Escherichia coli* with extended-spectrum $\beta$ -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe

Dagmar Tausova<sup>1</sup>, Monika Dolejska<sup>1,2</sup>, Alois Cizek<sup>2,3</sup>, Ladislava Hanusova<sup>1</sup>, Jolana Hrusakova<sup>1</sup>, Ondrej Svoboda<sup>1</sup>, Gaspar Camlik<sup>4</sup> and Ivan Literak<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1–3, 612 42 Brno, Czech Republic; <sup>2</sup>CEITEC—Central European Institute of Technology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1–3, 612 42 Brno, Czech Republic; <sup>3</sup>Department of Infectious Diseases and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1–3, 612 42 Brno, Czech Republic; <sup>4</sup>Lipinska 835, 696 42 Vracov, Czech Republic

\*Corresponding author. Tel: +420-541-562-630; Fax: +420-541-562-631; E-mail: literaki@vfu.cz

Received 30 November 2011; returned 4 January 2012; revised 12 January 2012; accepted 12 January 2012

**Objectives:** Faecal *Escherichia coli* strains were isolated from great cormorants (*Phalacrocorax carbo*) and mallards (*Anas platyrhynchos*), which are commonly occurring waterbirds in Europe, and studied for resistance to cephalosporins and fluoroquinolones.

**Methods:** Cloacal swabs or faeces from great cormorants and mallards in Central Europe were cultivated to isolate *Escherichia coli* strains with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes.

**Results:** Ten ESBL-producing *E. coli* with the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> or *bla*<sub>CTX-M-27</sub> gene were isolated from eight great cormorants (1.6%, *n* = 499). The *bla*<sub>CTX-M</sub> genes were harboured by plasmids of F and I1 incompatibility groups. CTX-M-27-producing isolates were identified as the epidemiologically important B2-O25b-ST131 clone. No ESBL-producing *E. coli* was isolated from 305 mallards. Eight *E. coli* isolates with PMQR genes [six *aac*(6')-Ib-cr and two *qnrS1*] were detected in six great cormorants (1.2%). Seventeen strains with *qnrS1* were detected in 17 mallards (6%). The PMQR genes were located on plasmids of incompatibility groups F, N or X2. ESBL and PMQR genes were found on conjugative plasmids, enabling the horizontal spread of resistance.

**Conclusions:** Both great cormorants and mallards can spread epidemiologically important antimicrobial-resistant *E. coli* isolates to water bodies throughout Europe.

**Keywords:** ESBLs, PMQR, *Anas*, *Phalacrocorax*, B2-O25b-ST131

### Introduction

The emergence of multidrug-resistant bacteria in the natural environment constitutes a serious risk to domestic animal and human health. Wild cormorants and mallards are associated with aquatic environments, to which their search for food is almost exclusively restricted. It can thus be presumed that resistant bacteria colonizing these birds originated in that aquatic environment. The importance of waterbirds, including mallards, in the spread of *Escherichia coli* resistant to cephalosporins and fluoroquinolones has been recently demonstrated in Poland.<sup>1</sup>

In this study, faecal *E. coli* strains were isolated from cormorants and mallards, which are commonly occurring waterbirds in Europe, and studied for resistance to cephalosporins and

fluoroquinolones. The study was focused on extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes and their genetic environments, including possibilities for their horizontal transfer.

### Materials and methods

Cloacal swabs or fresh faeces of great cormorants (*Phalacrocorax carbo*) and mallards (*Anas platyrhynchos*) were examined. Cloacal swabs were obtained from 49 cormorants shot in the Czech Republic during winter 2006/07 and 2007/08. Moreover, cormorant faeces (*n* = 300) were collected at a roosting place along the Morava River, Czech Republic, in winter 2007/08. Cormorant faeces (*n* = 150) were also collected at a roosting place along the Vah River, Slovak Republic, in January 2009.

Cloacal swabs from mallards ( $n=305$ ) shot at various locations in the Czech Republic were obtained during the autumn hunting season in 2008.

Individual cloacal swabs or faeces samples were enriched in MacConkey broth and then cultivated on MacConkey agar (MCA) with cefotaxime (2 mg/L) and MCA with ciprofloxacin (0.05 mg/L). The *E. coli* colonies grown on MCA with cefotaxime were examined using the double-disc synergy test for the production of ESBLs.<sup>2</sup> In the *E. coli* isolates that were resistant to cefotaxime or ciprofloxacin, susceptibilities to 12 antimicrobial substances were tested using the disc diffusion method according to the CLSI.<sup>1,2</sup> *E. coli* strains were identified using the API 10S test (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Genes responsible for the ESBL phenotype (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub>) were identified by PCR and sequencing.<sup>1</sup> The colonies grown on MCA with ciprofloxacin were tested for PMQR genes [*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA*] by PCR, as described previously.<sup>1</sup>

All of the other methods used in this study are described elsewhere.<sup>3</sup> Briefly, ESBL- and/or PMQR-positive *E. coli* isolates were typed by XbaI PFGE, and *E. coli* phylogenetic groups were identified. In isolates belonging to phylogenetic group B2, allele-specific PCR was performed to identify the O25b-ST131 clone of *E. coli*. Multilocus sequence type (MLST) determination was carried out in isolates positive by allele-specific PCR. Gene amplification and sequencing were performed using primers specified at the *E. coli* MLST web site (<http://mlst.ucc.ie/mlst/mlst/dbs/Ecoli>). The insertion sequence *ISEcp1* in the upstream region of the *bla*<sub>CTX-M</sub> genes was tested.

The transferability of the *bla* genes and PMQR genes was tested by conjugation. Plasmid DNA from *E. coli* was isolated and introduced into competent *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen, USA) by chemical transformation, followed by the selection of transformants on brain heart infusion agar (Oxoid) supplemented with cefotaxime (2 mg/L) or ciprofloxacin (0.05 mg/L). The presence of a relevant *bla* gene and/or PMQR gene in the transformants was confirmed by PCR. All transformants, transconjugants and their corresponding donors were examined for minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin and nalidixic acid using the agar dilution method.<sup>2</sup> The size of the plasmids with ESBL or quinolone resistance genes from transformants or transconjugants was designated by S1-PFGE. The restriction fragment length polymorphism (RFLP) of plasmid DNA from transformants/transconjugants was determined. Plasmids were replicon typed as described elsewhere.<sup>4</sup>

## Results

Using selective cultivation on MCA with cefotaxime, 10 ESBL-producing *E. coli* strains were isolated from eight great cormorants (1.6%;  $n=499$ ) (Table 1). Their ESBL phenotype was caused by the presence of the *bla*<sub>CTX-M-27</sub> or *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene. The insertion sequence *ISEcp1* was found upstream from all *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. Both CTX-M-27-producing isolates showed the same XbaI-PFGE profile and belonged to the B2-O25b-ST131 lineage (Table 1). All CTX-M-15-producing isolates were multiresistant, and most of them contained *aac(6')-Ib-cr* and a class 1 integron, 1.7 kb in length with the gene cassettes *dfrA17-aadA5*. The *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene was located on two different plasmid types: IncI1 or IncFIA-FIB (Table 1).

Using selective cultivation on MCA with ciprofloxacin, four PMQR-positive *E. coli* strains were isolated from four cormorants (0.8%,  $n=499$ ). Two isolates were positive for *qnrS1* and another two isolates contained *aac(6')-Ib-cr* (Table 2). The *qnrS1* gene was located on 50 kb conjugative plasmids of the IncN group with the same RFLP profile in both of the isolates. In the

strains carrying *aac(6')-Ib-cr*, the genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and *bla*<sub>OXA-1</sub> were detected (Tables 1 and 2).

No ESBL-producing *E. coli* isolate was detected in mallards. Using selective cultivation with ciprofloxacin, 17 *qnrS1*-positive *E. coli* isolates were detected in 17 mallards (6%,  $n=305$ ) (Table 2). The *qnrS1* gene was transferred by conjugation to *E. coli* and *Salmonella*. The *qnrS1* gene was located on conjugative plasmids of incompatibility groups X2 or N that ranged in size from 30 to 45 kb (Table 2).

As determined by the  $\chi^2$  test, the prevalence of ESBL-positive *E. coli* isolates in cormorants was statistically higher than in mallards and, in contrast, the prevalence of PMQR-positive strains in mallards was statistically higher than in cormorants.

## Discussion

CTX-M enzymes are currently the most prevalent ESBLs in the world and they are identified mainly in *E. coli*.<sup>5</sup> We report here *E. coli* isolates with ESBL genes in cormorants for the first time. Great cormorants and mallards are common waterbirds in Central Europe, and thus the detection of CTX-M-type ESBL and PMQR genes in these wild birds may indicate a rapid spread of these resistance genes within the environment. As these waterbirds are almost exclusively associated with the water environment, we suppose that they were colonized with resistant *E. coli* strains from this environment; they can then become important reservoirs and potential vectors of the bacteria in the water environment.

In the present study, the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene was harboured on conjugative plasmids of the incompatibility groups IncF and IncI1. The association between the genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> and *aac(6')-Ib-cr* and the IncF plasmid was recently described in clinical and food animal *E. coli* isolates.<sup>6</sup> Plasmids belonging to the IncI1 group carrying *bla*<sub>CTX-M-15</sub> have also recently been described in *E. coli* isolates.<sup>7</sup>

In our study, the *bla*<sub>CTX-M-27</sub> gene was found in two epidemiologically related *E. coli* isolates from cormorants. To our knowledge, this is the first report of CTX-M-27-producing *E. coli* in wild animals. Moreover, these CTX-M-27-positive isolates belonging to the B2 phylogenetic group were identified as the O25b-ST131 clone, which has high virulence potential all over the world and represents a major public health problem. This is the first detection of a CTX-M-27 ESBL type in an O25b-ST131 isolate in Europe. To date, the only finding of a CTX-M-27-producing *E. coli* clone B2-O25-ST131 has been reported in China.<sup>8</sup>

In this study, *E. coli* isolates with *qnrS1* were detected at a prevalence of 6% in mallards. Recently, four *E. coli* isolates with *qnrS* genes were found in mallards from the Polish coast of the Baltic Sea.<sup>1</sup> In all *E. coli* strains from Central European mallards, the *qnrS1* gene was located on transferable plasmids of incompatibility groups X2 or N. The IncX2 plasmid is not common, and the association between this plasmid and *qnrS* has been described only very recently.<sup>1,9</sup> In four *E. coli* isolates, *qnrS1* was found to be located on conjugative plasmids of the IncN group. The association of *qnrS* and IncN plasmids has been recently reported.<sup>1,10</sup>

Selective pressure or sources of colonization probably differ in great cormorants and mallards, as shown by the different

**Table 1.** Characterization of ESBL-producing *E. coli* isolates from great cormorants

Strain no.	AR phenotype <sup>a</sup>	ESBL <i>bla</i> genes	Additional AR genes and integrons <sup>b</sup>	PFGE profile	Phylogenetic group	Conjugation to <i>E. coli</i>	Conjugation to <i>Salmonella</i>	Plasmid Inc group	Plasmid size (kb)	Plasmid RFLP profile	AR genes and integrons on plasmid <sup>b</sup>
KO 141 B	AMP, CEF	—	—	A	D	—	—	NT	NT	NT	
KO 178 B	AMP, CEF, CIP, NAL, STR, SUL, SXT, TET	<i>bla</i> <sub>CTX-M-27</sub>	<i>strA</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i> , Int1	B	B2	—	—	NT	NT	NT	
KO 198 B	AMP, CEF, CIP, NAL, STR, SUL, SXT, TET	<i>bla</i> <sub>CTX-M-27</sub>	<i>strA</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i> , Int1	B	B2	—	—	FIA-FIB	120	VII	<i>bla</i> <sub>CTX-M-27</sub> , <i>strA</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , Int1
KO 255 B	AMP, CEF, CAZ, CHL, CIP, GEN, NAL, STR, SUL, SXT, TET	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>strA</i> , <i>tet(B)</i> , <i>cat</i> , Int1	C	D	—	—	NT	NT	NT	
KT 58 C	AMP, CEF, CHL, CIP, GEN, NAL, SUL, SXT, TET	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>cat</i> , <i>sul2</i> , Int1	D	A	+	—	I1	100	V	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>sul2</i> , <i>cat</i> , Int1
KT 87 <sup>c</sup>	AMP, CEF, CHL, CIP, NAL, SUL, SXT, TET	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>cat</i> , <i>sul2</i> , <i>dfr1</i> , Int1	D	A	+	—	FIA-FIB	170	VI	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>cat</i> , Int1
KT 87 C	AMP, CEF, CHL, CIP, NAL, SUL, SXT, TET	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>cat</i> , <i>sul2</i> , <i>dfr1</i> , <i>aadA1</i> , <i>sat</i> , Int1	D	A	—	—	NT	NT	NT	
KT 121 B <sup>c</sup>	AMP, CEF, CHL, CIP, NAL, SUL, SXT, TET	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>cat</i> , <i>sul2</i> , <i>dfr1</i> , Int1	D	A	—	—	NT	NT	NT	
KT 121 C	AMP, CEF, CHL, CIP, NAL, SUL, SXT, TET	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>cat</i> , <i>sul2</i> , <i>int2</i> , <i>dfr1</i> , <i>aadA2</i> , <i>sat</i> , Int1	D	A	—	—	NT	NT	NT	
KT 126 C	AMP, CEF, CHL, CIP, NAL, SUL, SXT, TET	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>cat</i> , <i>sul2</i> , <i>int2</i> , <i>dfr1</i> , <i>aadA2</i> , <i>sat</i> , Int1	D	A	+	—	I1	100	V	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>sul2</i> , <i>dfr1</i> , <i>cat</i> , Int1

AR, antibiotic resistance; Inc, incompatibility group; NT, not typeable.

RFLP profile determined by EcoRV and HincII digestion.

<sup>a</sup>Twelve substances were tested using the disc diffusion method according to the CLSI: AMC, amoxicillin/clavulanic acid; AMP, ampicillin; CEF, cefalotin; CAZ, ceftazidime; CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; STR, streptomycin; SUL, sulphonamides; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; and TET, tetracycline.

<sup>b</sup>Int1: *sul1*, *int1*, class 1 integron 1.7 kb: *dfrA17-aadA5*.

<sup>c</sup>ESBL- and PMQR-positive *E. coli* strains isolated by selective cultivation with ciprofloxacin (see Table 2).



**Table 2.** Characterization of PMQR-positive *E. coli* from great cormorants and mallards

Origin	Strain no.	AR phenotype <sup>a</sup>	PMQR genes	Additional AR genes and integrons <sup>b</sup>	MIC (mg/L) <sup>c</sup> of NAL and CIP		PFGE profile	Phylogenetic group	Conjugation to <i>E. coli</i>	Conjugation to <i>Salmonella</i>	Plasmid Inc group	Plasmid size (kb)	Plasmid RFLP profile	Additional AR gene(s) on plasmid
Cormorants	KT 58 A	STR, TET	<i>qnrS1</i>	<i>strA, tet(A)</i>	128	0.125	f1	A	+	–	N	50	I	<i>strA, tet(A)</i>
	KT 87 <sup>d</sup>	AMP, CHL, CEF, CIP, NAL, SUL, SXT, TET	<i>aac(6′)-Ib-cr</i>	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>OXA-1</sub>, tet(A), tet(B), cat, sul2, dfr1, Int1</i>	>256	>8	D	A	–	–	NT	NT	NT	
	KT 121 B <sup>d</sup>	AMP, CHL, CEF, CIP, NAL, SUL, SXT, TET	<i>aac(6′)-Ib-cr</i>	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>OXA-1</sub>, tet(A), tet(B), cat, sul2, dfr1, Int1</i>	>256	>8	D	A	–	–	NT	NT	NT	
	KT 136 A	STR, TET	<i>qnrS1</i>	<i>strA, tet(A)</i>	128	0.125	f	A	+	+	N	50	I	<i>strA, tet(A)</i>
Mallards	174	AMP, NAL, TET	<i>qnrS1</i>	<i>bla<sub>TEM</sub>, tet(B)</i>	>256	4	a	A	–	–	NT	NT	NT	
	175	TET	<i>qnrS1</i>	—	>256	0.25	b	A	+	–	X2	35	IV	—
	177	TET	<i>qnrS1</i>	<i>tet(B)</i>	128	0.5	c	A	+	–	X2	30	III	—
	178	TET	<i>qnrS1</i>	<i>tet(B)</i>	256	4	c	A	+	+	X2	35	III	—
	188 A	TET	<i>qnrS1</i>	<i>tet(A)</i>	>256	1	d	A	+	+	X2	35	IV	<i>tet(A)</i>
	194	TET	<i>qnrS1</i>	<i>tet(A)</i>	>256	>8	e	B1	+	–	X2	35	IV	<i>tet(A)</i>
	195 A	AMP, CHL, CEF, CIP, NAL, SUL, SXT, TET	<i>qnrS1</i>	<i>bla<sub>TEM</sub>, tet(B), cat, sul1</i>	>256	>8	NT	B1	+	–	NT	NT	NT	
	203 A	TET	<i>qnrS1</i>	<i>tet(A)</i>	>256	>8	e	B1	+	–	X2	40	IV	<i>tet(A)</i>
	204	TET	<i>qnrS1</i>	<i>tet(A)</i>	128	0.25	e	B1	+	–	X2	35	IV	<i>tet(A)</i>
	206	TET	<i>qnrS1</i>	<i>tet(A)</i>	128	0.5	g	A	+	+	X2	35	IV	<i>tet(A)</i>
	209	AMP, TET	<i>qnrS1</i>	<i>bla<sub>TEM</sub>, tet(A)</i>	128	0.5	h	A	+	+	N	45	II	<i>bla<sub>TEM</sub>, tet(A)</i>
	212	TET	<i>qnrS1</i>	<i>tet(A)</i>	>256	0.5	i	A	+	–	X2	35	IV	<i>tet(A)</i>
	220	TET	<i>qnrS1</i>	<i>tet(A)</i>	128	0.5	j	A	+	+	X2	35	IV	<i>tet(A)</i>
	226 B	TET	<i>qnrS1</i>	<i>tet(A)</i>	>256	0.5	k	A	+	+	X2	35	IV	<i>tet(A)</i>
	231	AMP	<i>qnrS1</i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	>256	0.5	l	A	+	+	N	40	IIa	<i>bla<sub>TEM</sub></i>
	234	TET	<i>qnrS1</i>	<i>tet(A)</i>	64	0.25	m	A	+	+	X2	40	IV	<i>tet(A)</i>
242	TET	<i>qnrS1</i>	<i>tet(A)</i>	128	0.25	j	A	+	–	X2	40	IV	<i>tet(A)</i>	

AR, antibiotic resistance; Inc, incompatibility group; NT, not typeable.

RFLP profile determined by EcoRV and HincII digestion.

<sup>a</sup>Twelve substances were tested using the disc diffusion method according to the CLSI: AMC, amoxicillin/clavulanic acid; AMP, ampicillin; CEF, cefalotin; CAZ, ceftazidime; CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; STR, streptomycin; SUL, sulphonamides; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; and TET, tetracycline.

<sup>b</sup>Int1: *sul1, int1*, class 1 integron 1.7 kb: *dfrA17-aadA5*.

<sup>c</sup>MIC of nalidixic acid and ciprofloxacin for donor strains.

<sup>d</sup>*E. coli* strains positive for PMQR and ESBL genes (see Table 1).



prevalences of ESBL-producing and PMQR-positive *E. coli* isolates in great cormorants and mallards, respectively. As common waterbirds, both great cormorants and mallards can spread epidemiologically important antimicrobial-resistant *E. coli*, including the pandemic O25b-ST131 clone.

## Funding

This study was funded by the Czech Science Foundation (grant no. P502/10/P083). This study was also supported by the project 'CEITEC—Central European Institute of Technology' (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from the European Regional Development Fund.

## Transparency declarations

None to declare.

## References

- 1 Literak I, Dolejska M, Janoszowska D *et al.* Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. *Appl Environ Microbiol* 2010; **76**: 8126–34.
- 2 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement M100-S18*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
- 3 Dolejska M, Frolkova P, Florek M *et al.* CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 2784–90.
- 4 Carattoli A, Bertini A, Villa L *et al.* Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; **63**: 219–28.
- 5 Perez F, Endimiani A, Hujer KM *et al.* The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol* 2007; **7**: 459–69.
- 6 Lopez-Cerero L, Egea P, Serrano L *et al.* Characterisation of clinical and food animal *Escherichia coli* isolates producing CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase belonging to ST410 phylogroup A. *Int J Antimicrob Agents* 2011; **37**: 365–7.
- 7 Smet A, van Nieuwerburgh F, Vandekerckhove TT *et al.* Complete nucleotide sequence of CTX-M-15-plasmids from clinical *Escherichia coli* isolates: insertional events of transposons and insertion sequences. *PLoS ONE* 2010; **5**: e11202.
- 8 Sun J, Liao X, Li L *et al.* Emergence of pandemic B2-O25-ST131 *Escherichia coli* harboring *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, *bla*<sub>CTX-M-27</sub> and *qnrS1* genes. *J Med Microbiol* 2011; **60**: 1711–2.
- 9 Fortini D, Fashae K, Garcia-Fernandez A *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance and  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* from healthy animals from Nigeria. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 1269–72.
- 10 Garcia-Fernandez A, Fortini D, Veldman K *et al.* Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 274–81.



## Příloha 11

ALBRECHTOVA, K., DOLEJSKA, M., CIZEK, A., TAUSOVA, D., KLIMES, J., BEBORA, L., LITERAK, I., 2012, Dogs of nomadic pastoralists in northern Kenya are reservoirs of plasmid-mediated cephalosporin- and quinolone-resistant *Escherichia coli*, including pandemic clone B2-O25-ST131: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, p. 4013-4017.

### Souhrn

---

Ve studii byl sledován výskyt rezistentních bakterií v gastrointestinálním traktu psů, koček a kočovných pastevců v Keni. Studie ukazuje na rozšíření beta-laktamázy CTX-M-15 a pandemického klonu *E. coli* B2-O25b-ST131 v odlehlých oblastech, ve kterých se širokospektré cefalosporiny používají pouze zřídka. Nález kmenů *E. coli* s identickým genotypem u psů a pastevců ukazuje na výměnu bakterií mezi zvířetem a člověkem, kteří sdílí společné prostředí.



# Dogs of Nomadic Pastoralists in Northern Kenya Are Reservoirs of Plasmid-Mediated Cephalosporin- and Quinolone-Resistant *Escherichia coli*, Including Pandemic Clone B2-O25-ST131

Katerina Albrechtova,<sup>a</sup> Monika Dolejska,<sup>a,c</sup> Alois Cizek,<sup>b,c</sup> Dagmar Tausova,<sup>a</sup> Jiri Klimes,<sup>a</sup> Lily Bebor,<sup>d</sup> and Ivan Literak<sup>a,c</sup>

Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic<sup>a</sup>; Institute of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic<sup>b</sup>; CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic<sup>c</sup>; and Department of Veterinary Pathology, Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Nairobi, Kapenguria Road, Nairobi, Kenya<sup>d</sup>

**Resistance in *Escherichia coli* isolates colonizing gastrointestinal tracts of dogs, cats, and their owners in Northern Kenya was investigated with an emphasis on extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). Totals of 47 (22%, *n* = 216), 2 (4%, *n* = 50), and 4 (17%, *n* = 23) CTX-M-15-producing *E. coli* isolates were obtained from dogs, cats, and humans, respectively. CTX-M-15-producing *E. coli* isolates with identical PFGE profiles were detected in animals and humans living in the same area.**

Transfer of resistant bacteria between humans and their dogs has been documented in various studies from the Western world (12). There have been no such data, however, from developing African countries. Dogs have been repeatedly recognized as comprising reservoirs or sentinels for zoonotic and livestock-infecting pathogens and, as such, are useful for epidemiological monitoring in rural parts of Africa (5). This study investigated the prevalence and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* strains in Northern Kenya, an area inhabited mainly by nomadic herders of the Samburu, Turkana, El Molo, Rendille, and Gabra tribes. Although certain allopathic antimicrobials (mainly oxytetracycline) are occasionally used to treat livestock, veterinary medicine for small animals is virtually absent in the area (2). As direct selective antibiotic pressure is minimized in these animals, domestic carnivores can serve as sentinels of environmental contamination.

Rectal swabs of 216 dogs, 50 cats, and 23 humans were collected into Amies medium in September and October 2009 in nine settlements in Marsabit and Samburu Districts of Northern Kenya. Swabs were plated in parallel on plain MacConkey agar (MCA) (Oxoid, United Kingdom) and MCA with cefotaxime (2 mg/liter). One lactose-fermenting colony was isolated from each plate and tested for susceptibility to 12 antimicrobial agents using the disc diffusion method (8). Colonies obtained on cefotaxime-supplemented MCA were identified by using the API test (bioMérieux, France) and examined by the double-disc synergy test (8). The ESBL-positive *E. coli* isolates were tested by PCR and sequencing for (i) ESBL-coding genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, and *bla*<sub>OXA</sub>, (ii) plasmid-mediated quinolone-resistance genes *aac*(6')-Ib-cr, *qepA*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, and *qnrS*, and (iii) additional antibiotic resistance genes and integrons as described previously (14). All other methods used were described elsewhere (10). In brief, ESBL-producing *E. coli* were typed and clustered by pulse-field gel-electrophoresis (PFGE) (4) and their phylogenetic groups were identified by multiplex PCR assay (6). In isolates belonging to phylogenetic group B2, allele-specific PCR was performed to identify the O25-ST131 clone (7). Multilocus sequence typing (MLST) determination was carried out in isolates positive by allele-specific PCR and analyzed at <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli> (17). The insertion sequence *ISEcpI* in the upstream region

of *bla* genes was tested (11). Chemical transformation of plasmids and conjugation experiments to *E. coli* MT102RN and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL5325 were performed (15). Plasmids were analyzed by S1-PFGE (1), replicon typing (3), and restriction fragment length polymorphism profiles obtained by EcoRV digestion.

A total of 267 lactose-fermenting isolates were obtained by cultivating the swabs on MCA without antibiotics. The resistance patterns of these isolates ranged from 1 (ampicillin, gentamicin, tetracycline, streptomycin, or nalidixic acid) to all 12 of the antibiotics tested. Multiresistance to ampicillin, streptomycin, sulfonamides, tetracycline, and trimethoprim-sulfamethoxazole was the most frequent phenotype.

Totals of 47 (22%, *n* = 216), 2 (4%, *n* = 50), and 4 (17%, *n* = 23) ESBL-positive *E. coli* isolates were obtained from dogs, cats, and humans, respectively, by cultivation on cefotaxime-supplemented MCA. Resistance to amoxicillin-clavulanic acid was found in 15% and resistance to ceftazidime in 11% of the ESBL-producing isolates. Apart from resistance to beta-lactam antibiotics, these isolates showed resistance to tetracycline (100% of the ESBL-producing isolates), trimethoprim-sulfamethoxazole (100%), sulfonamides (98%), nalidixic acid (96%), ciprofloxacin (94%), gentamicin (87%), chloramphenicol (43%), and streptomycin (34%). Comparison of PFGE banding patterns clustered the ESBL-producing isolates into five groups of closely related isolates (>85% similarity) designated clusters K, L, M, N, and O (Fig. 1). Overall, 36 (70%) of the ESBL-producing isolates belonged to either cluster K or L. Isolates with identical PFGE profiles were detected from 8 dogs and 2 humans, and closely related (>95% similarity) isolates were found in 1 human and 1 cat sampled in the same town. Three dogs were found to harbor isolates of

Received 5 October 2011 Returned for modification 9 January 2012

Accepted 10 April 2012

Published ahead of print 16 April 2012

Address correspondence to Katerina Albrechtova, [albkat@seznam.cz](mailto:albkat@seznam.cz).

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.05859-11

TABLE 1 Strain and plasmid characteristics of ESBL-producing *E. coli* isolates from dogs, cats, and humans<sup>a</sup>

Characteristics of:		Plasmid <sup>c</sup>						
Locality	Strain	Phylogroup, sequence cluster type	Resistance phenotype	Resistance genes in addition to β-lactamases <sup>b</sup>	Conjugation or transformation	Size (kb), Inc group	Genes cotransferred with <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> and <i>bla</i> <sub>OXA1-like</sub>	EcoRV restriction pattern
Gas	Dog 231	L	Am St Su Te Sx Cm Cf Na Gn Cp	<i>sul2, catA1, tet(B), dhfr12, dhfr1, strA, aac(6')-lb-cr</i>	Conj <i>E. coli</i>	160, FIA/FIB	<i>int1, aac(6')-lb-cr</i>	4
	Dog 233	L	Am St Su Te Sx Cf Cz	<i>int1, sul2, tet(B), dhfr1, strA, aac(6')-lb-cr</i>	Conj <i>E. coli</i>	160, FIA/FIB	<i>int1, aac(6')-lb-cr</i>	4
	Dog 235	K	Am St Su Te Sx Cf Na Cz Gn Ac Cp	<i>int1, sul2, catA1, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 232	X	Am St Su Te Sx Cf Cz	<i>sul2, tet(B),aadA2, strA, aac(6')-lb-cr</i>				
Arupal and Gatab <sup>d</sup>	Dog 166	K	Am Su Te Sx Cm Cf Na Cz Gn Cp	<i>int1, sul2, catA1, tet(B), strA, aac(6')-lb-cr</i>	Trans, conj <i>E. coli</i>	160, FIA/FIB	<i>int1, sul2, tet(B), catA1, aac(6')-lb-cr</i>	3
	Dog 20	K	Am Su Te Sx Cm Cf Na Gn Cp	<i>int1, catA1, tet(B), strA, aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 36	K	Am Su Te Sx Cm Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 49	K	Am Su Te Sx Cm Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, catA1, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 89	K	Am Su Te Sx Cm Cf Na Gn Cp	<i>int1, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 38	M	Am St Su Te Sx Cm Cf Na Gn Ac Cp	<i>sul2, catA1, cml, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>				
	cat 346	X	Am Su Te Sx Cm Cf Na Gn Cp	<i>int1, catA1, tet(B),aadA2, aac(6')-lb-cr</i>	Trans, conj <i>E. coli</i>	160, FIA/FIB	<i>int1, sul2, tet(B), catA1, aac(6')-lb-cr</i>	3
South Horr	Dog 168	N	Am Su Te Sx Cf Na Cp	<i>int1, sul2, tet(A), aac(6')-lb-cr</i>	Conj <i>E. coli</i>			
	Dog 198	N	Am Su Te Sx Cf Na Cp	<i>int1, sul2, tet(A),aadA2, aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 209	N	Am St Su Te Sx Cf Na Ac Cp	<i>int1, sul2, tet(A), strA, aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 205	X	Am Su Te Sx Cf Na Gn Cp	<i>int1, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>				
Loyiangalani	Dog 62	K	Am Su Te Sx Cm Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, catA1, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>	Trans	160, FIA/FIB	<i>int1, sul2, tet(B), catA1, aac(6')-lb-cr</i>	3
	Dog 110	K	Am Su Te Sx Cm Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, catA1, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 119	K	Am Su Te Sx Cm Cf Na Gn Ac Cp	<i>int1, catA1, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 128	K	Am Su Te Sx Cm Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 130	K	Am Su Te Sx Cm Cf Na Gn Cp	<i>catA1, sul2, tet(B), strA, aac(6')-lb-cr</i>	Trans, conj <i>E. coli</i>	110, FIB	<i>sul2, tet(B), catA1, aac(6')-lb-cr</i>	1
	Dog 131	K	Am Su Te Sx Cm Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, catA1, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 135	K	Am Su Te Sx Cm Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, catA1, tet(B), strA, aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 154	K	Am St Su Te Sx Cm Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, catA1, tet(B), strA, aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 239	K	Am St Su Te Sx Cm Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, catA1, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>	Conj <i>E. coli</i>			
	Dog 242	K	Am Su Te Sx Cm Cf Na Gn Ac Cp	<i>int1, sul2, tet(B), dhfr12, aac(6')-lb-cr</i>	Conj <i>E. coli</i>	160, FIA/FIB	<i>sul2, int1, aac(6')-lb-cr</i>	5
	Dog 7	L	Am Su Te Sx Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 41	L	Am Su Te Sx Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, strA, tet(B), dhfr1, aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 42	L	Am Su Te Sx Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, tet(B), dhfr1, aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 43	L	Am Su Te Sx Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, tet(B), dhfr1, aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 115	L	Am Su Te Sx Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 136	L	Am Su Te Sx Cm Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, tet(B), strA</i>				
	Dog 137	L	Am St Su Te Sx Cf Na	<i>int1, sul2, tet(B),aadA1, strA, aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 140	L	Am Te Sx Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, tet(B),aadA1</i>	Conj <i>E. coli</i>			
	Dog 146	L	Am Su Te Sx Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>				
	Dog 150	L	Am Su Te Sx Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, tet(B), strA, aac(6')-lb-cr</i>				

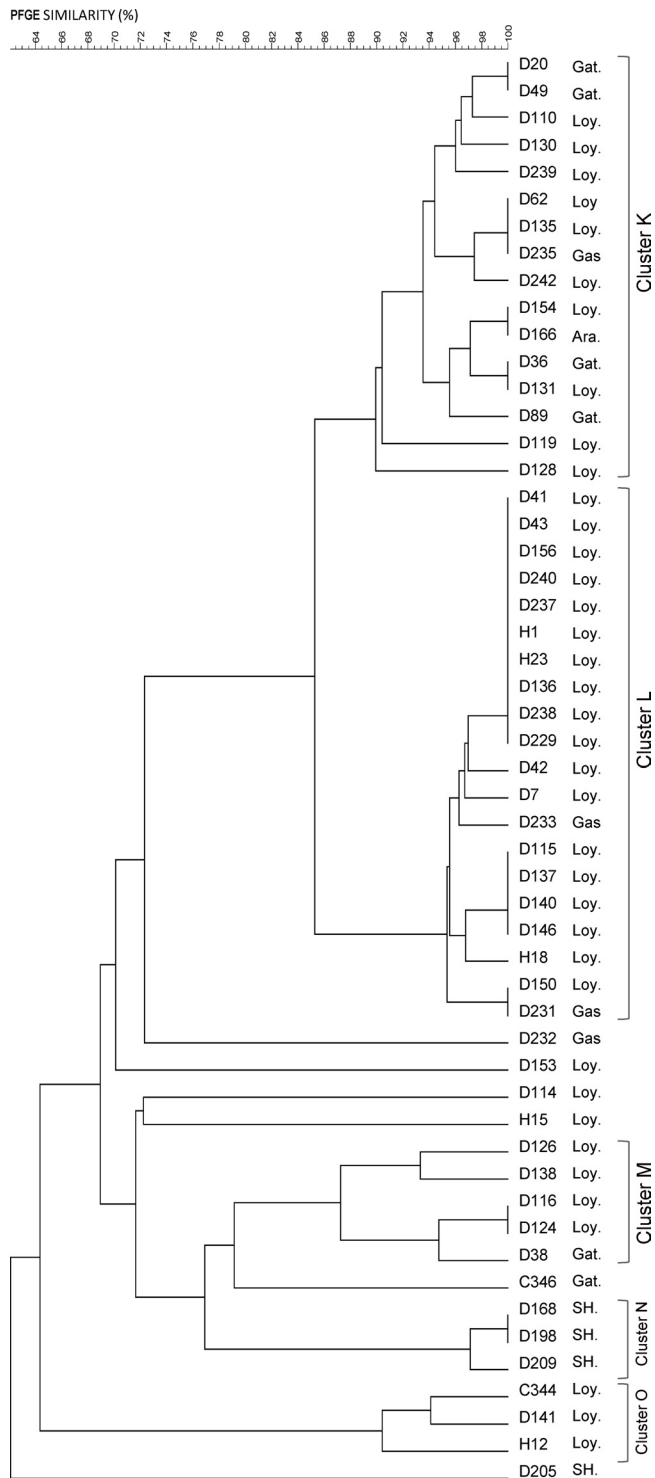
Dog 156	L	A	Am Su Te Sx Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, tet(B), aadA1, strA, aac(6')-lb-cr</i>	Conj <i>E. coli</i>	150, FIA/FIB	<i>int1, aac(6')-lb-cr, catA1</i>	2
Dog 229	L	A	Am St Su Te Sx Cf Na Cz Gn Cp	<i>int1, sul2, tet(B), dhfr1, strA, aac(6')-lb-cr</i>	Conj <i>E. coli</i>	150, FIA/FIB	<i>int1, aac(6')-lb-cr, catA1</i>	2
Dog 237	L	A	Am Su Te Sx Cf Na Cz Gn Ac Cp	<i>int1, sul2, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>	Conj S.			
Dog 238	L	A	Am Su Te Sx Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>	Typhimurium			
Dog 240	L	A	Am Su Te Sx Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>	Conj <i>E. coli</i>	150, FIB	<i>int1, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>	2
Human 1	L	A	Am Su Te Sx Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>	Conj <i>E. coli</i>	150, FIB	<i>int1, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>	2
Human 18	L	A	Am Su Te Sx Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, tet(B), dhfr12, aac(6')-lb-cr</i>	Conj <i>E. coli</i>	150, FIB	<i>int1, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>	2
Human 23	L	A	Am St Su Te Sx Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, tet(B), strA, aac(6')-lb-cr</i>	Conj <i>E. coli</i>	150, FIB	<i>int1, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>	2
Dog 116	M	A	Am St Su Te Sx Cm Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, catA1, tet(B), aadA1, strA, aac(6')-lb-cr</i>	Conj <i>E. coli</i> , S.	110, FIB	<i>sul2, tet(B), catA1, aac(6')-lb-cr</i>	1
Dog 124	M	A	Am Su Te Sx Cf Na Cz Gn Cp	<i>int1, sul2, tet(B), strA, aac(6')-lb-cr</i>	Typhimurium			
Dog 126	M	A	Am St Su Te Sx Cm Cf Na Gn Cp	<i>sul2, catA1, tet(B), strA, aac(6')-lb-cr</i>	Trans, conj <i>E. coli</i>	110, FIB	<i>sul2, tet(B), catA1, aac(6')-lb-cr</i>	1
Dog 138	M	A	Am St Su Te Sx Cm Cf Na Gn Ac Cp	<i>catA1, sul2, tet(B), strA, aac(6')-lb-cr</i>				
Dog 114	O	B1	Am St Su Te Sx Cp	<i>int1, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>				
cat 344	O	B1	Am St Su Te Sx Cf Na Cz Gn Ac Cp	<i>int1, tet(A), tetD, strA, aac(6')-lb-cr</i>	Conj <i>E. coli</i>			
Human 12	O	B1	Am St Su Te Sx Cm Cf Na Gn Cp	<i>int1, catA1, tet(B), aadA1, strA, aac(6')-lb-cr</i>				
Dog 141	X	B1	Am Su Te Sx Cm Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, catA1, cml, tet(A), strA, aac(6')-lb-cr</i>	Conj <i>E. coli</i>	90, I1	<i>sul2</i>	
Dog 153	X	B1	Am Su Te Sx Cf Na Gn Cp	<i>sul1, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>				
Human 15	X	A	Am St Su Te Sx Cf Na Gn Cp	<i>int1, sul2, tet(B), aadA1, dhfr12, strA, aac(6')-lb-cr</i>	Conj <i>E. coli</i>	150, FIB	<i>int1, tet(B), aac(6')-lb-cr</i>	2

<sup>a</sup> Am, ampicillin; St, streptomycin; Su, sulfonamide compounds; Te, tetracycline; Sx, trimethoprim-sulfamethoxazole; Cm, chloramphenicol; Na, nalidixic acid; Gn, gentamicin; Cp, ciprofloxacin; Cz, cefazidime; Ac, amoxycillin-clavulanate.

<sup>b</sup> All strains harbored the *bla<sub>CTX-M-15</sub>* gene and the *bla<sub>OXA-1-like</sub>* gene. *int1* is integron 1 with *dhfrA17-aadA5* gene cassettes.

<sup>c</sup> Plasmid characteristics are stated for those transformants/transconjugants which harbored one plasmid. Conj, conjugation; Trans, transformation.

<sup>d</sup> Atapal and Gatab are close to each other, so the samples were grouped together.



**FIG 1** Dendrogram of CTX-M-producing *E. coli* isolates' PFGE profiles, generated by cluster analysis of the Dice similarity indices in the BioNumerics fingerprinting software (optimization 1%, band matching tolerance 1%, tolerance change 1%). Gat, Gatab; Loy, Loyiangelani; Gas, Gas; Ara, Arapal; SH, South Horr. D, dog; H, human; C, cat.

the B2-O25-ST131 lineage. The genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and *bla*<sub>OXA-1-like</sub> were found in all ESBL-producing *E. coli* isolates; all of these isolates also tested positive for the gene *aac*-(6')-Ib-cr, but none of them had *qnr* genes. The upstream region of *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in all

ST131 isolates contained the transposase gene of the IS26 sequence. All other isolates had the *ISEcp1* insertion sequence upstream from the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene, but PCR for IS26 was negative. Five distinct types of plasmids were detected: (i) a 90-kb plasmid of incompatibility group I1 (IncI1), (ii) a 110-kb plasmid of group IncFIB, (iii) a 150-kb plasmid of group IncFIB, (iv) a 150-kb plasmid of group IncFIA and IncFIB (IncFIA/FIB), and (v) a 160-kb plasmid of group IncFIA/FIB (Table 1). All these plasmids carried the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and *aac*-(6')-Ib-cr genes together with various combinations of other resistance genes, *dfrA17-aadA5*, *tet*(B), or *catA1*. Plasmids of the 160-kb, IncFIA/FIB, and identical EcoRV profile carrying *int1*, *tet*(B), *catA1*, and *aac*-(6')-Ib-cr were found in PFGE-unrelated isolates from dogs and a cat sampled in different villages. The EcoRV restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns of all IncF plasmids shared more than 85% similarity (difference in up to five bands).

The findings of this study corroborate the recognized worldwide spread of CTX-M-15-producing isolates, including the O25-ST131 clone, even in very remote areas where extended spectrum cephalosporins are used very rarely (9, 13, 16). The *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene was found on large conjugative plasmids together with genes encoding resistance to other groups of antibiotics. Such a genetic constellation, along with the warm climate and lack of sanitary facilities in rural Africa, probably facilitates the spread of multiresistant bacteria and their transfer between humans and domestic carnivores. The relatively lower resistance rates in isolates from cats compared to the resistance rates in isolates from dogs could be explained by the different foraging behaviors of the two species. While cats may prefer hunting in the bush, dogs are probably more reliant on household leftovers and more prone to coprophagy. Such a scavenger strategy renders dogs good sentinels of environmental contamination and suitable for monitoring of local resistance patterns. Further studies are needed to specify the role of livestock, the mainstay of nomadic pastoralist communities, as well as omnipresent domestic rodents, in the epidemiology of antibiotic-resistant bacteria.

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge David Modry (UVPS Brno, CZ) and VSF-CZ, Margita Fuchsova and the support provided by the Embassy of the Czech Republic in Nairobi, Kenya, and Pavel Svec (MU Brno, CZ) and Pavel Alexa (VRI Brno, CZ) for laboratory and analysis support.

The laboratory part of the study was funded by grant IGA 64/2010/FVHE from the Internal Grant Agency of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, grant no. MSM6215712402 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, and by the project CEITEC (Central European Institute of Technology) (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from the European Regional Development Fund.

## REFERENCES

- Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. 1995. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal. Biochem.* 226:235–240.
- Bett B, Jost Cand Mariner J. 2008. Participatory investigation of important animal health problems amongst the Turkana pastoralists: relative incidence, impact on livelihoods and suggested interventions. Discussion Paper No. 15. Targeting and Innovation. International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenya.
- Caratolli A, et al. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* 63:219–228.
- CDC. 2004. Standardized molecular subtyping of foodborne bacterial pathogens by pulse-field gel electrophoresis. Centers for Disease Control, Atlanta, GA.



5. Cleaveland S, Meslin FX, Breiman R. 2006. Dogs can play useful role as sentinel hosts for disease. *Nature* **440**:605.
6. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4555–4558.
7. Clermont O, et al. 2009. Rapid detection of the O25-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**:274–277.
8. CLSI. 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 18th informational supplement. CLSI document M100-S18. CLSI, Wayne, PA.
9. Coque TM, et al. 2008. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg. Infect. Dis.* **14**:195–200.
10. Dolejska, M., et al. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. in municipal wastewater treatment plant effluents. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**:2784–2790.
11. Eckert C, Gautier V, Arlet G. 2006. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**: 14–23.
12. Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. 2004. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**:321–332.
13. Hernandez J, et al. 2010. Globally disseminated human pathogenic *Escherichia coli* of O25-ST131 clone, harboring *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, found in glaucous-winged gull at remote Commander Islands, Russia. *Environ. Microbiol. Rep.* **2**:329–332.
14. Literak I, et al. 2010. Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *J. Appl. Microbiol.* **108**: 1702–1711.
15. Olesen I, Hasman H, Aarestrup FM. 2004. Prevalence of beta-lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microb. Drug Resist.* **10**:334–340.
16. Pallecchi L, et al. Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource setting in Latin America. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2720–2725.
17. Wirth T, et al. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* **60**:1136–1151.



## Příloha 12

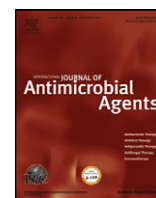
DOLEJSKA, M., BRHELOVA, E., DOBIASOVA, H., KRIVDOVA, J., JURANKOVA J., SEVCIKOVA, A., DUBSKA, L., LITERAK, I., CIZEK, A., VAVRINA, M., KUTNIKOVA, L., STERBA, J., 2012, Dissemination of IncFII<sub>K</sub>-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates from children in hospital paediatric oncology wards: International Journal of Antimicrobial Agents, v. 40, p. 510-515.

### Souhrn

---

U dětí s nádorovým onemocněním hospitalizovaných na Klinice dětské onkologie byla po dobu osmi měsíců sledována kolonizace GIT enterobakteriemi s produkcí ESBL. Byla provedena kompletní charakteristika fenotypových a genotypových vlastností kmenů s cílem pochopit epidemiologii šíření producentů ESBL u pacientů na klinice. Byla zjištěna přítomnost různých druhů enterobakterií, zejména *K. pneumoniae*, s beta-laktamázou CTX-M-15 a rezistencí k několika skupinám antimikrobiálních látek. Přenos multirezistentního plazmidu IncFII<sub>K</sub> mezi nepříbuznými bakteriemi a jejich udržování v souvislosti s empirickou terapií cefalosporiny u onkologických pacientů představoval zásadní aspekt outbreaku.





## Dissemination of IncFII<sub>K</sub>-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates from children in hospital paediatric oncology wards

Monika Dolejska<sup>a,b,\*</sup>, Eva Brhelova<sup>a</sup>, Hana Dobiasova<sup>a</sup>, Jana Krivdova<sup>a</sup>, Jana Jurankova<sup>c</sup>, Alena Sevcikova<sup>c</sup>, Lenka Dubska<sup>d</sup>, Ivan Literak<sup>a,b</sup>, Alois Cizek<sup>b,e</sup>, Martin Vavrina<sup>f</sup>, Lucia Kutnikova<sup>f</sup>, Jaroslav Sterba<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

<sup>b</sup> CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Clinical Microbiology, The University Hospital Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno, Czech Republic

<sup>d</sup> Department of Laboratory Medicine, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Zlutý kopec 7, 656 53, Brno, Czech Republic

<sup>e</sup> Institute of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

<sup>f</sup> Paediatric Oncology Department, Clinic of Child Oncology, The University Hospital Brno, Cernopolní 212/9, 613 00 Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 May 2012

Accepted 19 July 2012

#### Keywords:

Antimicrobial resistance

ESBL

MLST

Children

*Klebsiella* spp.

*Escherichia* spp.

### ABSTRACT

In this study, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae isolates in children with malignancies hospitalised at a paediatric oncology department in the Czech Republic were investigated. From June 2009 to January 2010, a total of 50 ESBL-producing faecal isolates of Enterobacteriaceae were obtained from 28 patients. These isolates were characterised with regard to ESBL enzymes, plasmid-mediated quinolone resistance genes, multilocus sequence typing (MLST) and plasmids conferring resistance to cephalosporins and fluoroquinolones. ESBL-producing isolates included *Klebsiella pneumoniae* ( $n=36$ ), *Escherichia coli* ( $n=7$ ), *Klebsiella oxytoca* ( $n=3$ ), *Enterobacter cloacae* ( $n=2$ ) and *Citrobacter freundii* ( $n=2$ ). *Klebsiella pneumoniae* isolates belonged to 7 MLST types, including sequence types ST280, ST321, ST323 and ST416 as well as the novel types ST626, ST627 and ST628. The multiresistant epidemic clone *E. coli* B2-O25b-ST131 was detected in one patient. The gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> was found on large conjugative IncFII<sub>K</sub> plasmids along with *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *qnrB1*, *aac(6')-Ib-cr*, *strA*, *sul2*, *aac(3')-II* and *tet(A)* genes in most isolates. Dissemination of IncFII<sub>K</sub> plasmids among various Enterobacteriaceae isolates was considered an important aspect of nosocomial colonisation in the wards by Enterobacteriaceae species producing ESBLs. This is the first study documenting multiple antibiotic resistance elements, including *qnr* genes, in IncFII<sub>K</sub> plasmids in various bacterial species isolated in a single hospital department. The results highlight the evolution of IncFII<sub>K</sub> plasmids into new variants containing novel antibiotic resistance elements and their important role in spreading ESBL-producing bacteria among hospitalised patients.

© 2012 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

### 1. Introduction

Resistance in Enterobacteriaceae species to cephalosporins owing to extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) as well as plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) has become a serious public health problem in recent decades [1,2]. ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* is one of the most common Gram-negative bacteria showing multiple antibiotic resistance. This opportunistic pathogen is responsible in particular for nosocomial infections in

Intensive Care Units and creates a major risk, especially to immunocompromised patients treated in these wards [3,4].

Clonal dissemination of CTX-M-15-producing *K. pneumoniae* has been observed in several countries [5,6]. Rapid international spread of CTX-M-15 has been associated with the global dissemination of *Escherichia coli* clones such as sequence type 131 (ST131) harbouring *bla*<sub>CTX-M-15</sub> on IncFII conjugative plasmids [7]. CTX-M-15-producers are commonly multiresistant to various antibiotic agents such as fluoroquinolones, aminoglycosides and sulphonamides [8].

The IncF plasmid family plays a major role in the dissemination of antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae. They contribute to the fitness of their bacterial host by providing virulence and antimicrobial resistance genes and show rapid evolution [9]. IncF

\* Corresponding author. Tel.: +420 54 1562 643; fax: +420 54 1562 631.  
E-mail address: [m.dolejska@centrum.cz](mailto:m.dolejska@centrum.cz) (M. Dolejska).

plasmids are widely diffused in clinically relevant Enterobacteriaceae, representing one of the most frequent plasmid types [10]. Dissemination of genetic elements with *bla*<sub>CTX-M-15</sub> between Enterobacteriaceae species by conjugative transfer of IncFII plasmids has been demonstrated [11].

Patients with neutropenia are at high risk of various infections. Extended-spectrum  $\beta$ -lactam monotherapy alone or in combination with aminoglycosides is generally accepted as the empirical regimen for febrile neutropenia following chemotherapy for malignancy [12]. Recently, we have experienced increased nosocomial colonisation caused by ESBL-producing Enterobacteriaceae species in paediatric oncology patients hospitalised in a regional hospital in the Czech Republic. During an 8-month study period, ESBL-producing bacteria in hospitalised children were characterised and the spread of these epidemiologically important bacteria within a hospital department was studied.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Paediatric oncology department

The Paediatric Oncology Department of The University Hospital Brno (Brno, Czech Republic) is a tertiary referral cancer centre focused on treating patients with the entire spectrum of paediatric malignancies. The hospital covers an area of 5 million inhabitants, with 150 newly diagnosed cases of cancer among children and adolescents annually and 2000 hospital admissions. The department consists of three wards and 34 inpatient beds, with 10 private rooms. Most patients were admitted for evaluation and management of malignant diseases (chemotherapy administration, disease staging and recovery after surgery). Hospitalisation of the studied patients ranged from 1 day to 7 months, with a mean hospitalisation length of 14 days. A total of 360 episodes of febrile neutropenia, defined as an absolute neutrophil count of  $<0.5 \times 10^9/l$  and fever, are diagnosed and treated here each year.

For several years prior to the study period, the standard first-line treatment for children admitted with neutropenic fever had been piperacillin/tazobactam (TZP) in combination with aminoglycosides. The frequency of ESBL-producing bacteria at the paediatric oncology ward rapidly increased during 2008–2009 and resulted in a prevalence of 47% of patients colonised with ESBL-producing bacteria (Alena Sevcikova, The University Hospital Brno, Czech Republic, unpublished data). A change in the treatment strategy was made in July 2009 in consideration of an outbreak of serious nosocomial infection caused by ESBL-producing strains in hospitalised patients. The new treatment of choice was to use carbapenems (meropenem or imipenem) in combination with aminoglycosides or glycopeptides.

From June 2009 to January 2010, rectal swab samples from a total of 148 patients were examined for carriage of ESBL-producing strains. All clinically unstable patients newly admitted with febrile neutropenia were tested for possible carriage of an ESBL-producer. Some patients were thus screened repeatedly based on their respective clinical scenario.

### 2.2. Isolation and determination of extended-spectrum $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae species and antibiotic susceptibility testing

Samples were inoculated onto chromID™ ESBL agar (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) to isolate ESBL-producing Enterobacteriaceae species. Single colonies showing different colour and/or morphology were selected from each plate. Bacterial identification was performed using the API 10S test kit (bioMérieux). Isolates were tested for ESBL production by the double-disk synergy test and for susceptibility to the following nine

antimicrobial agents by the disk diffusion method [13]: amikacin (30  $\mu$ g); amoxicillin/clavulanic acid (20/10  $\mu$ g); chloramphenicol (30  $\mu$ g); gentamicin (10  $\mu$ g); imipenem (10  $\mu$ g); sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT) (1.25/23.7  $\mu$ g); sulphonamide compounds (300  $\mu$ g); tetracycline (30  $\mu$ g); and tobramycin (10  $\mu$ g). All isolated strains were examined for their minimum inhibitory concentration (MIC) to ciprofloxacin, nalidixic acid and colistin using the agar dilution method [13]. Identification of *E. coli* phylogenetic groups was made by a multiplex PCR assay [14].

### 2.3. Antibiotic resistance gene testing

Using PCR and sequencing, ESBL-positive Enterobacteriaceae isolates were tested for ESBL genes as well as PMQR genes (for list of primers, see Supplementary Table S1).

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.07.016>.

### 2.4. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) of Enterobacteriaceae species

All isolates were typed by *Xba*I PFGE [15]. Restriction profiles of *K. pneumoniae* were analysed using BioNumerics fingerprinting software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Cluster analysis of the Dice similarity indices was done to generate a dendrogram describing the relationships among PFGE profiles. Isolates were considered to be related and to belong to the same PFGE cluster if their Dice similarity indices were  $\geq 80\%$ . MLST of *K. pneumoniae* strains was performed using the Institute Pasteur (Paris, France) scheme [16]. Allele-specific PCR was performed to identify the O25b-ST131 clone in *E. coli* isolates [17] and positive results were confirmed by MLST (<http://mlst.ucc.ie/mlst/mlst/dbs/Ecoli>, accessed 16 June 2011).

### 2.5. Transferability of extended-spectrum $\beta$ -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes and plasmid characterisation

Conjugative transfer of ESBL genes was tested. Plate-mating experiments were performed using plasmid-free, rifampicin- and sodium-azide-resistant *E. coli* and *Salmonella* recipients. Transconjugants were tested for the presence of ESBL and PMQR genes found in original strains by PCR. Plasmid DNA from *E. coli* was isolated by the alkaline extraction procedure [18] and was introduced to competent *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen, Carlsbad, CA) by chemical transformation followed by selection of transformants on Luria–Bertani agar (Difco, Franklin Lakes, NJ) supplemented with cefotaxime (2 mg/L). Presence of the relevant *bla* gene in transformants and transconjugants was confirmed by PCR. Sizes of plasmids with ESBL genes from donors and transformants were determined by S1–PFGE [19]. Transformants with a single ESBL gene-harboring plasmid were used for further plasmid analysis. Plasmid DNA from transformants was replicon-typed [10,20]. Plasmids belonging to incompatibility group FII<sub>K</sub> were typed using a replicon sequence typing (RST) scheme [10]. The presence of additional antibiotic resistance genes on the *bla*<sub>ESBL</sub>-harboring plasmids was tested by PCR (Supplementary Table S1).

## 3. Results

### 3.1. Isolation of extended-spectrum $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae species and antibiotic susceptibility testing

During the 8-month sampling period from June 2009 to January 2010, a total of 50 ESBL-producing Enterobacteriaceae were

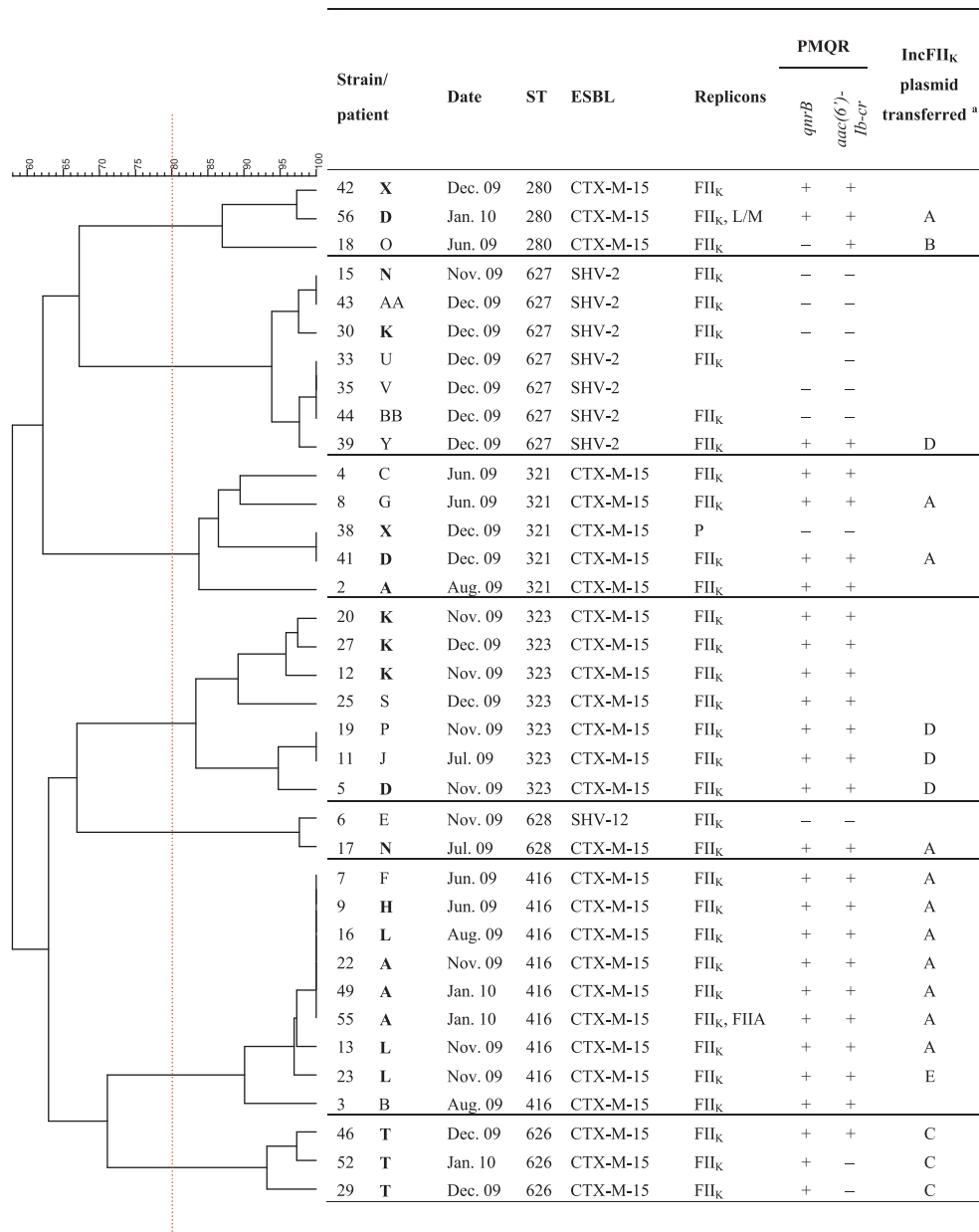
obtained from 28 children with cancer. A total of 26 patients colonised with ESBL-producing Enterobacteriaceae species were diagnosed with febrile neutropenia. Carbapenem (meropenem and imipenem) monotherapy or a combination of carbapenem and amikacin was used in 24 patients found to be colonised by an ESBL-producing strain.

ESBL-producing strains included *K. pneumoniae* ( $n = 36$  isolates), *E. coli* ( $n = 7$ ), *Klebsiella oxytoca* ( $n = 3$ ), *Enterobacter cloacae* ( $n = 2$ ) and *Citrobacter freundii* ( $n = 2$ ). All of the ESBL isolates were multi-resistant, with resistance to five to nine antimicrobial agents tested. Additional resistance to sulphonamides (96%), SXT (86%), tetracycline (78%), tobramycin (75%), gentamicin (69%), chloramphenicol (10%), amikacin (4%) and imipenem (2%) were found. All isolates (100%) and 80% of isolates were resistant to nalidixic acid and ciprofloxacin, respectively. MICs varied from 32 mg/L to >256 mg/L

for nalidixic acid and from 0.128 mg/L to >8 mg/L for ciprofloxacin. All isolates were susceptible to colistin ( $\text{MIC} \leq 2$  mg/L).

### 3.2. Antibiotic resistance genes and replicons in extended-spectrum $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae species

The ESBL phenotype was caused by the presence of the gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in most isolates (Fig. 1; Table 1). This gene was detected in 38 Enterobacteriaceae (76%). The genes *bla*<sub>SHV-2</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub> or *bla*<sub>CTX-M-2</sub> were found in other isolates (data not shown). A total of 35 isolates carried both the *qnrB1* and *aac(6)-Ib-cr* genes. Plasmids of incompatibility group FII<sub>K</sub> were the most prevalent replicons found in 42 isolates. Plasmids of incompatibility groups FIB, P, I1, L/M or X1 were also found (Tables 1 and 2).



**Fig. 1.** Characterisation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalised children with malignancies. The dendrogram was obtained by cluster analysis of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles of ESBL-producing *K. pneumoniae* isolates. Isolates were considered to be related and belong to the same PFGE cluster if their Dice similarity indices were  $\geq 80\%$ . Patients with multiple ESBL-producing Enterobacteriaceae isolates are highlighted in bold and underlined. ST, sequence type; PMQR, plasmid-mediated quinolone resistance. <sup>a</sup>IncFII<sub>K</sub> identified in transformants; plasmid type is based on antibiotic resistance genes content and size (see Section 3.5 and Table 2).

**Table 1**  
Characterisation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae isolates from hospitalised children with malignancies.

Species	Strain/patient <sup>a</sup>	Date	ESBL	PG/ST	PFGE profile	Plasmid Inc group	PMQR genes		ESBL/PMQR plasmid transferred	
							<i>qnrB1</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Inc	AR genes on plasmid <sup>b</sup>
<i>Escherichia coli</i>	1 <b>H</b>	Dec. 09	SHV-12	B1	a	FIB, L/M	–	–	L/M	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub> , <i>strA</i> , <i>sul2</i>
	10 <b>I</b>	Aug. 09	CTX-M-15	B2/ST131	b	FII <sub>K</sub>	+	–	FII <sub>K</sub> (type F)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> <sup>b1</sup>
	37 <b>W</b>	Dec. 09	CTX-M-2	D	c	P, FIB	–	–	P	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> , <i>strA</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>
	47 <b>CC</b>	Jan. 10	CTX-M-15	A	d	FII <sub>K</sub>	+	+		
	48 <b>W</b>	Jan. 10	CTX-M-2	D	c	P, FIB, X1	–	–	P	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> , <i>strA</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>
	53 <b>T</b>	Jan. 10	CTX-M-15	A	e	FII <sub>K</sub>	+	+		
<i>Enterobacter cloacae</i>	57 <b>T</b>	Jan. 10	SHV-12	D	f	I1	–	–		
	14 <b>M</b>	Aug. 09	CTX-M-15	nt	g	–	+	+	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> <sup>b2</sup>
<i>Citrobacter freundii</i>	40 <b>Z</b>	Dec. 09	CTX-M-15	nt	h	FII <sub>K</sub>	+	+	FII <sub>K</sub> (type A)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> <sup>b3</sup>
	28 <b>K</b>	Dec. 09	CTX-M-15	nt	i	FII <sub>K</sub>	+	–		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	32 <b>K</b>	Dec. 09	CTX-M-15	nt	i	FII <sub>K</sub>	+	+		
	24 <b>R</b>	Nov. 09	CTX-M-15	nt	k	FII <sub>K</sub>	+	+		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	50 <b>R</b>	Jan. 10	CTX-M-15	nt	k	FII <sub>K</sub>	+	+		
	51 <b>R</b>	Jan. 10	CTX-M-15	nt	k	FII <sub>K</sub>	+	+		

PG, phylogenetic group; ST, sequence type by multilocus sequence typing; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; Inc, incompatibility; PMQR, plasmid-mediated quinolone resistance; AR, antibiotic resistance; nt, not tested; NT, non-typeable.

<sup>a</sup> Patients with multiple ESBL-producing Enterobacteriaceae isolates are highlighted in bold.

<sup>b</sup> Additional antibiotic resistance genes were found: <sup>b1</sup>*bla*<sub>TEM-1</sub>, *qnrB1*, *strA*, *sul2*, *aac(3')-II*; <sup>b2</sup>*bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *qnrB1*, *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3')-II*, *strA*, *sul2*, *catA1*; <sup>b3</sup>*bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *qnrB1*, *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3')-II*, *strA*, *sul2*, *tet(A)*.

**Table 2**  
Characterisation of IncFII<sub>K</sub> plasmids in transformants obtained from Enterobacteriaceae species isolates from hospitalised children with malignancies.

IncFII <sub>K</sub> type	Size (kb)	$\beta$ -Lactamases			PMQR genes		Additional AR genes				Species or ST	No. of isolates
		CTX-M-15	TEM-1	OXA-1	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrB1</i>	<i>strA</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>aac(3')-II</i>		
A	120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ST416	6
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>K. pneumoniae</i> ST321	2
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>K. pneumoniae</i> ST280	1
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>K. pneumoniae</i> ST628	1
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter cloacae</i>	1
B	100	+	+	+	+	–	+	+	–	+	<i>K. pneumoniae</i> ST280	1
C	120	+	+	+	+	+	+	+	+	–	<i>K. pneumoniae</i> ST626	3
D	100	–	–	+	+	+	–	–	–	+	<i>K. pneumoniae</i> ST323	3
E	220	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>K. pneumoniae</i> ST627	1
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>K. pneumoniae</i> ST416	1
F	100	+	+	–	–	+	+	+	–	+	<i>Escherichia coli</i> B2-O25b-ST131	1

PMQR, plasmid-mediated quinolone resistance; AR, antibiotic resistance; ST, sequence type.

### 3.3. Pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing of Enterobacteriaceae species

Cluster analysis of macrorestriction patterns obtained by *Xba*I PFGE analysis was performed on 36 *K. pneumoniae* isolates. The isolates were divided into seven clusters based on their *Xba*I restriction profiles. Isolates clustering together by PFGE analysis also showed an identical MLST type (Fig. 1). Seven MLST types were found: ST280 (3 isolates); ST321 (5); ST323 (7); ST416 (9); and novel types ST626 (3), ST627 (7) and ST628 (2). *Klebsiella pneumoniae* isolates of ST321, ST323 and ST416 were isolated from different patients during the 8-month sampling period (Fig. 1). Seven *E. coli* isolates showed six different PFGE profiles (Fig. 1). The multiresistant highly virulent epidemic *E. coli* B2-O25b-ST131 clone with CTX-M-15 was detected by PCR and MLST in one patient. Both *E. cloacae* strains isolated from different patients showed <65% band similarity, whereas two *C. freundii* from patient K and three *K. oxytoca* from patient R had identical PFGE profiles (data not shown).

Only in one patient, was more than one ESBL-producing isolate of different species obtained from one rectal swab (Fig. 1; Table 1) (patient K, strains 27, 28, 30 and 32). Nine patients were sampled on more than one occasion during one to three single hospitalisations (highlighted patients in Fig. 1; Table 1;

Supplementary Table S2). In five patients with multiple hospitalisations during the study period, different ESBL-producing clones were isolated during each single hospitalisation incident (patients D, K, T, H and N). On the other hand, the same ESBL-producing strains were observed in four patients (K, L, T and R) during two or three separate hospitalisations with up to 3-month intervals between each of them.

Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.07.016>.

### 3.4. Conjugative transfer of *bla*<sub>ESBL</sub> genes carrying plasmids

Conjugative transfer of ESBL plasmids to *E. coli* and/or *Salmonella* was demonstrated in 27 Enterobacteriaceae isolates (54%). Conjugative transfer of ESBL plasmids was more frequent in *K. pneumoniae* (transfer demonstrated in 61% of isolates) than in other Enterobacteriaceae species (33%). ESBL plasmids were transferred more to *E. coli* (47%) than to *Salmonella* (20%). Resistance to other antibiotic agents (quinolones, aminoglycosides, sulphonamides, tetracycline and SXT) was transferred along with ESBL genes, and IncFII<sub>K</sub> plasmids were found in most transconjugants.



### 3.5. Molecular characterisation of plasmids belonging to incompatibility group FII<sub>K</sub>

A total of 26 ESBL/PMQR-harbouring plasmids (IncFII<sub>K</sub>, IncP and IncL/M) were obtained from transformants for further characterisation. The IncFII<sub>K</sub> plasmid was found in 22 transformants (Table 2). Sequences of the *copA* gene of all IncFII<sub>K</sub> plasmids were identical and showed allele type 7 (<http://pubmlst.org/plasmid/>, accessed 14 May 2012) establishing the RST formula K7:A:-B-. In 11 transformants of different species and *K. pneumoniae* sequence types, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> was found on 120-kb conjugative plasmids along with *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *qnrB1*, *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3')-II*, *strA*, *sul2* and *tet(A)* (Table 2, plasmid type A). IncFII<sub>K</sub> plasmids with differences in size (100 kb and 220 kb) and antibiotic resistance genes were found in the isolates (Table 2).

### 3.6. Molecular characterisation of extended-spectrum β-lactamase plasmids of other incompatibility groups

Transformation of six single ESBL-harbouring non-IncFII<sub>K</sub> plasmids into *E. coli* recipient cells was performed. In transformants from both *E. coli* isolates with *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, the *bla*<sub>CTX-M-2</sub> gene was found on an 80-kb non-conjugative IncP plasmid along with the *strA*, *sul2* and *tet(A)* genes. One transformant from *E. coli* positive for *bla*<sub>SHV-12</sub> was carried by a conjugative IncL/M plasmid. One non-typeable conjugative 140-kb plasmid from *E. cloacae* was detected. This plasmid carrying *bla*<sub>CTX-M-15</sub> contained antibiotic resistance genes also found in most IncFII<sub>K</sub> plasmids in addition to the *catA1* gene conferring chloramphenicol resistance and that was not found in other FII<sub>K</sub> plasmids.

## 4. Discussion

*Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-15 is responsible for nosocomial infections [3,21]. In this study, the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene was found in 76% of Enterobacteriaceae isolates, mainly identified as *K. pneumoniae*. Carbapenems are the most commonly used antibiotics in the treatment of hospital-acquired infections caused by multiresistant *K. pneumoniae* strains. However, the risk of selection and dissemination of carbapenemase-producing strains has to be considered when applying antibiotic strategies and policy in a hospital ward. Colonisation usually precedes infection, and massive colonisation is therefore considered a risk factor for bacteraemia in cancer patients. An empirical therapeutic regimen combining carbapenems and aminoglycosides (amikacin) has been efficiently used in children with febrile neutropenia hospitalised in the paediatric oncology department during the period of this study. No carbapenemase-producing bacteria were found in hospitalised patients (data not shown). The prevalence of ESBL-producing bacteria after changing the first-line antibacterial therapy from TZP in combination with aminoglycosides decreased markedly during January 2010 to September 2011 from 47% to 22% of patients colonised by ESBL-producing bacteria (data not shown).

Cluster analysis and MLST of *K. pneumoniae* isolates showed the dissemination of four major clonal groups in different hospitalised patients (ST321, ST323, ST416 and ST627). Predominance of the four main STs of *K. pneumoniae* isolates sustains the hypothesis of clonal dissemination by patient-to-patient transmission. Different ESBL-producing strains found in the same patient can be assigned to horizontal transfer of ESBL-harbouring plasmids between different bacterial strains in the patient's intestinal flora, as has been previously demonstrated [4]. Analysis of plasmid content in the CTX-M-15-producing isolates in the current study showed that horizontal gene transfer by IncFII<sub>K</sub> plasmid exchange was more probably involved in the dissemination of CTX-M-15

than was single dissemination of particular clones. Plasmids of incompatibility group F are among the most prevalent antibiotic resistance plasmids in Enterobacteriaceae species [10]. Plasmids of the incompatibility group FII were identified as the main vehicles of *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in *E. coli* and *K. pneumoniae*, as well as for other antibiotic genes conferring resistance to tetracyclines, aminoglycosides and fluoroquinolones present on IncFII plasmids along with ESBL genes [4,11,22]. Most of the *K. pneumoniae* isolates as well as other Enterobacteriaceae isolates, including multiresistant epidemiological clone *E. coli* B2-O25b-ST131, in this study harboured large IncFII<sub>K</sub> plasmids with multiple antibiotic resistance genes and showed conjugative ability to *E. coli* as well as *Salmonella*. All of the IncFII<sub>K</sub> plasmids obtained from transformants showed the same RST formula K7:A:-B-, including the ST131 clone. Differences in size of IncFII<sub>K</sub> plasmids (100–220 kb) and various sets of antibiotic resistance genes suggest their strong ability for gene rearrangements and evolution into new variants as described elsewhere [4,10].

Genetic linkage of three β-lactamase genes, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> and *bla*<sub>OXA-1</sub>, as well as additional antibiotic resistance genes such as *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3')-II* and *tet(A)* also found in most IncFII<sub>K</sub> plasmids in this study, has been previously described in plasmids pEK499 and pEK516 isolated in the UK from the *E. coli* ST131 clone and in the pC15-1a plasmid disseminating in *E. coli* clones in Canada [23,24]. All of the plasmids contain a multidrug resistance region (MRR) with the antibiotic resistance genes mentioned above. Recently, this MRR typical for *E. coli* ST131 FII plasmids was found in the 220-kb IncFII<sub>K</sub> plasmid pUUH239.2 [4]. This plasmid was found to be disseminated in *K. pneumoniae* ST16 during a hospital nosocomial outbreak in Sweden. We hypothesise that this MRR is also present in the IncFII<sub>K</sub> plasmids found in this study, but further mapping of this MRR is needed. The current results confirm the great variability of IncFII<sub>K</sub> plasmids and their ability to change rapidly in time to acquire various antimicrobial gene content by acquisition of resistance determinants.

The IncFII<sub>K</sub> plasmids identified in *Klebsiella* are mostly considered as virulence plasmids with the ability to co-exist with other IncFII plasmids in a single cell [10], and their association with such antibiotic resistance genes as *bla*<sub>CTX-M-15</sub> has been documented [25]. Recently, these plasmids with identical antibiotic resistance gene content size (120 kb) were identified in three *K. pneumoniae* ST321 and ST323 isolates from a wastewater treatment plant in Brno, Czech Republic [26]. It seems that these IncFII<sub>K</sub> plasmids are becoming important vehicles of multiple antibiotic resistance genes, including *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in *K. pneumoniae*, and they have the ability to disseminate to, and persist within, other Enterobacteriaceae species, including the multiresistant epidemiological clone *E. coli* B2-O25b-ST131. Additional studies on IncFII<sub>K</sub> plasmids encoding CTX-M-15 from other geographical areas as well as plasmid comparison studies are warranted in order to reveal the mechanism driving the success in spreading these MRR plasmids.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Eva Suchanova and Marie Slavikova for excellent laboratory co-operation. Thanks go to Henrik Hasman and Lina Cavaco from the National Food Institute (Copenhagen, Denmark) for positive control strains. The authors also thank Alessandra Carattoli (Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy) for providing the positive control strains and for help with replicon typing, as well as Pavel Svec (Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University, Brno, Czech Republic) for help with PFGE analysis, and Sebastian Guenther (Institute of Microbiology and Epizootics, Veterinary Faculty, Free University Berlin, Germany) for MLST analysis of an isolate of *E. coli* B2-O25b-ST131. This publication made use of the Plasmid Multi Locus

Sequence Typing website (<http://pubmlst.org/plasmid/>, accessed 28 November 2011) developed by Keith Jolley and sited at the University of Oxford (Oxford, UK).

**Funding:** This study was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM6215712402 and MSM6198959223); the Czech Science Foundation (P502/10/P083); and the European Regional Development Fund and state budget of the Czech Republic for 'CEITEC—Central European Institute of Technology' (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) and for 'RECAMO—Regional Centre for Applied Molecular Oncology' (CZ.1.05/2.1.00/03.0101).

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** Not required.

## References

- [1] Oteo J, Pérez-Vázquez M, Campos J. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact. *Curr Opin Infect Dis* 2010;23:320–6.
- [2] Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 2009;22:664–89.
- [3] Ruiz E, Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Olarte I, Esteban I, Rocha-Gracia R, et al. Outbreak caused by a multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain of new sequence type ST341 carrying new genetic environments of *aac(6')-Ib-cr* and *qnrS1* genes in a neonatal intensive care unit in Spain. *Int J Med Microbiol* 2010;300:464–9.
- [4] Sandegren L, Linkevicius M, Lytsy B, Melhus Å, Andersson DI. Transfer of an *Escherichia coli* ST131 multiresistance cassette has created a *Klebsiella pneumoniae*-specific plasmid associated with a major nosocomial outbreak. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:74–83.
- [5] Damjanova I, Tóth A, Pászti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J, et al. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005—the new 'MRSA's'? *J Antimicrob Chemother* 2008;62:978–85.
- [6] Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F, Brigante G, Perilli M, Amicosante G, et al. CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2700–6.
- [7] Peirano G, Pitout JD. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M  $\beta$ -lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:316–21.
- [8] Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:273–81.
- [9] Johnson TJ, Nolan LK. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009;73:750–4.
- [10] Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:2518–29.
- [11] Novais A, Cantón R, Moreira R, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Emergence and dissemination of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:796–9.
- [12] Maschmeyer G, Hiddemann W, Link H, Cornely OA, Buchheidt D, Glass B, et al. Management of infections during intensive treatment of hematologic malignancies. *Ann Hematol* 1997;75:9–16.
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement. Document M100-S18. Wayne, PA: CLSI; 2008.
- [14] Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:4555–8.
- [15] PulseNet USA. One-day (24–28 h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). <http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli.salmonella.shigella.protocols.pdf> [accessed 01.05.08].
- [16] Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 2005;43:4178–82.
- [17] Clermont O, Dhanji H, Upton M, Gibreel T, Fox A, Boyd D, et al. Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:274–7.
- [18] Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979;7:1513–23.
- [19] Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* 1995;226:235–40.
- [20] Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005;63:219–28.
- [21] Abbassi MS, Torres C, Achour W, Vinué L, Sáenz Y, Costa D, et al. Genetic characterisation of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated from stem cell transplant patients in Tunisia. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32:308–14.
- [22] Krol JE, Nguyen HD, Rogers LM, Beyenal H, Krone SM, Top EM. Increased transfer of a multidrug resistance plasmid in *Escherichia coli* biofilms at the air–liquid interface. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:5079–88.
- [23] Woodford N, Carattoli A, Karisik E, Underwood A, Ellington MJ, Livermore DM. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:4472–82.
- [24] Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGeer A, Muller MP, Willey BM, et al. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3758–64.
- [25] Coelho A, González-López JJ, Miró E, Alonso-Tarrés C, Mirelis B, Larrosa MN, et al. Characterisation of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: plasmid diversity and chromosomal integration. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36:73–8.
- [26] Dolejska M, Frolkova P, Florek M, Jamborova I, Purgertova M, Kutilova I, et al. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:2784–90.

## Příloha 13

LITERAK, I., MICUDOVA, M., TAUSOVA, D., CIZEK, A., DOLEJSKA, M., PAPOUSEK, I., PROCHAZKA, J., VOJTECH, J., BORLEIS, F., GUARDONE, L., GUENTHER, S., HORDOWSKI, J., LEJAS, C., MEISSNER, W., MARCOS, BF., TUCAKOV, M., 2012, Plasmid-mediated quinolone resistance genes in fecal bacteria from rooks commonly wintering throughout Europe: *Microbial Drug Resistance*, v. 18, p. 567-573.

### Souhrn

---

Byl sledován výskyt enterobakterií s plazmidově determinovanou rezistencí k fluorochinolonům v trusu havranů polních na devíti evropských zimovištích. Třetina vzorků obsahovala enterobakterie s PMQR geny různých variant s dominancí *qnrS1*. Byly zjištěny významné rozdíly v prevalenci PMQR pozitivních kmenů mezi jednotlivými lokalitami, které se pohybovaly v rozmezí 3-92 %. Jako migrující ptáci mohou havrani šířit bakterie s klinicky významnou rezistencí k fluorochinolonům na dlouhé vzdálenosti.



# Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Fecal Bacteria from Rooks Commonly Wintering Throughout Europe

Ivan Literak,<sup>1,2</sup> Maria Micudova,<sup>1</sup> Dagmar Tausova,<sup>1</sup> Alois Cizek,<sup>2,3</sup> Monika Dolejska,<sup>1,2</sup> Ivo Papousek,<sup>1</sup> Jakub Prochazka,<sup>1</sup> Jiri Vojtech,<sup>1</sup> Frank Borleis,<sup>4</sup> Lisa Guardone,<sup>5</sup> Sebastian Guenther,<sup>6</sup> Jozef Hordowski,<sup>7</sup> Cyrille Lejas,<sup>8</sup> Wlodzimierz Meissner,<sup>9</sup> Benito Fuertes Marcos,<sup>10</sup> and Marko Tucakov<sup>11</sup>

This study concerned the occurrence of fecal bacteria with plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in rooks (*Corvus frugilegus*, medium-sized corvid birds) wintering in continental Europe during winter 2010/2011. Samples of fresh rook feces were taken by cotton swabs at nine roosting places in eight European countries. Samples were transported to one laboratory and placed in buffered peptone water (BPW). The samples from BPW were enriched and subcultivated onto MacConkey agar (MCA) supplemented with ciprofloxacin (0.06 mg/L) to isolate fluoroquinolone-resistant bacteria. DNA was isolated from smears of bacterial colonies growing on MCA and tested by PCR for PMQR genes *aac(6′)-Ib*, *qepA*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, and *oqxAB*. All the PCR products were further analyzed by sequencing. Ciprofloxacin-resistant bacteria were isolated from 37% (392 positive/1,073 examined) of samples. Frequencies of samples with ciprofloxacin-resistant isolates ranged significantly from 3% to 92% in different countries. The *qnrS1* gene was found in 154 samples and *qnrS2* in 2 samples. The gene *aac(6′)-Ib-cr* was found in 16 samples. Thirteen samples were positive for *qnrB* genes in variants *qnrB6* (one sample), *qnrB18* (one), *qnrB19* (one), *qnrB29* (one), and *qnrB49* (new variant) (one). Both the *qnrD* and *oqxAB* genes were detected in six samples. The genes *qnrA*, *qnrC*, and *qepA* were not found. Wintering omnivorous rooks in Europe were commonly colonized by bacteria supposedly Enterobacteriaceae with PMQR genes. Rooks may disseminate these epidemiologically important bacteria over long distances and pose a risk for environmental contamination.

## Introduction

THE SECOND GENERATION of quinolones (fluoroquinolones) are commonly used in antimicrobial treatment in both human and veterinary medicine worldwide, including Europe. With the continuing development of new quinolone congeners with expanded clinical indications reflecting an expanding antibacterial spectrum for some

members of the fluoroquinolones, understanding as to limitations posed by the occurrence of bacterial resistance to fluoroquinolones is of increasing importance.<sup>17</sup> Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) was identified in Enterobacteriaceae bacteria for the first time in 1998.<sup>31</sup>

Wild bird populations sympatric to areas inhabited by people and areas with high density of livestock have been colonized with antibiotic-resistant strains that probably have

<sup>1</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic.

<sup>2</sup>CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic.

<sup>3</sup>Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic.

<sup>4</sup>Bern, Switzerland.

<sup>5</sup>Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Pisa, Pisa, Italy.

<sup>6</sup>Institute of Microbiology and Epizootics, Veterinary Faculty, Free University Berlin, Berlin, Germany.

<sup>7</sup>Arboretum i Zaklad Fizjografii w Bolestraszycach, Przemysl, Poland.

<sup>8</sup>Federation Departementale de Lutte contre les Organismes Nuisibles d'Ille et Vilaine (FEVILDEC), ZAC Atalante Champeaux, Rennes, France.

<sup>9</sup>Avian Ecophysiology Unit, Department of Vertebrate Ecology and Zoology, Gdansk University, Gdansk, Poland.

<sup>10</sup>Department of Zoology, Faculty of Biology, University of Leon, Leon, Spain.

<sup>11</sup>Institute for Nature Conservation of Vojvodina Province, Novi Sad, Serbia.

been selected by antibiotic practice in humans and domestic animals. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolates have been found in various corvids, including rooks (*Corvus corone*, *C. frugilegus*, *C. macrorhynchos*, *Pica pica*, and *Pyrrhocorax pyrrhocorax*).<sup>3,27,28,32,41</sup> Corvids and gulls feeding on garbage dumps in urbanized areas are frequently colonized with antibiotic-resistant strains of *E. coli* and they are considered to be important reservoirs and vectors of these isolates in the environment.

The rook (*Corvus frugilegus*) is a migrating omnivorous corvid with Palearctic distribution.<sup>12</sup> Large numbers of these birds regularly winter in central and western Europe. Rooks winter mostly in lowlands and they traditionally keep gregarious roosting places. Rooks leave their roosting places during the day to search for food, usually within 10–25 km around their roosting places. In the past, rooks migrated for the winter so far as to such south European countries as Italy and Spain.<sup>4,39</sup> Today, wintering rooks are rare in Italy and only a small sedentary population of rooks winters in Spain. The origin of those rooks wintering still in huge numbers in both central and western parts of continental Europe is mostly in eastern Europe—Russia, Belorussia, and Ukraine. Wintering rooks in central Europe can serve as reservoirs and vectors of *E. coli* and *Salmonella* isolates resistant to old-generation antibiotics and potentially can transmit these isolates over long distances during their migrations.<sup>27</sup>

This study concerned bacterial strains resistant to fluorquinolones, as such strains have emerged recently in gulls in Italy, Portugal, Greenland, and the Czech Republic.<sup>5,10,15,42</sup>

PMQR in *E. coli* isolates from wild birds has been reported very recently for mallards (*Anas platyrhynchos*), herring gulls (*Larus argentatus*), and great cormorants (*Phalacrocorax carbo*) in Poland and Czech Republic.<sup>26,45</sup> Given the scavenging diet of rooks in winter and the long distances traveled, it may be postulated that rooks could be important vectors for disseminating bacteria with PMQR throughout Europe.

## Materials and Methods

### Rooks examined

Samples of rook feces were taken in roosting places throughout Europe during winter 2010/2011, except for France, where samples were collected on 8 April 2011 (Fig. 1). The roosts were used by hundreds or thousands of rooks together with various numbers of other corvids, such as jackdaws (*C. monedula*) or crows (*C. corone* and *C. cornix*). Fecal samples were collected at each location only once. They were picked up individually in the morning from a large plastic film exposed overnight on the ground beneath the roosting place. Rooks were dropping on the film during the evening when they arrived to the roosting place and in early morning when leaving the location. Samples were collected in the Czech Republic (Prerov, 49°28' N, 17°27' E, 12 December 2010, 150 samples), France (Pire sur Seiche, 48°00' N, 1°25' W, 8 April 2011, 31 samples), Germany (Wilhelmshaven, 53°32' N, 8°04' E, 5 February 2011, 100 samples), Italy (San Benedetto Po, 45°2' N, 10°55' E, 27 February 2011, 150 samples), Poland (Gdynia and near vicinity, 54°31' N,

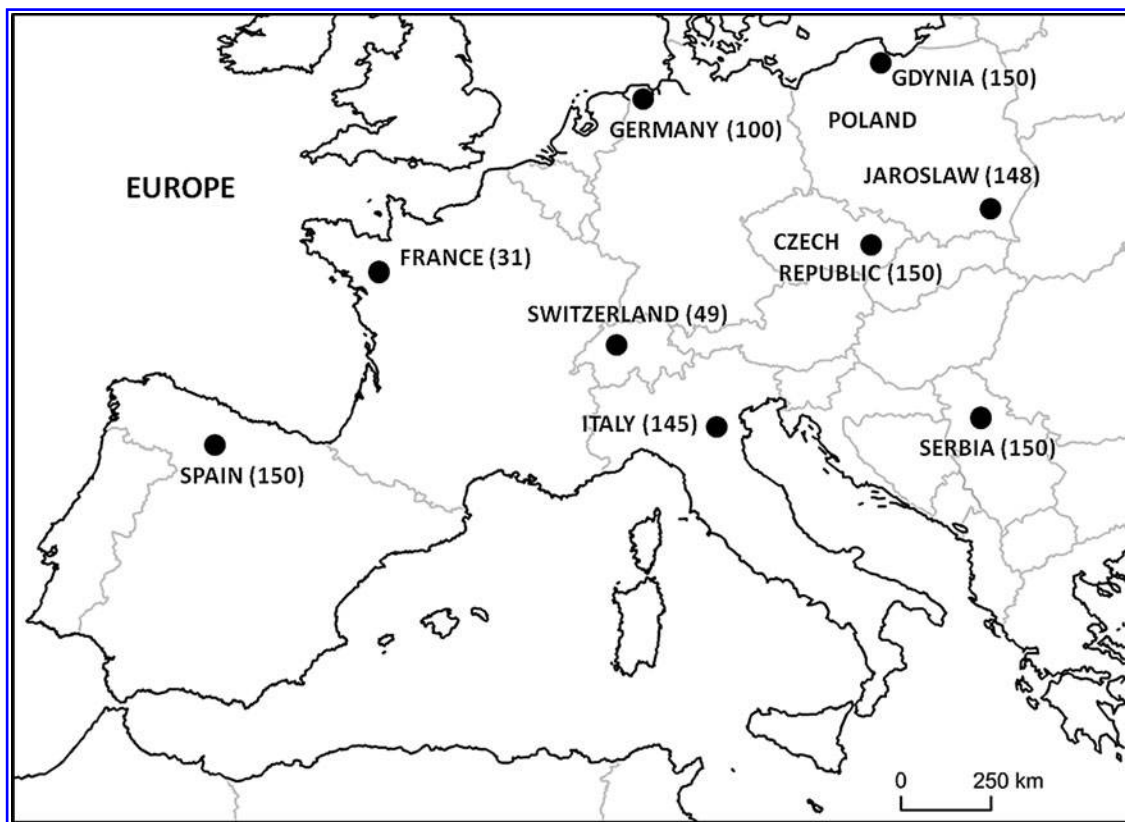


FIG. 1. Map of Europe indicating where fecal samples from rooks (*Corvus frugilegus*) were collected during winter 2010/2011. Full circles indicate locations of sampling. At each location, the number of samples collected is presented in parentheses.



18°33' E, 2–7 February 2011, 150 samples), Poland (Jaroslaw, 50°00' N, 22°41' E, 9 February 2011, 150 samples), Spain (La Baneza, 42°18' N, 5°54' W, 4 February 2011, 150 samples, sedentary population), Serbia (Novi Sad, 45°14' N, 19°51' E, 17 January 2011, 150 samples), and Switzerland (Bern, 46°56' N, 7°26' E, 8 February 2011, 49 samples).

#### Bacteriological examinations and DNA analyses for detecting PMQR

Samples from fresh feces were taken by cotton swabs that were then transported in Amies transport medium to the laboratory and pre-enriched overnight in buffered peptone water (BPW) at 37°C. The samples from BPW were selectively enriched in MacConkey broth and subcultivated onto MacConkey agar (MCA) supplemented with ciprofloxacin (0.06 mg/L) to isolate fluoroquinolone-resistant enterobacteria.

DNA was isolated from smears of bacterial colonies growing on MCA with ciprofloxacin (one smear from one rook sample). The DNA from these colonies was tested by PCR for PMQR genes *aac(6')-Ib*, *qepA*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, and *oqxAB* (Table 1).<sup>7,9,23,24,35,36,38,47</sup> All the PCR products were further analyzed by sequencing (ABI 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

In each case of a sample where new variants of PMQR genes might possibly appear, a smear of unidentified bacteria from each sample was frozen at –80°C for later bacterial

species determination. In such case, the bacteria were cultivated on MCA supplemented with ciprofloxacin (0.06 mg/L) and subsequently identified using the API 20E system (bio-Merieux).

#### Results

In total, 1,073 samples of rook feces were collected. Ciprofloxacin-resistant bacteria supposedly Enterobacteriaceae were isolated from 392 (37%) samples (Table 2). Proportions of samples with bacteria resistant to ciprofloxacin ranged greatly—from 3% to 92%—in the different countries. The highest frequencies of ciprofloxacin-resistant Enterobacteriaceae bacteria of 92%, 69%, and 41% were found in the Czech Republic and the two locations in Poland, respectively. Numbers of samples with PMQR genes ranged from 0% to 60% in different countries and the highest frequencies of 60%, 27%, and 14% were again in the Czech Republic and the two locations in Poland, respectively.

The most numerous gene *qnrS* was found in 156 samples originating mainly from the Czech Republic and Poland. Sequence analysis of the *qnrS* genes showed the presence of two variants, *qnrS1* and *qnrS2*. The gene *qnrS1* occurred most frequently and was found in 154 samples, while *qnrS2* was identified in two samples.

The fluoroquinolone-aminoglycoside resistance gene *aac(6')-Ib-cr* was the gene second most frequently detected in rook feces. It was found in 16 (1.5%) samples. The *aac(6')-Ib-*

TABLE 1. PRIMERS FOR PLASMID-MEDIATED QUINOLONE RESISTANCE GENES USED IN THIS STUDY

Primers	Sequence (5'–3')	Target gene	Annealing temperature (°C)	Amplicon size (bp)	Positive control	Reference
qnrA-F	ATT TCT CAC GCC AGG ATT TG	<i>qnrA</i>	53	516	<i>Escherichia coli</i>	38
qnrA-R	GAT CGG CAA AGG TTA GGT CA				J53 pMG252	
qnrB-F	GAT CGT GAA AGC CAG AAA GG	<i>qnrB</i>	53	476	<i>E. coli</i> J53	23
qnrB-R	ATG AGC AAC GAT GCC TGG TA				pMG298	
qnrB_VI	CTARCCAATMAYCGCGATGCCAAG	<i>qnrB</i>	53	645	<i>E. coli</i> J53	Primers designed for this study
qnrB_VII	ATGRCTCTGGCRRTTAGTTRGCGAAA				pMG298	
qnrB19.seq1F	ATG ACT CTG GCA TTA GTT GG	<i>qnrB19</i>	53	411	<i>E. coli</i>	11
qnrB19.seq1R	CCA CAG CTC ACA CTT TTC CA	part 1			DH5T15	
qnrB19.seq2F	TGC CAT TTT CAA AAG CTG TG	<i>qnrB19</i>	53	457	<i>E. coli</i>	11
qnrB19.seq2R	GTA ACC AAT CAC AGC GAT GC	part 2			DH5T15	
qnrC-F	GGG TTG TAC ATT TAT TGA ATC G	<i>qnrC</i>	53	307	<i>E. coli</i> DH10B	23
qnrC-R	CAC CTA CCC ATT TAT TTT CA				pHsII Tf1	
qnrS-F	GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT	<i>qnrS</i>	53	428	<i>E. coli</i> J53	6
qnrS-R	TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG				pMG306	
qnrS1.seq1F	ATGGAAACCTACAATCATACATATCG	<i>qnrS1</i>	55	443	<i>E. coli</i> J53	11
qnrS1.seq1R	TTCGTTCTATCCAGCGATT	part1			pMG306	
qnrS1.seq2F	TTC GTG ATG CAA GTT TCC AA	<i>qnrS1</i>	55	467	<i>E. coli</i> J53	11
qnrS1.seq2R	TTA GTC AGG ATA AAC AAC AAT AAC C	part2			pMG306	
qnrD-F	CGA GAT CAA TTT ACG GGG AAT A	<i>qnrD</i>	55	582	<i>E. coli</i> TG1	8
qnrD-R	AAC AAG CTG AAG CGC CTG				p2007057 Tf1	
<i>aac(6')Ib</i> -F	TTG CGA TGC TCT ATG AGT GGC TA	<i>aac(6')-Ib</i>	55	482	<i>Salmonella</i>	35
<i>aac(6')Ib</i> -R	CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT				Infantis 14	
qepA-F	TGG TCT ACG CCA TGG ACC TCA	<i>qepA</i>	53	1136	<i>E. coli</i> 20III-09	36
qepA-R	TGA ATT CGG ACA CCG TCT CCG					47
oqxBs	TTCTCCCCGGCGGGAAGTAC	<i>oqxB</i>	64	512	<i>E. coli</i> CSH26	24
oqxBa2	CTCGCCCATTTTGGCGGTA				RifR/pOLA52	
oqxA-F	CTCGGCGCGATGATGCT	<i>oqxA</i>	60	392	<i>E. coli</i> CSH26	24
oqxA-R	CCACTCTTCACGGGAGACGA				RifR/pOLA52	

TABLE 2. PLASMID-MEDIATED QUINOLONE RESISTANCE GENES IN FECAL BACTERIAL SAMPLES FROM ROOKS (*CORVUS FRUGILEGUS*) WINTERING IN EUROPE DURING WINTER 2010/2011

	Czech Republic	France	Germany	Italy	Poland, Gdynia	Poland, Jaroslaw	Spain	Serbia	Switzerland	Total (%)
No. of samples	150	31	100	145	150	148	150	150	49	1,073 (100)
No. of samples with bacteria resistant to ciprofloxacin (%)	139 (92)	1 (3)	20 (20)	9 (6)	104 (69)	61 (41)	26 (17)	30 (20)	2 (4)	392 (37)
No. of samples with plasmid-mediated quinolone resistance genes	89 (60)	0 (0)	9 (9)	1 (0.7)	40 (27)	20 (14)	9 (6)	7 (5)	0 (0)	175 (16)
No. of samples with <i>qnrA</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	— (0)
No. of samples with <i>qnrB6</i>	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1 (0.1)
No. of samples with <i>qnrB18</i>	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1 (0.1)
No. of samples with <i>qnrB19</i>	3	—	—	—	6	—	—	—	—	9 (1)
No. of samples with <i>qnrB29</i>	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1 (0.1)
No. of samples with <i>qnrB49</i>	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1 (0.1)
No. of samples with <i>qnrC</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	— (0)
No. of samples with <i>qnrD</i>	4	—	—	—	—	2	—	—	—	6 (0.6)
No. of samples with <i>qnrS1</i>	82	—	4	—	38	15	9	6	—	154 (14)
No. of samples with <i>qnrS2</i>	2	—	—	—	—	—	—	—	—	2 (0.2)
No. of samples with <i>aac(6′)-Ib-cr</i>	8	—	7	—	—	—	—	1	—	16 (1.5)
No. of samples with <i>oqxAB</i>	4	—	—	—	—	1	—	1	—	6 (0.6)
No. of samples with <i>qepA</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	— (0)

*cr*-positive samples originated mainly from the Czech Republic (eight samples) and Germany (seven). Thirteen samples were positive for the *qnrB* genes. These samples originated from the Czech Republic, Poland, and Italy. The *qnrB* genes were identified as the *qnrB6* (one sample), *qnrB18* (one), *qnrB19* (nine), and *qnrB29* (one) variants. A new variant of the *qnrB* gene was found in one sample. The nucleotide sequence of this gene was compared with other *qnrB* genes available in the GenBank database using BLAST sequence analysis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The new gene variant differed from the *qnrB20* in two nucleotides (GenBank Accession No. AB379831), meaning one amino acid substitution (Ala156Thr). The new variant was classified as *qnrB49*. The full sequence of this gene is included in GenBank under the accession number JQ582718. Retrospective analysis of the sample positive for the *qnrB* new variant showed this new variant to be present in two isolates of *Citrobacter freundii* isolated from a rook fecal sample collected in San Benedetto Po, Italy, on 27 February 2011.

Both the genes *qnrD* and *oqxAB* were detected in six (0.6%) different samples, four of which were collected in the Czech Republic. The genes *qnrA*, *qnrC*, and *qepA* were not detected in any rook fecal sample.

## Discussion

In 2003, a single clone of *Shigella flexneri* was found to be resistant to ciprofloxacin and this strain was also harboring a unique conjugative plasmid that transferred quinolone resistance.<sup>16</sup> Cloning identified an open reading frame encoding a 218-amino-acid protein of the pentapeptide repeat family that was named QnrS (the gene is named *qnrS1*). A *qnrS* variant, *qnrS2*, was detected on a plasmid from *Salmonella enterica* serovar Anatum.<sup>14</sup> The *qnrS* gene has been identified as the most prevalent PMQR gene.<sup>25</sup> This gene has been detected in quinolone-resistant human, poultry, and swine *E. coli* and *Salmonella* isolates.<sup>8,18,48</sup> The *qnrS1* gene was predominant in

the fecal bacteria from rooks throughout Europe. Rooks excreted feces with these bacteria commonly in the Czech Republic, both Polish locations, Spain, Serbia, and Germany. We consider that the sources of these bacteria could be food animals and their products and/or excrements because *Salmonella* and/or *E. coli* isolates with the *qnrS1* gene were found recently in food and turkeys in Germany; in cattle, pigs, chickens, and turkeys in Poland; in sheep in Italy; and in chickens in Spain.<sup>46</sup> The *qnrS1* gene was predominant among the *qnr* genes found in *S. enterica* and *E. coli* isolates from animals, humans, food, and the environment in 13 European countries,<sup>46</sup> and these findings accord with the result in rooks.

Two samples of rook feces obtained in the Czech Republic were positive for the *qnrS2* gene. This gene has been detected recently in *Aeromonas* spp. isolates recovered from diseased fish and water environments in different parts of Asia and in Switzerland, as well as from human clinical isolates in Spain.<sup>1,6,30,37</sup> The gene *qnrS2* has been found also in clinical isolates of *Salmonella* in Japan.<sup>44</sup> We report the *qnrS2* gene in bacteria from wild birds for the first time.

The spectrum of *qnrB* genes is broader than those of *qnrA* and *qnrS*.<sup>43</sup> While studying strains of *Klebsiella pneumoniae*, Jacoby *et al.*<sup>22</sup> found the PMQR gene *qnrB1*. A number of other variants (from *qnrB2* to *qnrB48*) were found subsequently among various Enterobacteriaceae ([www.lahey.org/qnrstudies](http://www.lahey.org/qnrstudies), accessed 13 February 2012). From all the *qnrB* genes, *qnrB19* was predominant in the fecal bacteria obtained from rook feces. This gene has very recently been demonstrated to be prevalent in Enterobacteriaceae from food-producing animals in different parts of Europe and in Nigeria, from humans in South America and the Netherlands, and from horses in the Czech Republic.<sup>11,13,19,34,46</sup> It seems that the frequency of the *qnrB19* gene in rooks reflects the general situation in domestic animals and humans in Europe.

Moreover, the genes *qnrB6*, *qnrB18*, and *qnrB29* were present in rook samples obtained from the Czech Republic



and Poland. The gene *qnrB6* has been detected mainly in clinical isolates of Enterobacteriaceae bacteria in China and Spain, in isolates obtained from dogs and ducks, and from the environment in China.<sup>29,40,49,50</sup> Until now, the genes *qnrB18* and *qnrB29* had been found only in *Citrobacter freundii* isolates in Spain and Korea (GenBank Accession No. AM919399; GenBank Accession No. HM439649). Our rare findings of these genes provide the first evidence of their occurrence in European wildlife.

Six variants of *qnrB* (*qnrB2*, *qnrB4*, *qnrB6*, *qnrB7*, *qnrB12*, and *qnrB19*) were recently identified among PMQR *Salmonella* and/or *E. coli* isolates from Germany, Poland, and Spain.<sup>46</sup> Most of the *qnrB*-positive isolates in that study originated from turkeys. Hence, turkeys should be considered an important source for rooks of fecal bacteria carrying *qnrB* genes.

The new variant of the *qnrB* gene was found in *Citrobacter freundii* from a rook in Italy. Most known variants of the *qnrB* gene have been discovered from *Citrobacter freundii*, a potential reservoir for new variants of this gene.<sup>21</sup>

Another gene, designated *qnrD*, was found in *S. enterica* isolates, and it was transferable on small plasmids of about 4.3 kb.<sup>9</sup> This gene encodes a 214-amino-acid pentapeptide repeat protein designated QnrD. Six samples of rook feces obtained in the Czech Republic and Poland were positive for *qnrD*. This gene was recently identified in PMQR *Salmonella* isolates from Italy and Spain.<sup>46</sup> Most of the *qnrD*-positive isolates in that study originated from laying hens in Spain, while some isolates with the *qnrD* gene originated from chickens, turkeys, and food in Italy. Hence, chickens and turkeys should be considered as sources of fecal bacteria carrying *qnrD* genes found in rooks. In addition, *qnrD* has been detected in *E. coli* isolates obtained from pigs in China and in clinical isolates of *Proteus* and *Pseudomonas* in Nigeria.<sup>33,49</sup>

An additional important PMQR gene is *aac(6′)-Ib-cr*. It encodes a specific aminoglycoside acetyltransferase, AAC(6′)-Ib-cr, that confers increase of minimum inhibitory concentration selectively for norfloxacin and ciprofloxacin.<sup>38</sup> The gene *aac(6′)-Ib-cr*, like its parent *aac(6′)-Ib*, is an integron cassette with an associated *attC* site. It is hence found in various integrons, but especially on IncFII plasmids expressing CTX-M-15 that have spread rapidly such that CTX-M-15 has become the predominant extended-spectrum beta-lactamase in many countries throughout the world. The gene *aac(6′)-Ib-cr* has been associated with other PMQR genes and with other beta-lactamases. In our study, *aac(6′)-Ib-cr* was the gene second most frequently detected in rook feces and mainly among those obtained in the Czech Republic and Germany. In a contrast to our study, the *aac(6′)-Ib-cr* gene has only exceptionally been identified in PMQR Enterobacteriaceae bacteria in Europe.<sup>46</sup>

The plasmid-mediated quinolone transporter OqxAB was found in several samples. OqxAB is a multidrug efflux pump that confers resistance to quinolone, quinoloxaline, and other agents, including chloramphenicol. Plasmid-mediated OqxAB has been detected in human clinical *E. coli* and the *oqxAB* gene was also found on the chromosome of *K. pneumoniae*.<sup>24</sup> Moreover, the *oqxAB* gene has been found in *E. coli* strains from pigs, chicken, farm workers, and a farm environment.<sup>47</sup> In our study, we report the first isolation of *oqxAB* gene in bacteria originating from wild animals.

Migratory birds in close contact with humans and domestic animals, such as rooks, can play an important role in

the dispersion of *E. coli* and *Salmonella* isolates resistant to old-generation antimicrobials.<sup>27</sup> The sources colonizing rooks with these isolates could be food and/or drinking water. Direct observation in the field has shown rooks to have an omnivorous feeding pattern in agricultural, rural, and urban areas during winter.<sup>20</sup> Outside of the breeding season, huge flocks of this species forage in communal refuse dumps, which still exist in central and eastern Europe.<sup>2</sup> Thus, rooks could be colonized with antibiotic-resistant bacteria, including PMQR bacteria, from both animal and human sources even if their populations are not directly influenced by antibiotic practice. Consequently, once infected, rooks may disseminate these bacteria over long distances throughout Europe and pose a risk for environmental contamination.

Being congregative medium-sized birds, rooks excrete locally in various European countries large quantities of fecal coliforms. They are capable through their feces to contaminate environments inhabited by humans and domestic animals. It is important to prevent these birds from feeding on garbage dumps, the main suspected source of resistant bacteria and including bacteria with PMQR. Not to supply food for these birds is a simple way of limiting potential problems. The common occurrence of PMQR bacteria supposedly Enterobacteriaceae in populations of wild rooks, where there is no selective pressure, can imply that such resistance will be difficult to displace.

### Acknowledgments

The authors thank Francisco de la Calzada, Joanna Drozdowska, Dragan Fabijan, Sebastian Franco, Susanne Homma, Iva Jamborova, Ruben Gonzales Janez, Jiri Klimes, Adam Konecny, Tomas Lang, Zuzana Markova, Veronika Oravcova, Radim Petro, Marko Sciban, Marie Slavikova, Eva Suchanova, and Raluca Uricariu for excellent cooperation in the field or in the laboratory. Our thanks go to Lars Hansen (University of Copenhagen, Denmark), and Lina Cavaco and Henrik Hasman (National Food Institute, Copenhagen, Denmark) for control strains. This study was funded by Grant No. MSM6215712402 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, and the project "CEITEC—Central European Institute of Technology" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from the European Regional Development Fund.

### Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

### References

1. **Arias, A., C. Seral, F. Navarro, E. Miro, P. Coll, and F.J. Castillo.** 2010. Plasmid-mediated QnrS2 determinant in an *Aeromonas caviae* isolate recovered from a patient with diarrhoea. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**:1005–1007.
2. **Betleja, J., and W. Meissner.** 2005. The occurrence of corvids *Corvidae* on rubbish-dumps in Poland in 2002–2004. In L. Jerzak, B.P. Kavanagh, and P. Tryjanowski (eds.), *Corvids of Poland*. Bogucki Scientific Press, Poznan, pp. 207–214 (In Polish with summary in English).
3. **Blanco, G., J.A. Lemus, and J. Grande.** 2009. Microbial pollution in wildlife: linking agricultural manuring and bacterial antibiotic resistance in red-billed choughs. *Environ. Res.* **109**:405–412.

4. **Bogliani, G.** 1985. Distribuzione ed ecologia del corvo, *Corvus frugilegus*, svernante in Italia. Riv. Ital. Orn. Milano 55:140–150.
5. **Camarda, A., E. Circella, D. Pennelli, A. Madio, G. Bruni, V. Lagrasta, G. Marzano, E. Mallia, and E. Campagnari.** 2006. Wild birds as biological indicators of environmental pollution: biotyping and antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from Audouin's gulls (*Larus audouinii*) living in the Bay of Gallipoli (Italy). Italian. J. Anim. Sci. 5:287–290.
6. **Cattoir, V., L. Poirel, C. Aubert, C.-J. Soussy, and P. Nordmann.** 2008. Unexpected occurrence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. Emerg. Infect. Dis. 14:231–237.
7. **Cattoir, V., L. Poirel, V. Rotimi, C.J. Soussy, and P. Nordmann.** 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. J. Antimicrob. Chemother. 60:394–397.
8. **Cavaco, L.M., N. Frimodt-Moller, H. Hasman, L. Guardabassi, L. Nielsen, and F.M. Aarestrup.** 2008. Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and swine in Denmark. Microb. Drug Resist. 14:163–169.
9. **Cavaco, L.M., H. Hasman, S. Xia, and F.M. Aarestrup.** 2009. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovars Kentucky and Bovismorbificans of human origin. Antimicrob. Agents Chemother. 53:603–608.
10. **Dolejska, M., B. Bierosova, L. Kohoutova, I. Literak, and A. Cizek.** 2009. Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. J. Appl. Microbiol. 106:1941–1950.
11. **Dolejska, M., E. Duskova, J. Rybarikova, D. Janoszowska, E. Roubalova, K. Dibdakova, G. Maceckova, L. Kohoutova, I. Literak, J. Smola, and A. Cizek.** 2011. Plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. J. Antimicrob. Chemother. 66:757–764.
12. **dos Anjos, L.** 2009. Family Corvidae (Crows). In J. del Hoyo, A. Elliot, and D.A. Christie (eds.), Handbook of the Bird of the World. Vol 14. Bush-shrikes to Old World Sparrows. Lynx Edicions, Barcelona, pp. 494–640.
13. **Fortini, D., K. Fashae, A. Garcia-Fernandez, L. Villa, and A. Carattoli.** 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance and  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* from healthy animals from Nigeria. J. Antimicrob. Chemother. 66:1269–1272.
14. **Gay, K., A. Robicsek, J. Strahilevitz, C.H. Park, G. Jacoby, T.J. Barrett, F. Medalla, T.M. Chiller, and D.C. Hooper.** 2006. Plasmid mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. Clin. Infect. Dis. 43:297–304.
15. **Gionechetti, F., P. Zucca, F. Gombac, C. Monti-Bragadin, C. Lagatolla, E. Tonin, E. Edalucci, L.A. Vitali, and L. Dolzani.** 2008. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons in Enterobacteriaceae isolated from Mediterranean herring gulls (*Larus cachinans*). Microb. Drug Resist. 14:93–99.
16. **Hata, M., M. Suzuki, and M. Matsumoto.** 2005. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. Antimicrob. Agents Chemother. 49:801–803.
17. **Hooper, D.C., and E. Rubinstein.** 2003. Quinolone Antimicrobial Agents, 3rd edition. ASM Press, Washington, D.C., 485 pp.
18. **Hopkins, K.L., L. Wootton, M.R. Day, and E.J. Threlfall.** 2007. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* found in *Salmonella enterica* strains isolated in the UK. J. Antimicrob. Chemother. 59:1071–1075.
19. **Hordijk, J., A.B. Bosman, A. van Essen-Zandbergen, K. Veldman, C. Dierikx, J.A. Wagenaar, and D. Mevius.** 2011. *qnrB19* gene bracketed by IS26 on a 40-kilobase IncR plasmid from an *Escherichia coli* isolate from a veal calf. Antimicrob. Agents Chemother. 55:453–454.
20. **Hubalek, Z., and V. Kubik.** 1983. Roosts and habits of *Corvus frugilegus* wintering in Czechoslovakia. Acta Sci. Nat. Acad. Sci. Bohemoslovaca Brno 17:1–52.
21. **Jacoby, G.A., C.M. Griffin, and D.C. Hooper.** 2011. *Citrobacter* spp. as a source of *qnrB* alleles. Antimicrob. Agents Chemother. 55:4979–4984.
22. **Jacoby, G.A., K.E. Walsh, D.M. Mills, V.J. Valker, H. Oh, A. Robicsek, and D.C. Hooper.** 2006. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 50:1178–1182.
23. **Kim, H.B., C.H. Park, C.J. Kim, E.C. Kim, G.A. Jacoby, and D.C. Hooper.** 2009a. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. Antimicrob. Agents Chemother. 53:639–645.
24. **Kim, H.B., M. Wang, C.H. Park, E.C. Kim, G.A. Jacoby, and D.C. Hooper.** 2009b. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of Enterobacteriaceae. Antimicrob. Agents Chemother. 53:3582–3584.
25. **Lavilla, S., J.J. Gonzalez-Lopez, M. Sabate, A. Garcia-Fernandez, M.N. Larrosa, R.M. Bartolome, A. Carattoli and G. Prats.** 2008. Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. J. Antimicrob. Chemother. 61:291–295.
26. **Literak, I., M. Dolejska, M. Janoszowska, J. Hrusakova, W. Meissner, H. Rzyaska, S. Bzoma, and A. Cizek.** 2010. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and *qnrS*, in waterbirds on the Baltic Sea coast of Poland. Appl. Environ. Microbiol. 76:8126–8134.
27. **Literak, I., R. Vanko, M. Dolejska, A. Cizek, and R. Karpiskova.** 2007. Antibiotic resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* in Russian rooks (*Corvus frugilegus*) wintering in the Czech Republic. Lett. Appl. Microbiol. 45:616–621.
28. **Livermore, D.M., M. Warner, L.M.C. Hall, V.I. Enne, S.J. Projan, P.M. Dunman, S.L. Wooster, and G. Harrison.** 2001. Antibiotic resistance in bacteria from magpies (*Pica pica*) and rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from west Wales. Environ. Microbiol. 3:658–661.
29. **Ma, J.Y., Z.L. Zeng, Z., X. Xu, X.Y. Wang, Y.T. Deng, D.H. Lu, L.Z. Huang, Y.Y. Zhang, L.H. Liu, and M.G. Wang.** 2009. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6′)-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals. Antimicrob. Agents Chemother. 53:519–524.
30. **Majumdar, T., B. Das, R.K. Bhadra, B. Dam, and S. Mazumder.** 2011. Complete nucleotide sequence of a quinolone resistance gene (*qnrS2*) carrying plasmid of *Aeromonas hydrophila* isolated from fish. Plasmid 66:79–84.
31. **Martinez-Martinez, L., A. Pascual, and G.A. Jacoby.** 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet 351:797–799.

32. Nakamura, M., H. Yoshimura, and T. Koeda. 1982. Drug resistance and R plasmids of *Escherichia coli* strains isolated from six species of wild birds. *Jpn. J. Vet. Sci.* **44**:465–471.
33. Ogbolu, D.O., O.A. Daini, A. Ogunledun, A.O. Alli, and M.A. Webber. 2011. High levels of multidrug resistance in clinical isolates of Gram-negative pathogens from Nigeria. *Int. J. Antimicrob. Agents* **37**:62–66.
34. Pallecchi, L., E. Riccobono, A. Mantella, F. Bartalesi, S. Sennati, H. Gamboa, E. Gotuzzo, A. Bartoloni, and G.M. Rossolini. 2009. High prevalence of *qnr* genes in commensal enterobacteria from healthy children in Peru and Bolivia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:2632–2635.
35. Park, C.H., A. Robicsek, G.A. Jacoby, D. Sahm, and D.C. Hooper. 2006. Prevalence in the United States of *aac(6')Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:3953–3955.
36. Perichon, B., P. Courvalin, and M. Galimand. 2007. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by *qepA*-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2464–2469.
37. Picao, R.C., L. Poirel, A. Demarta, C.S. Ferreira Silva, A.R. Corvaglia, O. Petrini, and P. Nordmann. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**: 948–950.
38. Robicsek, A., J. Strahilevitz, G.A. Jacoby, M. Macielag, D. Abbanat, C.H. Park, K. Bush, and D.C. Hooper. 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* **12**: 83–88.
39. Roman, J., and C. Gutierrez. 2009. La graja *Corvus frugilegus* deja de invernar en Espana: Un nuevo caso de acortamiento en las migraciones? *Ardeola* **55**:229–235.
40. Sanchez-Cespedes, J., S. Marti, S.M. Soto, V. Alba, C. Melcion, M. Almela, F. Marco, and J. Vila. 2009. Two chromosomally located *qnrB* variants, *qnrB6* and the new *qnrB16*, in *Citrobacter* spp. isolates causing bacteraemia. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**:1132–1138.
41. Sato, G., C. Oka, M. Asagi, and N. Ishiguro. 1978. Detection of conjugative R plasmids conferring chloramphenicol resistance in *Escherichia coli* isolated from domestic and feral pigeons and crows. *Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. I Abt. Orig. A* **241**:407–417.
42. Sjolund, M., J. Bonnedahl, J. Hernandez, S. Bengtsson, G. Cederbrant, J. Pinhassi, G. Kahlmeter, and B. Olsen. 2008. Dissemination of multidrug-resistant bacteria into Arctic. *Emerg. Infect. Dis.* **14**:70–72.
43. Strahilevitz, J., G.A. Jacoby, D.C. Hooper, and A. Robicsek. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**:664–689.
44. Taguchi, M., R. Kawahara, K. Seto, K. Inoue, A. Hayashi, N. Yamagata, K. Kamakura, and E. Kashiwagi. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella* isolated from patients with overseas travelers' diarrhea in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **62**:312–314.
45. Tausova, D., M. Dolejska, A. Cizek, L. Hanusova, J. Hrusakova, O. Svoboda, G. Camlik, and I. Literak. 2012. *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**:1103–1107.
46. Veldman, K., L.M. Cavaco, D. Mevius, A. Battisti, A. Franco, N. Botteldorn, M. Bruneau, A. Perrin-Gyomard, T. Cerny, C.D. Escobar, B. Guerra, A. Schroeter, M. Gutierrez, K. Hopkins, A.L. Myllyniemi, M. Sunde, D. Wasyl, and F.M. Aarestrup. 2011. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**:1278–1286.
47. Yamane, K., J. Wachino, S. Suzuki, and Y. Arakava. 2008. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 1564–1566.
48. Yue, L., H.X. Jiang, X.P. Liao, J.H. Liu, S.J. Li, X.Y. Chen, C.X. Chen, D.H. Lu, and Y.H. Liu. 2008. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* **132**:414–420.
49. Zhao, J., Z. Chen, S. Chen, Y.T. Deng, Y.H. Liu, W. Tian, X.H. Huang, C.M. Wu, Y.X. Sun, Y. Sun, Z.L. Zeng, and J.H. Liu. 2010. Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:4219–4224.
50. Zhou, T.L., X.J. Chen, M.M. Zhou, Y.J. Zhao, X.H. Luo, and Q.Y. Bao. 2011. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates in Wenzhou, Southern China, 2002–2008. *Jpn. J. Infect. Dis.* **64**:55–57.

Address correspondence to:

Ivan Literak, D.V.M., Ph.D.

Department of Biology and Wildlife Diseases

Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology

University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Palackeho 1-3

612 42 Brno

Czech Republic

E-mail: literaki@vfu.cz



## Příloha 14

DOLEJSKA, M., VILLA, L., HASMAN, H., HANSEN, L., CARATTOLI, A., 2013, Characterization of IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnr* genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, environment and humans: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 333-339.

### Souhrn

---

Byla provedena komparativní analýza sbírky IncN plazmidů nesoucích geny *qnr* a *bla*<sub>CTX-M-1</sub> za využití RFLP, pMLST a hybridizace se specifickými sondami. U vybraných plazmidů byla stanovena primární nukleotidová sekvence metodou nové generace sekvenování a bioinformatickým zpracováním dat. Plazmidy pocházely z nepříbuzných kmenů *E. coli* a *Salmonella* spp. z lidí, různých skupin zvířat a prostředí v Evropě. Byly identifikovány příbuzné plazmidy cirkulující u humánních i animálních izolátů. Studie dokumentuje význam epidemických IncN plazmidů v šíření rezistence k cefalosporinům a fluorochinolonům.





## Characterization of IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnr* genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans

Monika Dolejska<sup>1,2</sup>, Laura Villa<sup>3</sup>, Henrik Hasman<sup>4</sup>, Lars Hansen<sup>4</sup> and Alessandra Carattoli<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic; <sup>2</sup>CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic; <sup>3</sup>Department of Infectious, Parasitic and Immune-Mediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy; <sup>4</sup>Research Group for Microbial Genomics and Antimicrobial Resistance, National Food Institute, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark

\*Corresponding author. Tel: +39-06-4990-3128; Fax: +39-06-4938-7112; E-mail: alecara@iss.it

Received 18 June 2012; returned 27 July 2012; revised 20 August 2012; accepted 2 September 2012

**Objectives:** The aim of the study was to characterize a collection of *Escherichia coli* and *Salmonella* harbouring *qnr* and *bla*<sub>CTX-M-1</sub> genes on IncN plasmids isolated from humans, food-producing, companion and wild animals, and the environment from six European countries.

**Methods:** Nineteen IncN plasmids were compared using restriction fragment length polymorphism (RFLP), plasmid multilocus sequence typing (pMLST) and hybridization with *repN*, *qnrS1*, *qnrB19* or *bla*<sub>CTX-M-1</sub> probes. Plasmids pKT58A and pHHA45 were sequenced using the 454-Genome Sequencer FLX platform on a library constructed from plasmid DNA purified from the respective *E. coli* transformants.

**Results:** Three types of IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *qnrS1* and *qnrB19* genes were identified in strains isolated from the Czech Republic, Poland, Slovakia, Denmark, Italy and the Netherlands, corresponding to pMLST sequence type (ST) 1, ST3 and ST8, respectively. Related plasmids circulating in human and animal isolates were identified. Complete nucleotide sequences of the ST1 pHHA45 plasmid carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, isolated from *E. coli* from pigs in Denmark, and the ST3 pKT58A plasmid harbouring *qnrS1*, identified in *E. coli* from a water bird, were obtained.

**Conclusions:** Our results demonstrated wide distribution of specific IncN plasmids disseminating *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnr* genes among animals and humans in Europe.

**Keywords:** quinolone resistance, ESBLs, plasmid MLST

### Introduction

Plasmids of the incompatibility N group (IncN) have a broad host range, conjugate at high frequency and are stably maintained in the bacterial host cell thanks to partitioning and antirestriction systems.<sup>1</sup> IncN plasmids show a relatively high prevalence in faecal flora of healthy animals (10.9%) and in bacterial populations not pre-selected for antimicrobial resistance, and are one of the major vehicles for the dissemination of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) CTX-M-1 and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from humans, animals and the environment.<sup>2–10</sup> The plasmid multilocus sequence typing (pMLST) database (<http://pubmlst.org/plasmid/>, 5 August 2012) contains 112 entries of bacterial isolates carrying IncN plasmids from Europe, the USA, China and Australia, assigned to 13 different

sequence types (STs).<sup>7</sup> Sixty-seven IncN plasmids belong to ST1 (60%) and 56 of them (50%) carry the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene. ST1 plasmids included in the database are from *E. coli* and *Salmonella* from humans, poultry, pigs, cattle, companion animals and the environment and were obtained from Denmark, Germany, Italy, Greece and the Netherlands. The second most prevalent IncN plasmid type is ST11 (15 entries, 13%), which had, however, a limited diffusion being associated with the local spread of the carbapenemase VIM in Greece. The third and fourth most frequent IncN types are ST8 ( $n=8$ , 7%) and ST3 ( $n=7$ , 6%), carrying *bla*<sub>CTX-M</sub> or *qnr* genes, detected in several European countries from human and animal sources (<http://pubmlst.org/plasmid/>, 5 August 2012).

Complete nucleotide sequences of 21 IncN plasmids are available in the GenBank database, all showing a conserved set of core genes, involved in essential functions such as replication,

transfer and maintenance, and various accessory genes encoding resistance to cephalosporins, carbapenems, tetracyclines, quinolones, aminoglycosides and sulphonamides as well as heavy metal resistance genes.

The aim of this work was to study a collection of IncN plasmids identified in *E. coli* or *Salmonella* from wild and farm animals, the environment and humans from six different European countries among plasmids harbouring PMQR or *bla*<sub>CTX-M-1</sub> genes. Complete DNA sequences of two representative ST1 and ST3 plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnrS1* genes, respectively, were obtained and compared with ST1, ST3 and ST8 IncN plasmid scaffolds already available in GenBank.

## Material and methods

### Plasmids

Nineteen *E. coli* transformants obtained from clonally unrelated strains, each carrying one single IncN plasmid, were selected from a collection of previously studied *E. coli* or *Salmonella* strains obtained from human and animal clinical samples and carriers and from environmental samples from the Czech Republic, Slovakia, Poland, Denmark, Italy and the Netherlands (Table 1). Ten and nine plasmids showing differences in antibiotic resistance gene content and size were randomly selected among those carrying the *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *qnrS1* and *qnrB19* genes, respectively. All plasmids were analysed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) using the PvuII (Biolone Ltd, UK) restriction enzyme. Digested fragments were separated by electrophoresis in a 0.8% agarose gel. Cluster analysis of RFLP patterns was performed, generating dendrograms and measuring plasmid similarity by the Dice Similarity Index (DSI). Plasmids with a DSI  $\geq 85\%$  were assigned to the same cluster (designated with numbers 1, 2, 3 and 4). Letters were used to discriminate RFLP patterns assigned to the same cluster, but differing by one or two restriction bands (i.e. 1a, 1b, 1c etc.). Prototypic restricted plasmids were transferred to a positively charged nylon membrane (Roche Diagnostics, Monza, Italy) by Southern blot and hybridized with *repN*, *qnrS1*, *qnrB19* and *bla*<sub>CTX-M-1</sub> probes labelled with DIG-11-dUTP by PCR using a PCR Dig Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics).<sup>10-12</sup> Detection of hybridizations was performed using the DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche Diagnostics).

### pMLST

All plasmids were typed by pMLST performed as previously described<sup>7</sup> on total DNA obtained by the Wizard Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA). Amplicons were purified and sequenced by fluorescent dye-labelled dideoxynucleotides using an ABI 3730 DNA sequencing instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Plasmids were assigned to STs at the [www.pubmlst.org/plasmid/](http://www.pubmlst.org/plasmid/) site, analysing the ST prevalence at the IncN isolate database (<http://pubmlst.org/plasmid/>).

### Plasmid sequencing

Shotgun libraries were obtained from the *qnrS1*-positive pKT58A plasmid identified in 2010 in *E. coli* from a cloacal sample of a wild bird in Slovakia<sup>9</sup> and the pHHA45 *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-positive plasmid recovered in 2006 in *E. coli* from pigs in Denmark (this study). These plasmids were randomly selected as representative of the ST1 and ST3 IncN plasmid type among those carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> or *qnrS1* genes, respectively. Plasmid DNA was purified using the Plasmid Midi Prep Kit (Qiagen). Sequencing was performed using the 454-Genome Sequencer FLX platform (Roche Diagnostics) following the standard GS FLX sequencing procedure (Roche Diagnostics). Plasmid coverage was  $>80\times$ . Reads were aligned and

assembled using Newbler assembler software version 2.0.01.14 (Roche Diagnostics).

### Bioinformatics

Open reading frames (ORFs) were predicted and annotated using Artemis software (Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK). Each predicted protein was compared against the protein database using BlastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) with a minimum cut-off of 30% identity over 80% length coverage. Gene sequences were further compared and aligned with GenBank data using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). The IncN plasmids R46 (GenBank accession number AY046276) and pRSB206 (GenBank accession number JN102344) were used as reference plasmids for annotation. GenBank files were compiled using Sequin (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/>).

### Nucleotide sequences

The GenBank accession numbers for the pHHA45 and pKT58A plasmids are JX065630 and JX065631, respectively.

## Results and discussion

### IncN comparative analysis

ST1 IncN plasmids harbouring the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene, showing identical or related RFLP patterns assigned to cluster 1 (DSI  $\geq 88.9\%$ ), were identified in strains from different sources from the Czech Republic, Poland, Denmark and Italy, suggesting the European spread of common, highly diffused IncN plasmids responsible for the dissemination of CTX-M-1 (Table 1 and Figure 1). ST1 plasmids carrying *qnrS1* from *E. coli* and *Salmonella* from the Czech Republic and the Netherlands showed related patterns by RFLP assigned to cluster 2 (DSI  $>84.9\%$ ; Table 1 and Figure 1). Overall the ST1 plasmids showed highly related restriction patterns (DSI  $\geq 84.0\%$ ), and hybridization experiments suggested that divergences observed were mostly due to the regions containing different resistance genes, as suggested by hybridization with the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnrS1* probes, but also to rearrangements occurring in proximity to the *repN* gene (plasmid 209, lane 1; Figure 1).

ST3 *qnrS1*-carrying plasmids identified in human and animal strains in Slovakia, Poland and the Netherlands showed RFLP patterns assigned to cluster 3, differing from those of plasmid ST1 (DSI  $>65.5\%$ ). Restriction and hybridization analysis of ST3 plasmids suggested that transfer of related *qnrS1*-harbouring plasmids may occur between *Salmonella* and *E. coli* of animal and human origin.

ST8 plasmids carrying *qnrB19* showed RFLP patterns assigned to cluster 4 (DSI  $>71.3\%$ ). These plasmids showed identical RFLPs and the location of the *qnrB19* gene was comparable to that expected for the previously fully sequenced plasmid pQNR2078 (GenBank accession number HE613857), belonging to ST8 and carrying the *qnrB19* gene, identified in *E. coli* from a horse in Germany.<sup>13</sup>

Overall the comparative analysis of the IncN plasmid structure clearly highlighted the existence of plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *qnrS1* or *qnrB19* shared between bacterial strains of different origins and sources belonging to ST1, ST3 and ST8, respectively.

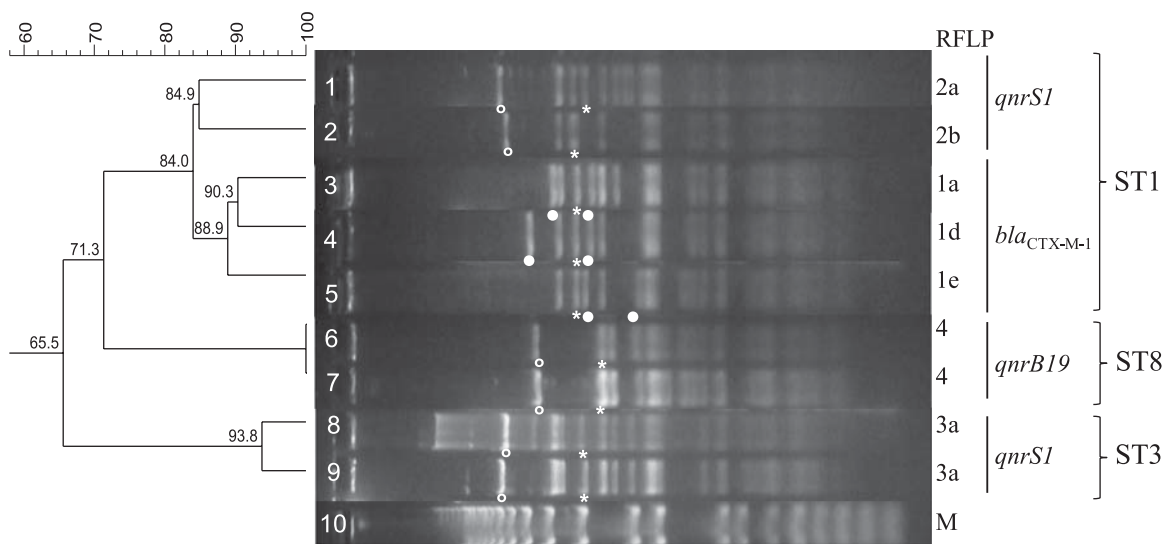


**Table 1.** List of ESBL- or qnr-carrying IncN plasmids from *E. coli* or *Salmonella* strains from Europe analysed in this study

Plasmid name	Country	Year of isolation	Strain	Source	ESBL/PMQR	RFLP <sup>a</sup>	pMLST	Plasmid size	Additional antibiotic resistance genes on plasmid	Conjugative transfer to		Reference
										<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium	
15/B	CR	2009	<i>E. coli</i>	cattle	bla <sub>CTX-M-1</sub>	1a	ST1	30	—	+	+	6
279/B	CR	2009	<i>E. coli</i>	cattle	bla <sub>CTX-M-1</sub>	1a	ST1	30	—	+	+	6
KK6	CR	2008	<i>E. coli</i>	horse	bla <sub>CTX-M-1</sub>	1a	ST1	30	aadA1	+	—	27
62510	CR	2008	<i>E. coli</i>	horse	bla <sub>CTX-M-1</sub>	1a	ST1	30	aadA1, tet(B)	+	—	27
27 NS	CR	2009	<i>E. coli</i>	human	bla <sub>CTX-M-1</sub>	1b	ST1	45	tet(A)	+	+	28
5 PL	PL	2009	<i>E. coli</i>	wild water bird	bla <sub>CTX-M-1</sub>	1c	ST1	35	—	+	+	29
11 OV	CR	2009	<i>E. coli</i>	WWTP	bla <sub>CTX-M-1</sub>	1d	ST1	40	—	+	+	30
Env1	DK	2006	<i>E. coli</i>	pig farm environment	bla <sub>CTX-M-1</sub>	1d	ST1	40	NT	NT	NT	7
pHHA45	DK	2006	<i>E. coli</i>	pig	bla <sub>CTX-M-1</sub>	1d	ST1	40	—	+	NT	this study
35IT	IT	2007	<i>E. coli</i>	broiler	bla <sub>CTX-M-1</sub>	1e	ST1	40	NT	NT	NT	7
209	CR	2010	<i>E. coli</i>	wild water bird	qnrS1	2a	ST1	45	tet(A), bla <sub>TEM-1</sub>	+	+	9
231	CR	2010	<i>E. coli</i>	wild water bird	qnrS1	2c	ST1	40	bla <sub>TEM-1</sub>	+	+	9
p128.12(T)	NL	UN	<i>Salmonella</i> Kentucky	chicken	qnrS1	2b	ST1	50	NT	+	NT	5
pKT58A	SK	2010	<i>E. coli</i>	wild water bird	qnrS1	3a	ST3	50	strA, tet(A)	+	—	9
58PLCIP	PL	2010	<i>E. coli</i>	wild water bird	qnrS1	3b	ST3	45	bla <sub>TEM-1</sub> , sul2, tet(A)	+	+	29
p168.27(T)	NL	UN	<i>Salmonella</i> Saintpaul	human	qnrS1	3a	ST3	50	NT	+	NT	5
31	PL	2009	<i>E. coli</i>	wild water bird	qnrS1	3b	ST3	45	bla <sub>TEM-1</sub> , sul2, tet(A)	+	+	29
T20/B	CR	2008	<i>E. coli</i>	horse	qnrB19	4	ST8	40	—	+	+	27
152.40(T)	NL	UN	<i>Salmonella</i> Typhimurium	human	qnrB19	4	ST8	40	NT	+	NT	5

CR, Czech Republic; PL, Poland; SK, Slovakia; NL, the Netherlands; DK, Denmark; IT, Italy; UN, unknown; WWTP, wastewater treatment plant; NT, not tested.

<sup>a</sup>RFLP by PvuII digestion.



**Figure 1.** PvuII restriction profiles of selected IncN plasmids of ST1, ST3 and ST8. Restriction fragments identified by probes used for the Southern blot hybridization experiments are indicated as follows: asterisks for *repN*, open circles for *qnr* and filled circles for *bla<sub>CTX-M-1</sub>* probes. Two restriction fragments are expected for the hybridization with the *bla<sub>CTX-M-1</sub>* probe, since this gene contains an internal PvuII restriction site. DNA on the gel: lane 1, *E. coli* 209; lane 2, *Salmonella* Kentucky p128.12(T); lane 3, *E. coli* 279/B; lane 4, *E. coli* Env1; lane 5, *E. coli* 35IT; lane 6, *E. coli* T20/B; lane 7, *Salmonella* Typhimurium 152.40(T); lane 8, *Salmonella* Saintpaul p168.27(T); lane 9, *E. coli* pKT58A; lane 10, 1 kb DNA extension ladder (Invitrogen). Dendrograms were obtained by cluster analysis of RFLP profiles. Plasmids with DSIs  $\geq 85\%$  were assigned to the same cluster designated with numbers 1, 2, 3 or 4. Letters were used to distinguish RFLP patterns belonging to the same cluster, but diverging for one or two restriction bands (i.e. 1a, 1b, 1c etc.).

### DNA sequencing of pKT58A and pPHA45 plasmids

Both the pMLST database and RFLP results give clear evidence that the gene *bla<sub>CTX-M-1</sub>* is mobilized by IncN plasmids belonging to ST1, and plasmids of this group are the most prevalent and widely distributed in Europe. Since the sequences of ST1-CTX-M-1 plasmids were not present in GenBank, the entire DNA sequence of the pPHA45 plasmid was determined, as representative of this plasmid type. pPHA45 was 39510 bp in size, encoding 51 predicted ORFs. The backbone region was 34179 bp while the region carrying the resistance determinants was 5331 bp (Figure 2).

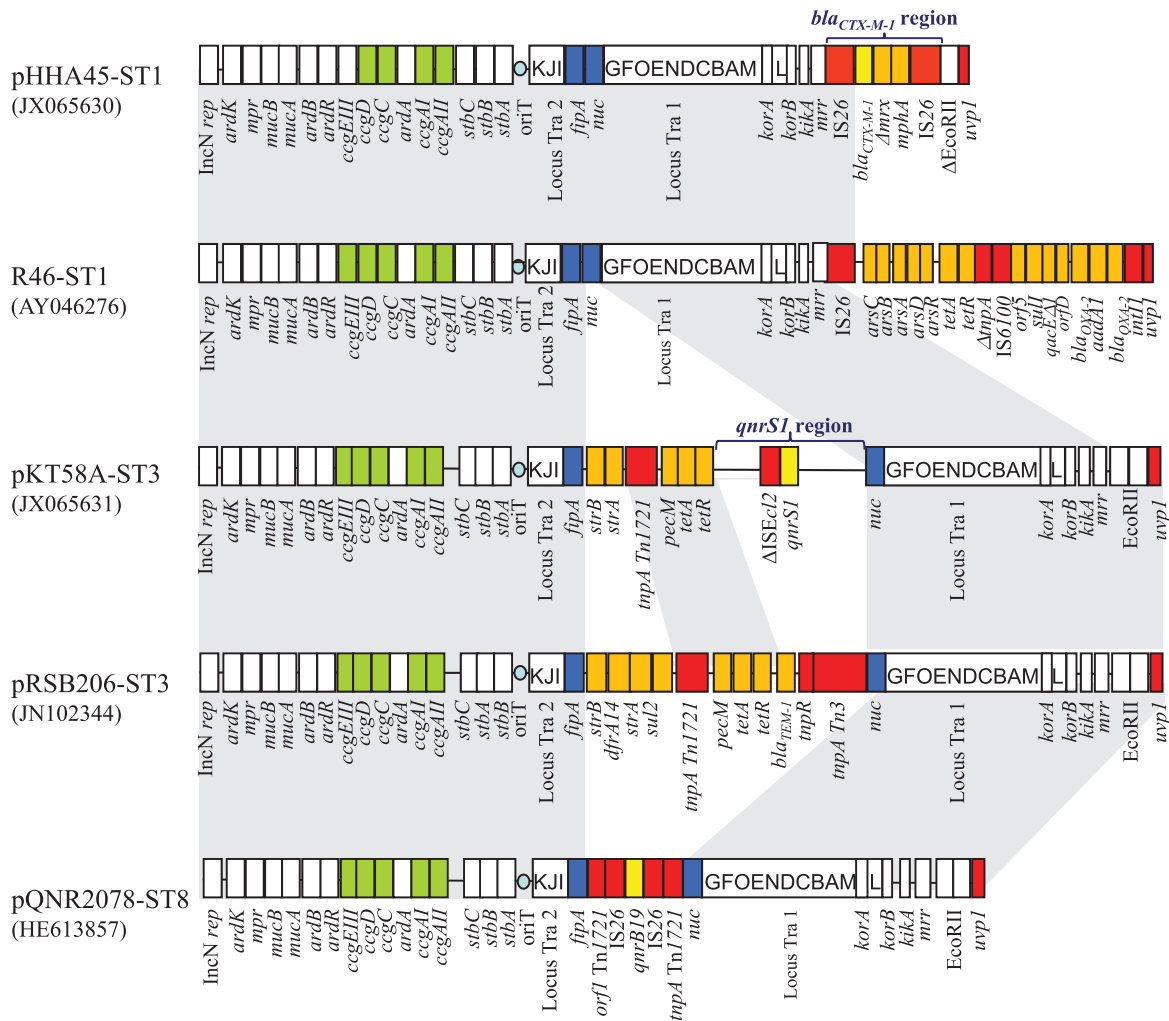
Since no DNA sequence of an IncN ST3-*qnrS1* plasmid was present in GenBank, plasmid pKT58A, identified in a wild water bird in 2010, was randomly selected for complete sequence analysis as representative of this plasmid type. pKT58A was 52148 bp, encoding 59 predicted ORFs. The plasmid comprised a 36154 bp core region, encoding plasmid replication, horizontal transfer machinery, maintenance and stability functions, and a continuous 15994 bp variable region, which included the *qnrS1* resistance gene, insertion sequences or transposons (Figure 2). Sequence analysis of pKT58A showed a high similarity with four antibiotic resistance IncN plasmids: pRSB201 (JN102341), pRSB205 (JN102343), pRSB206 (JN102344) and pKOX105 (NC\_014208). pRSB plasmids were identified in uncultured bacteria from wastewater treatment plants in Germany<sup>14</sup> and pKOX105 originates from a human *Klebsiella oxytoca* strain harbouring *bla<sub>VIM-1</sub>* and *qnrS1* from Italy.<sup>15</sup>

Comparative analysis of the two sequenced plasmids with the IncN reference plasmid R46 demonstrated that they both maintained a typical IncN plasmid scaffold, including the replicon, the *stbA-stbB-stbC* genes involved in plasmid stability, the

*mucA-mucB* genes involved in mutagenesis enhancement, the *ardA-ardB* and *ardK-ardR* genes providing antirestriction functions, the *ccg* genes (*ccgD-ccgD-ccgAI-ccgAII*) that encode products protecting plasmid DNA from the type I restriction system and the two regions composing the conjugative apparatus (first gene cluster: *traL, traM, traA, traB, traC, traD, traN, traE, traO, traF* and *traG*; second gene cluster: *traI, traJ* and *traK*)<sup>16-18</sup> (see Figure 2). These regions showed 99.9% nucleotide identity. The ST1 and ST3 plasmids differed in the organization of the antibiotic resistance region as well as in their integration site within the plasmid scaffold. The *bla<sub>CTX-M-1</sub>* gene in pPHA45 is inserted between the *mrr* gene encoding type IV restriction endonuclease and the EcoRII restriction/antirestriction system, resulting in the deletion of part of the EcoRII gene. The *qnrS1* gene in pKT58A is located between the *fipA* and *nuc* genes (Figure 2). Both of these two integration sites (between the *fipA* and *nuc* genes or in proximity of the EcoRII restriction/antirestriction system) have been observed in other IncN plasmids. These two regions represent the two major hot spot integration sites of transposable elements within the IncN plasmid scaffold.<sup>14,15,19,20</sup>

### Analysis of the antibiotic resistance region of plasmid pKT58A

The antibiotic resistance region of pKT58A includes the streptomycin resistance genes *strB-strA* as a part of a relic of the transposon Tn5393 followed by the Tn1721-like element with the gene *pecM* encoding a transporter protein and the *tet(A)-tet(R)* tetracycline resistance cluster. The region containing the quinolone resistance gene *qnrS1* is located downstream of the



**Figure 2.** Major structural features of pKT58A and pHHA45 in comparison with IncN plasmid pRSB206, pQNR2078-ST8 and the IncN reference plasmid R46. White boxes indicate plasmid scaffold regions that are in common among IncN plasmids. The *tra* genes composing the loci Tra 1 and Tra 2 are indicated with capital letters inside the boxes. Orange boxes indicate antibiotic resistance genes and red boxes indicate transposon-related genes (*tnpA*, *tnpR* and *uvp1*) or insertion sequences. The CUP-controlled regulon (*ccg* genes) is indicated by green boxes. The *fipA* and *nuc* genes are indicated by blue boxes. The origin of transfer *oriT* is indicated by a blue circle. Areas shaded in grey indicate homologies in plasmid scaffold regions.

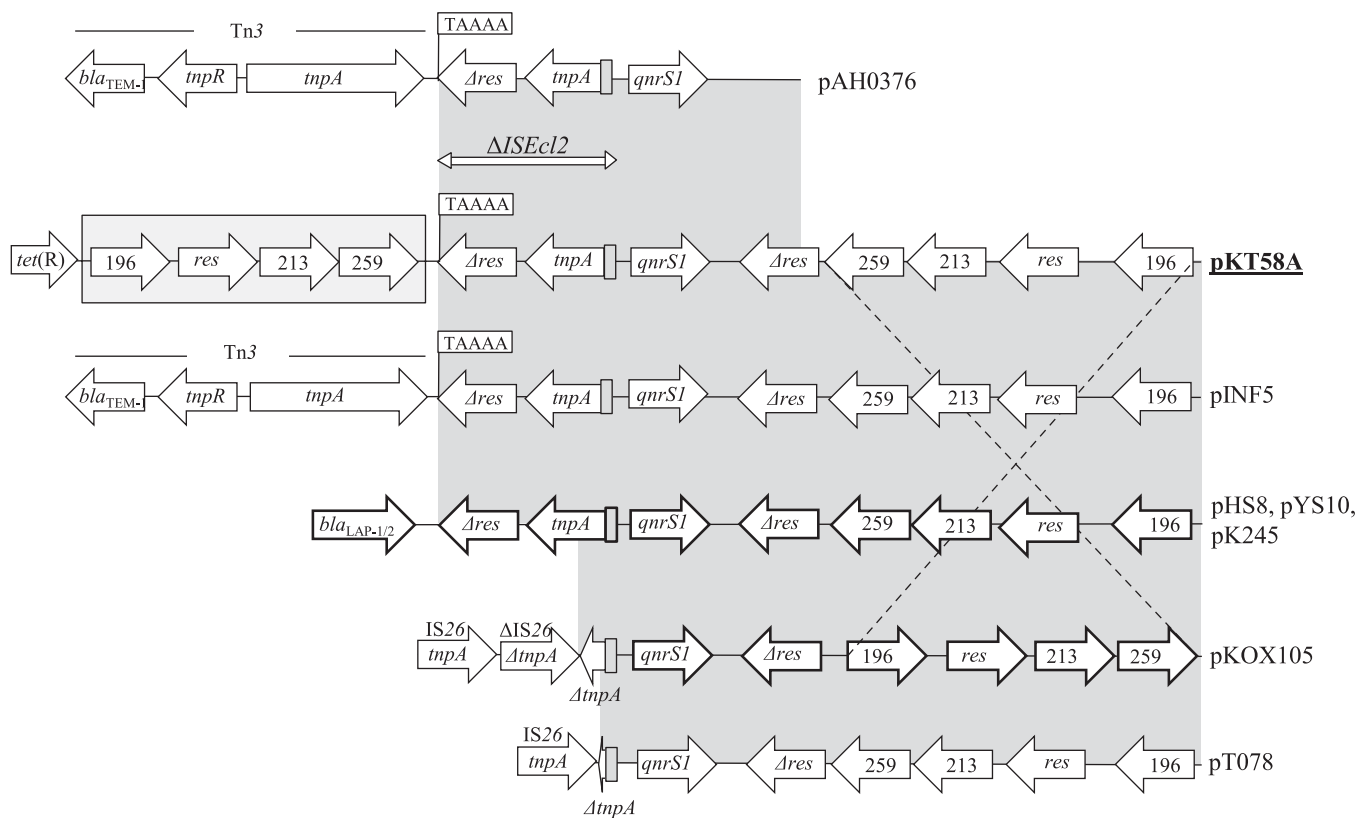
*tet(R)* gene. Both Tn5395 and Tn1721 have been found in many plasmids of different incompatibility groups, but interestingly, the same arrangement of Tn5395 followed by Tn1721 has been recently demonstrated in the IncN ST3 pRSB205 plasmid isolated in a wastewater treatment plant in Germany, which was, however, negative for the presence of the *qnrS1* gene.<sup>14</sup> Plasmid pRSB205 may therefore represent the precursor of pKT58A before the acquisition of the *qnrS1* gene.

The genetic environment of the *qnrS1* gene in pKT58A is novel (Figure 3). The insertion sequence  $\Delta$ ISEc12 is located upstream of the *qnrS1* gene (position 28823–29938) and consists of two ORFs. It has been hypothesized that this insertion sequence could have played a role in the original acquisition of *qnrS1*.<sup>21</sup> Downstream of the *qnrS1* five ORFs are present (positions 30899–34445) up to the *nuc* gene at the integration site. These five ORFs encode a partially truncated resolvase and a segment showing homology with the *E. coli* CS12 fibrial gene cluster (AY009096). Similar arrangements of the *qnrS1* gene

environment, including  $\Delta$ ISEc12 upstream and the five ORFs downstream, have been described in several plasmids,<sup>15,22–25</sup> but interestingly, in pKT58A the fibrial gene cluster is duplicated upstream of  $\Delta$ ISEc12 (Figure 3). The origin of this duplication is not clear, and this arrangement represents a novel environment of the *qnrS1* gene.

### Analysis of the antibiotic resistance region of plasmid pHHA45

The *bla*<sub>CTX-M-1</sub> region consisted of 214 bp of an *ISEcp1* element located upstream of the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene, truncated by the integration of an IS26. The CTX-M-1 cluster flanked by IS26 on both sides is integrated between the *mrr* and *EcoRII* genes, belonging to the restriction/antirestriction system of IncN plasmids (Figure 2). Downstream of the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene a non-functional macrolide-resistance gene cluster was detected, represented by a truncated *mrx* gene followed by the *mph(A)*



**Figure 3.** Comparison of the *qnrS1* gene environments in different plasmids. The reading frames are shown as arrows, with the arrowhead indicating the direction of transcription. The reading frames marked as 259, 213, *res* and 196 represent the region showing homology to the CS12 fimbrial gene cluster of *E. coli*. The 5 bp TAAAA direct repeats at the boundaries of the Tn3 elements in pAH0276 and pINF5, as well as upstream of the *qnrS1* region of pKT58A, are shown in boxes. The grey boxes indicate the terminal inverted repeats of ISEc12. Areas shaded in grey indicate homologies to the sequences below and above the map of pKT58A. The broken lines between pKT58A and pKOX105 indicate inversion of a *qnrS1* downstream region in pKOX105 with respect to pKT58A. Four reading frames—196, *res*, 213 and 259—inside the light grey box indicate another copy of the region showing homology to the CS12 fimbrial gene cluster of *E. coli*.

gene for macrolide 2'-phosphotransferase followed by a second IS26 element. The gene module IS26- $\Delta$ ISEcp1-*bla*<sub>CTX-M-1</sub>- $\Delta$ *mrx*-*mph*(A)-IS26 was recently found in *E. coli* plasmids, including those from the successful clone ST131 and those from *E. coli* from pigs in Germany.<sup>26</sup> In particular, this structure was demonstrated in IncN plasmids pKC394 (HM138652), pKC406 (GQ274934), pKC409 (GQ274927) and pCTX246 (FN806790) and IncI1 plasmid pKCT398 (GQ274931). Since the identical structure of the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> region can be found in plasmids of different incompatibility groups, it has been hypothesized that the whole structure can be exchanged between different plasmid backbones as a composite transposon mediated by an IS26 transposition event.<sup>26</sup>

### Conclusions

All IncN plasmids harbouring the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene analysed in this study, isolated from humans, animals and the environment from different European countries, showed identical or closely related RFLPs and belonged to the same ST1 group. Three *qnrS1*-carrying plasmids isolated from water birds from Slovakia and Poland and a human *Salmonella enterica* Saintpaul from the Netherlands

showed related RFLPs and belonged to the same ST3 group. Two *qnrB19*-carrying plasmids originating from a horse *E. coli* strain from the Czech Republic and a human *S. enterica* Typhimurium from the Netherlands have been assigned to ST8 and also showed identical RFLP patterns. Therefore both pMLST and RFLP results give clear evidence that there are specific IncN plasmids that are successfully spreading in Europe, disseminating specific resistance genes among different isolates from animal and human sources. Multiple antibiotic resistance genes were found to be collocated together with the PMQR or ESBL genes on IncN plasmids; therefore, the role of selective pressure by other antibiotic groups such as tetracyclines, which are widely used in veterinary medicine, on plasmid dissemination needs to be considered. ST1 and ST3 prototypic plasmids demonstrated that although the IncN scaffold is very well conserved (99% nucleotide identity), it is possible to classify them by pMLST in homogeneous subgroups, which are confirmed by RFLP comparative analysis. Two major integration sites within the IncN plasmid scaffold are prevalently observed for the acquisition of mobile elements carrying resistance genes. Resistance genes and insertion sequences represent the major source of variability for the evolution of IncN plasmids.

## Funding

This study was funded by grants to: M. D. by the Czech Science Foundation (P502/10/P083) and CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068); H. H. by the Center for Genomic Epidemiology (09-067103/DSF); L. H. by the Lundbeck Foundation (DK nr R44-A4384); and A. C. by MIUR CNR flagship PBO5 'InterOmics' project. M. D. received the FEMS Advanced Fellowship 2011 to work in the laboratory of A. C. at Istituto Superiore di Sanità, Rome.

## Transparency declarations

None to declare.

## References

- Belogurov AA, Delver EP, Rodzevich OV. IncN plasmid pKM101 and IncI1 plasmid ColIb-P9 encode homologous antirestriction proteins in their leading regions. *J Bacteriol* 1992; **174**: 5079–85.
- Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson SJ *et al.* Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* 2007; **73**: 1976–83.
- Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 2227–38.
- Moodley A, Guardabassi L. Transmission of IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 1709–11.
- García-Fernández A, Fortini D, Veldman K *et al.* Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 274–81.
- Dolejska M, Jurcickova Z, Literak I *et al.* IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> in *Escherichia coli* isolates on a dairy farm. *Vet Microbiol* 2011; **149**: 513–6.
- García-Fernández A, Villa L, Moodley A *et al.* Multilocus sequence typing of IncN plasmids. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 1987–91.
- Szmołka A, Fortini D, Villa L *et al.* First report on IncN plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrS1* in porcine *Escherichia coli* in Europe. *Microb Drug Resist* 2011; **17**: 567–73.
- Tausova D, Dolejska M, Cizek A *et al.* *Escherichia coli* with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 1103–7.
- Carattoli A, Bertini A, Villa L *et al.* Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; **6**: 219–28.
- Hopkins KL, Wootton L, Day MR *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* found in *Salmonella enterica* strains isolated in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2007; **59**: 1071–5.
- Pitout JD, Hossain A, Hanson ND. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- $\beta$ -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 5715–21.
- Schink AK, Kadlec K, Schwarz S. Detection of *qnr* genes among *Escherichia coli* isolates of animal origin and complete sequence of the conjugative *qnrB19*-carrying plasmid pQNR2078. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 1099–102.
- Eikmeyer F, Hadiati A, Szczepanowski R *et al.* The complete genome sequences of four new IncN plasmids from wastewater treatment plant effluent provide new insights into IncN plasmid diversity and evolution. *Plasmid* 2012; **68**: 13–24.
- Carattoli A, Aschbacher R, March A *et al.* Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid pKOX105 encoding VIM-1, QnrS1 and SHV-12 proteins in Enterobacteriaceae from Bolzano, Italy compared with IncN plasmids encoding KPC enzymes in the USA. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 2070–5.
- Clerch B, Bravo JM, Llagostera M. Efficiency of MucAB and *Escherichia coli* UmuDC proteins in quinolone and UV mutagenesis in *Salmonella typhimurium*: effect of MucA and UmuD processing. *Mutat Res* 1996; **349**: 201–8.
- Delver EP, Belogurov AA. Organization of the leading region of IncN plasmid pKM101 (R46): a regulation controlled by CUP sequence elements. *J Mol Biol* 1997; **271**: 13–30.
- Paterson ES, Moré MI, Pillay G *et al.* Genetic analysis of the mobilization and leading regions of the IncN plasmids pKM101 and pCU1. *J Bacteriol* 1999; **181**: 2572–83.
- Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F *et al.* Genetic organization of transposase regions surrounding *bla*<sub>KPC</sub> carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 1998–2004.
- Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Analysis of the resistome of a multidrug-resistant NDM-1-producing *Escherichia coli* strain by high-throughput genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 4224–9.
- Poirel L, Leviandier C, Nordmann P. Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in Enterobacteriaceae isolates from a French university hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 3992–7.
- Chen YT, Shu HY, Li LH *et al.* Complete nucleotide sequence of pK245, a 98-kilobase plasmid conferring quinolone resistance and extended-spectrum- $\beta$ -lactamase activity in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 3861–6.
- Hu FP, Xu XG, Zhu DM *et al.* Coexistence of *qnrB4* and *qnrS1* in a clinical strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Acta Pharmacol Sin* 2008; **29**: 320–4.
- Hata M, Suzuki M, Matsumoto M *et al.* Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 801–3.
- Kehrenberg C, Friederichs S, de Jong A *et al.* Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *J Antimicrob Chemother* 2006; **58**: 18–22.
- Cullik A, Pfeifer Y, Prager R *et al.* A novel IS26 structure surrounds *bla*<sub>CTX-M</sub> genes in different plasmids from German clinical *Escherichia coli* isolates. *J Med Microbiol* 2010; **59**: 580–7.
- Dolejska M, Duskova E, Rybarikova J *et al.* Plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 757–64.
- Literak I, Petro R, Dolejska M *et al.* Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy urban children of two age groups in relation to their antibiotic therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 3005–7.
- Literak I, Dolejska M, Janoszowska D *et al.* Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. *Appl Environ Microbiol* 2010; **76**: 8126–34.
- Dolejska M, Frolkova P, Florek M *et al.* CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 2784–90.





## Příloha 15

DOLEJSKA, M., VILLA, L., POIREL, L., NORDMANN, P., CARATTOLI, A., 2013, Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance-nodulation-cell division/multidrug efflux pump: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 34-39.

### Souhrn

---

V této práci byla metodou nové generace sekvenování stanovena primární nukleotidová sekvence IncHI1 plazmidu nesoucího geny pro karbapenemázu NDM-1 a ArmA pro rezistenci k aminoglykosidům. Gen *bla<sub>NDM-1</sub>* se na plazmidu nacházel jako součást nové genetické platformy. Anotace kódujících genů a komparace s daty v genové bance ukázala na přítomnost sekvence profága, ve které byly nesený geny pro multirezistentní RND efluxní pumpu. Studie popisuje jedinečnou strukturu multirezistentního plazmidu nesoucího gen pro celosvětově rozšířenou karbapenemázu NDM-1.





## Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance–nodulation–cell division/multidrug efflux pump

Monika Dolejska<sup>1</sup>, Laura Villa<sup>1</sup>, Laurent Poirel<sup>2</sup>, Patrice Nordmann<sup>2</sup> and Alessandra Carattoli<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Infectious, Parasitic and Immuno-Mediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy; <sup>2</sup>Service de Bactériologie-Virologie, INSERM U914 ‘Emerging Resistance to Antibiotics’, Hôpital de Bicêtre, Faculté de Médecine et Université Paris-Sud, K.-Bicêtre, France

\*Corresponding author. Tel: +39-06-4990-3128; Fax: +39-06-4938-7112; E-mail: alecara@iss.it

Received 25 June 2012; returned 18 July 2012; revised 25 July 2012; accepted 9 August 2012

**Objectives:** To characterize the pNDM-CIT plasmid identified in *Citrobacter freundii* carrying genes encoding the metallo- $\beta$ -lactamase NDM-1 and the 16S RNA methylase ArmA.

**Methods:** The complete DNA sequence of pNDM-CIT was obtained by using the 454-Genome Sequencer FLX procedure on a library obtained using plasmid DNA purified from the pNDM-CIT *Escherichia coli* J53 transconjugant. Contig assembly and predicted gaps were confirmed and filled by PCR-based gap closure. Comparative analysis with IncHI1 incompatibility group plasmids was performed using BLASTN and BLASTP algorithms.

**Results:** Plasmid pNDM-CIT was 288 920 bp and revealed an IncHI1 plasmid scaffold, showing novel resistance and potential virulence determinants. The *bla*<sub>NDM-1</sub> gene was identified within a novel genetic context, flanked by a duplication of the class 1 integron on both sides. The replicase gene *repAciN*, originating from *Acinetobacter* spp. plasmids, was identified in a close association with the Tn1548::*armA* transposon and the macrolide resistance *mel-mph2* cluster. The same structure was identified *in silico* from a series of enterobacterial plasmids carrying the *armA* gene. The *repAciN* gene probably represents a remnant sign of the original occurrence of the *armA* gene in *Acinetobacter* plasmids. A CP4-like prophage sequence was identified in pNDM-CIT, containing a resistance–nodulation–cell division/multidrug resistance (RND/MDR) efflux pump cluster surrounded by two IS1-like elements. This resistance determinant, associated with such a prophage sequence, has never been reported on plasmids.

**Conclusions:** Plasmid pNDM-CIT differed significantly from all known *bla*<sub>NDM-1</sub>-carrying plasmids identified in Enterobacteriaceae, since it combines the metallo- $\beta$ -lactamase NDM-1, the 16S RNA methylase ArmA and a cryptic prophage carrying the RND/MDR efflux pump.

**Keywords:** MexA, MexB, CP4 prophage, replicons, *Citrobacter freundii*

### Introduction

The emergence of NDM-1-producing isolates is one of the latest threats in multidrug resistance in Gram-negative bacteria. It has been shown that the emergence of the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene is not related to the spread of epidemic clones (different strain genetic backgrounds have been identified and several bacterial species are involved) or epidemic plasmids.<sup>1</sup>

The different plasmid scaffolds that have been shown to contribute to the dissemination of the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene basically belong to several families, including IncN, IncA/C, IncL/M and IncH.<sup>2–7</sup> In addition, large (>250 kb) and non-typeable plasmids (non-typeable using the current PCR-based replicon typing scheme)<sup>8</sup> showing conjugative transfer significantly more frequent at 30°C than at 37°C have recently been identified in NDM-1-producing

isolates from seepage and public tap water collected in New Delhi, India.<sup>9</sup> This has led to the hypothesis that these plasmids will further contribute to the dissemination of the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene among bacterial species in water and soil environments.

The IncH family includes several plasmid types producing a long and flexible conjugation H-type pilus.<sup>10,11</sup> Thermosensitivity of the conjugative apparatus is a well-known phenomenon described for the IncHI plasmids.<sup>12</sup> Transcriptional analysis of the transfer region revealed that one of the key genes in the transfer locus is transcribed in a temperature-dependent manner, with reduced levels of expression at 37°C and optimal transfer at 22–30°C.<sup>13</sup> Plasmid R27, originally identified in tetracycline-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain 1M1407 (erroneously reported as *Salmonella* Typhi, <http://www.genome.wisc.edu/sequencing/sty2.htm>), isolated in the UK in 1961, represents the

archetype of an InCHI1 plasmid type, whereas plasmid R478, identified in *Serratia marcescens* from the USA in 1969, represents the archetype of an InCHI2 plasmid type.<sup>11</sup> Plasmids R27 and R478 have been fully sequenced and extensively studied, demonstrating that they actually possess two transfer regions (Tra1 and Tra2), sharing 71%–78% nucleotide identity, and carry specific replicons that are unique to this plasmid family (RepHIA and RepHI1B).<sup>14–16</sup>

We recently described an InCh-like plasmid, pNDM-MAR, carrying the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene. This plasmid harbours novel replicons and transfer loci, defining a novel plasmid type within the InCh plasmid family. This plasmid co-harbours the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> together with the quinolone resistance gene *qnrB1*, but did not carry any 16S rRNA methylase gene, by contrast to other *bla*<sub>NDM-1</sub>-positive plasmids.<sup>4</sup>

We report here the full sequence of the plasmid recovered from *Citrobacter freundii* STE, causing a urinary infection in a patient who was hospitalized in south-eastern India in July 2010. This isolate possessed an extremely large number of resistance genes, including nine different  $\beta$ -lactamase genes, namely *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-4</sub>, *bla*<sub>OXA-181</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>OXA-9</sub>, *bla*<sub>OXA-10</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> and *bla*<sub>CMY</sub>, in addition to the 16S rRNA methylase *armA* gene, which confers high-level resistance to all aminoglycosides.<sup>17</sup> All these resistance genes had been identified on four different plasmids.<sup>17</sup> The *bla*<sub>NDM-1</sub> gene was co-transferred together with *armA* by conjugation, and both genes were shown to be located on a very large plasmid (>200 kb), named pNDM-CIT. The objective of this study was to identify the genetic structure and characteristics of that plasmid.

## Materials and methods

### Bacterial strains

Plasmid pNDM-CIT was obtained by conjugation using *C. freundii* STE as the donor.<sup>17</sup> Mating-out assays were performed at 30°C and 37°C using an azide-resistant *Escherichia coli* strain, J53, as the recipient. Selection of transconjugants was undertaken by plating on Mueller–Hinton agar containing cefoxitin (10 mg/L) and azide (100 mg/L) in order to specifically recover the *bla*<sub>NDM-1</sub>-carrying plasmid. PCR analysis confirmed that plasmid pNDM-CIT harboured both *bla*<sub>NDM-1</sub> and *armA* genes. Plasmid analysis performed by using the Kieser method showed that plasmid pNDM-CIT was larger than 250 kb.<sup>18</sup>

### Plasmid DNA sequencing

The complete DNA sequence of the pNDM-CIT plasmid was obtained by using the 454-Genome Sequencer FLX procedure (Roche Diagnostic, Monza, Milan) on a library obtained using plasmid DNA purified from the pNDM-CIT *E. coli* J53 transconjugant. Plasmid DNA was purified using the Invitrogen PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen, Milan, Italy), according to the manufacturer's procedure.

### De novo assembly of DNA reads and gap closure

Nineteen contigs ranging from 119994 to 217 bp, with at least a 50-fold coverage, were obtained using the GS-FLX gsAssembler software. Contigs were first assembled *in silico* by the 454 ReadStatus output file, generated by the gsAssembler software, identifying reads overlapping adjacent contigs. Contig assembly and predicted gaps were then confirmed and filled by PCR-based gap closure, by Sanger DNA sequencing of the amplicons (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### Annotation

Gene prediction was performed for the complete plasmid sequence with Artemis Version 8 (Sanger Institute). Pairwise alignment was performed by a BLASTN and BLASTP homology search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The region relative to the CP4-like prophage was analysed by BLASTP at the <http://www.ecogene.org/> website.

### Phylogenetic analysis of InCHI plasmids

Phylogenetic analysis of nucleotide alignments was performed on the following InCHI1 plasmid sequences, downloaded from GenBank: pMAK1 (AB366440), pHCM1 (AL513383), pAKU\_1 (AM412236), pO111\_1 (AP010961) and R27 (AF250878).<sup>14,19–22</sup> The analysis also included the InCHI2 plasmid R478 (NC\_005211) and pNDM-MAR belonging to a novel, not yet defined, InCh group (JN420336). Repetitive regions or inserted sequences were excluded, so that the phylogenetic analysis was limited to the conserved InCHI1 core regions, including the replicons, and the Tra1 and Tra2 regions (shaded in Figure 1). The alignment was generated using DNAMAN phylogenetic analysis software (Lynnon BioSoft, Vaudreuil, Quebec, Canada) for quick alignment with a gap penalty of 7, K-tuple of 3, number of top diagonals of 5 and a window size of 5, based on the Kimura method, generating rooted trees.<sup>23</sup>

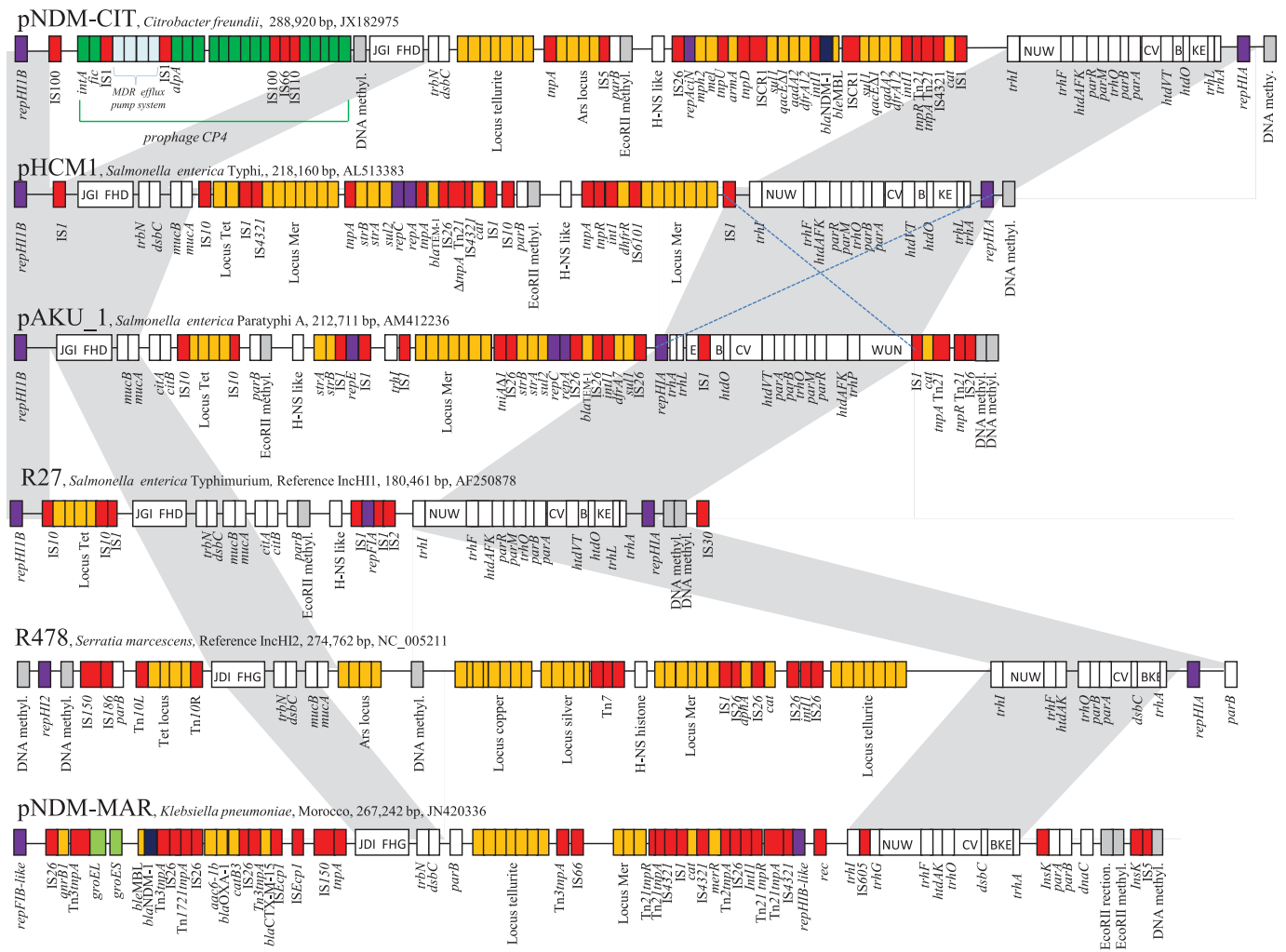
### Nucleotide sequence accession number

The complete sequence of pNDM-CIT has been deposited in the EMBL Nucleotide Sequence Database under GenBank accession number JX182975.

## Results and discussion

### Complete sequence of plasmid pNDM-CIT

Plasmid pNDM-CIT was 288920 bp, thus amounting to the largest *bla*<sub>NDM-1</sub>-bearing plasmid ever described, being also one of the largest plasmids identified in Enterobacteriaceae so far. It contained 265 predicted coding sequences (CDSs) [Figure 1 and Table S1 (available as Supplementary data at JAC Online)]. BLASTN comparison revealed a novel InCHI1 plasmid scaffold, showing 80%–100% nucleotide identity and 47%–53% coverage with plasmids pMAK1 from *S. enterica* Choleraesuis, pHCM1 from *S. enterica* Typhi, pAKU\_1 from *S. enterica* Paratyphi A, pO111\_1 from *E. coli* and R27 from *S. enterica* Typhimurium.<sup>14,19–22</sup> The Tra1–Tra2 regions of plasmid pNDM-CIT showed 88%–90% nucleotide identity with those of the other previously mentioned InCHI1 plasmids (Figure 2). The pNDM-CIT was non-typeable by InCHI1 plasmid multilocus sequence typing (<http://pubmlst.org/plasmid/>), since it lacked the HCM1.178ac allele and showed limited similarity (85%–93% nucleotide identity) with the alleles of the other InCHI1 plasmids.<sup>24</sup> However, plasmid pNDM-CIT harboured two replicons showing 91% and 97% nucleotide identity with, respectively, RepHI1B and RepHIA of the other InCHI1 plasmids. The RepHI1B replicon is specific to the InCHI1 subgroup, whereas plasmids InCHI1 and InCHI2 are not compatible with each other since they share the common replicon RepHIA.<sup>11,15</sup> Phylogenetic analysis suggested that pNDM-CIT belongs to a new plasmid type, highly related to the InCHI1 plasmid family (Figure 2). Novel primers HI1-FW (5'-ATT CCA GAA AAC CGA TCT CTT T-3') and HI1-RV (5'-AAT CAT GGT GTG GGA TCG TTT-3'), amplifying an expected 534 bp fragment, were designed to provide an updated and specific



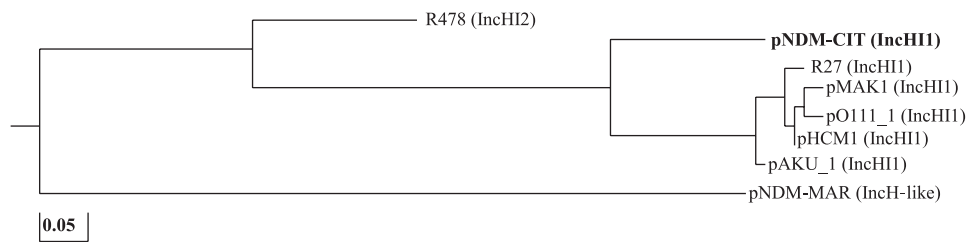
**Figure 1.** Major structural features of pNDM-CIT in comparison with: IncHI1 plasmids pHCM1 (GenBank accession number AL513383), pAKU\_1 (GenBank accession number AM412236) and R27 (GenBank accession number AF250878); IncHI2 plasmid R478 (GenBank accession number NC\_005211); and IncH-like plasmid pNDM-MAR (GenBank accession number JN420336). White boxes indicate plasmid scaffold regions that are in common among plasmids. Shaded regions were used for phylogenetic analysis (shown in Figure 2). The locus Tra is indicated by white boxes with capital letters indicating the respective *tra* genes (i.e. J, *traJ*; D, *traD*; I, *traI*, etc.). Resistance genes are indicated by orange boxes, except the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene, which is indicated by a blue box, and the RND/MDR efflux pump cluster, which is shown in pale blue. Transposon-related genes (*tnpA*, *tnpR* and *tnpM*), the class 1 integrase and insertion sequences are indicated by red boxes. Other genes are indicated by coloured boxes as follows: violet, replicate genes; grey, restriction enzyme and DNA methylase genes; dark green, genes encoding prophage-related proteins; and pale green, *groEL-groES* cluster.

PCR-based replicon typing scheme to identify all plasmids belonging to the IncHI1 family, including plasmid pNDM-CIT, but not the IncH pNDM-MAR plasmid, whose specific primers have been reported previously.<sup>4</sup> In fact, pNDM-MAR differs significantly from pNDM-CIT and the other IncHI1 plasmids, sharing only 71%–78% nucleotide identity in the two transfer regions and 61% identity in the RepHI1B replicon and lacking RepHIA (Figures 1 and 2).

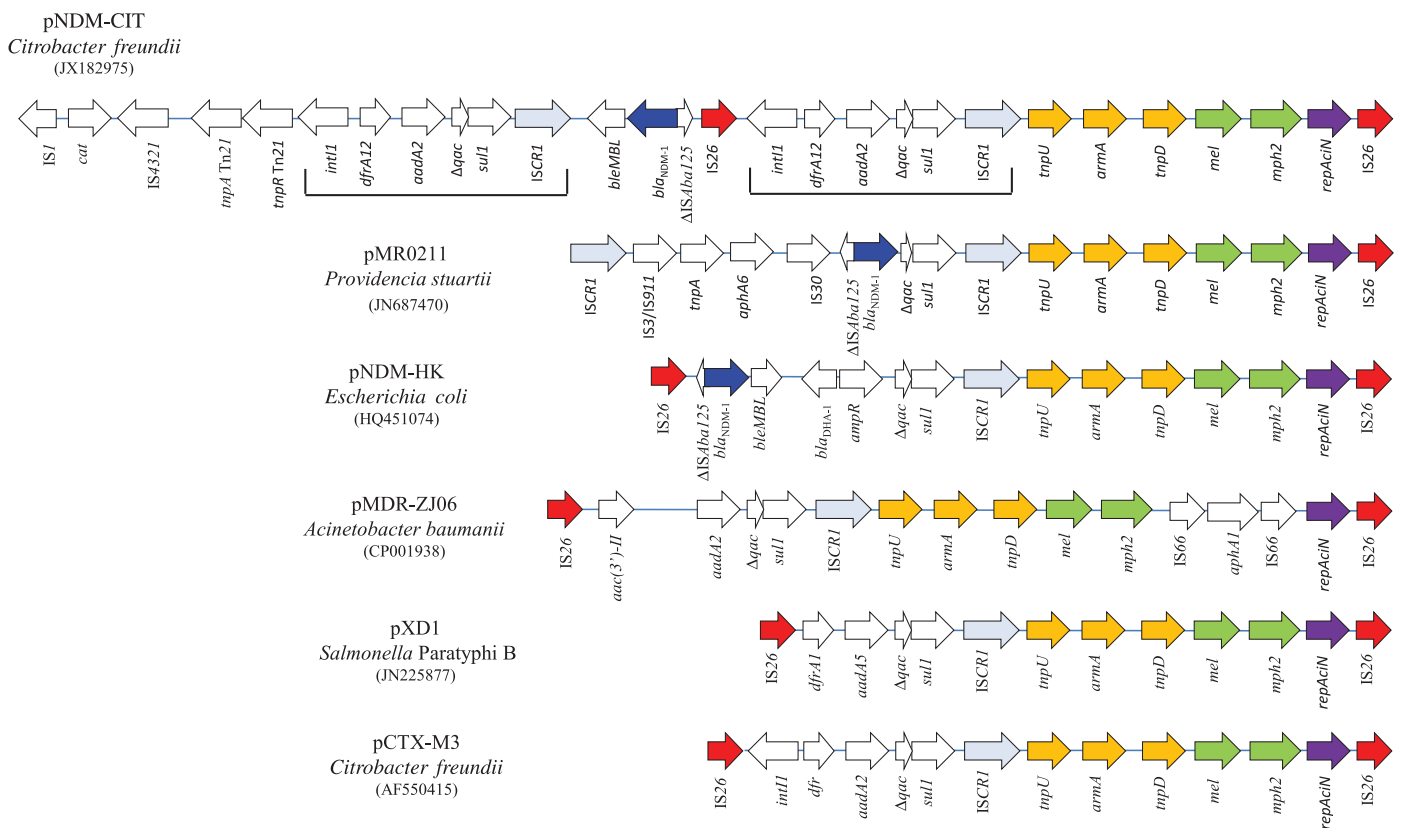
### Transposon Tn1548 carrying *arma* harbours an *Acinetobacter* replicase gene

A third replicase gene, that we termed *repAcin*, was identified on the same plasmid, pNDM-CIT, between nucleotide positions

31861 and 32688, and encoding a putative replicase protein belonging to the Rep3 family (pfam1051; Figure 3). Using BLASTN analysis, the *repAcin* sequence was found to match perfectly (100% nucleotide identity) with plasmids pMR0211 and pNDM-HK, both carrying the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene, identified, respectively, from *Providencia stuartii* (JN687470)<sup>25</sup> and *E. coli* (HQ451074),<sup>2</sup> but also with a series of plasmids including pXD1 from *S. enterica* Paratyphi B recovered from chickens in China (JN225877),<sup>26</sup> pPG010208 from *E. coli* recovered from cattle in Chile (HQ023861),<sup>27</sup> pFP10-2 from *Klebsiella oxytoca* recovered from humans in China (HQ651093),<sup>28</sup> pKPN5 from *Klebsiella pneumoniae* recovered from humans in the USA (NC\_009651), pKP048 from *K. pneumoniae* recovered from humans in China (FJ28167),<sup>29</sup> pMUR050 from *E. coli* recovered from pigs in



**Figure 2.** Phylogenetic relationship among IncH plasmids. The phylogenetic analysis was performed by aligning ~70000 bp of concatenated sequences (corresponding to regions shaded in Figure 1), identified among eight publicly available IncH plasmid sequences: pNDM-CIT (JX182975), pMAK1 (AB366440), pHCM1 (AL513383), pAKU\_1 (AM412236), pO111\_1 (AP010961), R27 (AF250878), R478 (NC\_005211) and pNDM-MAR (JN420336). The phylogenetic tree was obtained using the DNAMAN phylogenetic analysis software (Lynnon BioSoft, Vaudreuil, Quebec, Canada). The bar corresponds to the scale of sequence divergence.



**Figure 3.** Comparative analysis of the Tn1548::ArmA region among plasmids, and the genetic environment of the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene in pNDM-CIT. Pairwise comparison of plasmid regions in pNDM-CIT (JX182975), pMR0211 (JN687470), pNDM-HK (HQ451074), pMDR-ZJ06 (CP001938), pXD1 (JN225877) and pCTX-M3 (AF550415). The Tn1548::*armA* transposon is indicated by orange arrows and the *bla*<sub>NDM-1</sub> and *mel-mph2* genes are indicated by blue and green arrows, respectively. Grey and red arrows indicate the ISCR1 and IS26 elements, respectively. The *repAcIN* gene is indicated by violet arrows.

Spain (AY522431)<sup>30</sup> and pCTX-M3 from *C. freundii* recovered from humans in Poland (AF550415).<sup>31</sup> It is worth noting that the *repAcIN* gene has also been identified on plasmid pMDR-ZJ06 (CP001938) obtained from the multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain MDR-ZJ06,<sup>32</sup> in this case being the only replicase gene identified on that plasmid. In all the plasmids mentioned above, the *repAcIN* gene was located close to the *mph2* gene (encoding high-level resistance to macrolides) and the Tn1548::*armA* transposon (encoding resistance to all aminoglycosides). BLASTP analysis identified proteins sharing

60%–100% amino acid identity with the Rep3 replicase in more than 20 different plasmids from different *Acinetobacter* species, including *A. baumannii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter venetianus*, *Acinetobacter haemolyticus* and *Acinetobacter johnsonii*. However, none of these plasmids harboured any *armA* gene. This comparative analysis strongly suggests that the original mobilization of the Tn1548::*armA-mel-mph2-repAcIN* module occurred through an IS26-mediated transposition targeting an *Acinetobacter* sp. plasmid such as pMDR-ZJ06, and that the module was then transferred to enterobacterial plasmids, thus



promoting the spread of the *armA* gene. It is likely that the *repAciN* gene was trapped in that module, and our hypothesis is that it now represents a remnant sign of the original occurrence of the *armA* gene among *Acinetobacter* plasmids.

### Genetic environment of the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene and other resistance genes on pNDM-CIT

Transposon Tn1548::*armA* was flanked by a class 1 integron harbouring different resistance gene cassettes and associated with the ISCR1 element. In particular, the *dfrA12* and *aadA2* gene cassettes, encoding resistance to trimethoprim and streptomycin respectively, were identified (Figure 3). In all previously analysed *armA*-positive plasmids, the module encompassing the integron/Tn1548/*repAciN* sequences was flanked by two directly repeated IS26 elements that probably mediated the acquisition of the element by promoting homologous recombination processes. In plasmid pNDM-CIT, a duplication of the class 1 integron was observed and the duplicated element carried the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene into a novel genetic context. Immediately upstream of the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene, a remnant of the IS*Aba125* insertion sequence was identified (Figure 3). This truncated IS*Aba125* comprised the -35 promoter sequence leading to *bla*<sub>NDM-1</sub> gene expression and was previously observed in all the *bla*<sub>NDM-1</sub> genetic environments.<sup>3</sup> Downstream of the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene, the *ble*<sub>MBL</sub> gene encoding resistance to bleomycin was identified, together with a truncated gene encoding a phosphoribosylanthranilate isomerase, as previously found on most other *bla*<sub>NDM-1</sub>-carrying plasmids as well.<sup>2,3</sup> The ISCR1 insertion sequence was then identified, followed by an identical class 1 integron structure containing *dfrA12* and *aadA2* gene cassettes. The duplicated *intI1* gene was followed by the *tnpR* and *tnpA* genes of transposon Tn21, then by a copy of insertion sequence IS4321, by the *cat* gene (encoding resistance to chloramphenicol) and finally by a copy of IS1. Plasmid pNDM-CIT also harboured gene clusters encoding resistance to tellurite and arsenic, suggesting a soil origin of this plasmid. In addition to those resistance determinants, plasmid pNDM-CIT, as previously described for pNDM-MAR, carried genes encoding the EcoRII endonuclease and DNA methylases, promoting plasmid stability (Figure 1).

### Features of the resistance–nodulation–cell division/multidrug resistance (RND/MDR) efflux pump cluster and its genetic context

From nucleotide positions 147112 to 187668, a CP4-like prophage sequence was identified that contained an RND/MDR efflux pump cluster surrounded by two IS1-like elements. This cluster encodes the AcrR transcriptional repressor for the RND/MDR system, comprising a membrane fusion protein similar to MexA, an RND/MDR efflux transporter similar to MexB and an outer membrane lipoprotein component, similar to the CusC for silver and copper efflux (Figure 1). The MexA-like protein shared the highest identity with that of *Bordetella petrii* (68%), the MexB-like protein shared the highest identity with that of *Enterobacter mori* (74%) and the OprD-like outer membrane protein shared the highest identity with that of the waterborne *Rahnella aquatilis* species (63%).

The CP4-like prophage carrying this efflux system module is a chimeric form of the CP4-6 and CP4-57 prophages. It has formerly

been shown that nine different prophages, including CP4-6 and CP4-57, have been captured at different stages during the evolution of the *E. coli* K-12 genome, but they have been reported only rarely on plasmids.<sup>33,34</sup> The CP4-57 and CP4-6 cryptic prophages that have integrated into the chromosome of *E. coli* K-12 are defective prophages of 22030 bp (22 genes and 4 pseudogenes) and 34308 bp (29 genes and 5 pseudogenes), respectively (<http://www.ecogene.org/>); they require a P2 help phage to form virions, but can excise and replicate on their own as free plasmids.<sup>35,36</sup> The beneficial impact of the cryptic prophages on host physiology has been extensively studied, demonstrating that they confer the ability to grow more rapidly and to obtain higher yields on nutrients, being also involved in biofilm development and increased resistance to antimicrobials. These prophages carry toxin–antitoxin systems, consisting of the YpfJ–YfjZ (CP4-57) and YkfI–YafW (CP4-6) protein pairs, directly related to the resistance to antibiotics due to persister cell formation, biofilm formation and general stress response.<sup>34,35</sup> However, the CP4-like prophage identified in pNDM-CIT is likely to be a relict, whose unique relevant function may be associated with the toxin–antitoxin system that is well conserved and probably functioning. The toxin–antitoxin system identified on plasmid pNDM-CIT consisted of a chimeric YkfI–YfjZ toxin–antitoxin pair, composed of the toxin of CP4-6 and the antitoxin of CP4-57. The integrases IntA and AlpA, known to be a key transcriptional regulator of IntA, were also identified on pNDM-CIT. Interestingly, it has been demonstrated that the overexpression of AlpA encoded by CP4-57 led to the excision from planktonic cells of the prophage, and this excision was associated with cell death. In the pNDM-CIT sequence, the *alpA* gene was disrupted by the integration of the RND/MDR efflux pump cluster, and therefore the overexpression of AlpA is unlikely to occur.

### Conclusions

Plasmid pNDM-CIT possesses interesting features, since it contains genes encoding the metallo-β-lactamase NDM-1 and the 16S RNA methylase *ArmA*, in addition to a cryptic prophage carrying the RND/MDR efflux pump. Association of phage-like genes has been described for rare ESBL genes such as the *bla*<sub>CTX-M</sub> ESBL genes.<sup>37</sup> The impact of the expression of this acquired efflux pump on antibiotic resistance, and the process of its acquisition, merits further investigation. This work further indicates that plasmids carrying the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene are very diverse in terms of genetic structure. Nevertheless, they accumulate a series of antibiotic resistance determinants in most cases. The existence of co-resistance markers, located on single plasmids, suggests that the process of the selection of NDM-1-carrying plasmids may be associated with many unrelated antibiotic molecules or toxic compounds.

### Acknowledgements

We thank Claudia Feudi (Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy) for excellent laboratory assistance.

### Funding

This work was supported by the grant ‘Interomics’ financed by the Italian National Council of Research (CNR) and by a grant from the INSERM (U914).

## Transparency declarations

None to declare.

## Supplementary data

Table S1 is available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

## References

- Nordmann P, Poirel L, Walsh TR *et al.* The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol* 2011; **19**: 588–95.
- Ho PL, Lo WU, Yeung MK *et al.* Complete sequencing of pNDM-HK encoding NDM-1 carbapenemase from a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Hong Kong. *PLoS One* 2011; **6**: e17989.
- Poirel L, Dortet L, Bernabeu S *et al.* Genetic features of *bla*<sub>NDM-1</sub>-positive *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 5403–7.
- Villa L, Poirel L, Nordmann P *et al.* Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and *qnrB1* genes. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 1645–50.
- Sekizuka T, Matsui M, Yamane K *et al.* Complete sequencing of the *bla*<sub>NDM-1</sub>-positive IncA/C plasmid from *Escherichia coli* ST38 isolate suggests a possible origin from plant pathogens. *PLoS One* 2011; **6**: e25334.
- Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR *et al.* Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010; **10**: 597–602.
- Bonnin RA, Poirel L, Carattoli A *et al.* Characterization of an IncFII plasmid encoding NDM-1 from *Escherichia coli* ST131. *PLoS One* 2012; **7**: e34752.
- Carattoli A, Bertini A, Villa L *et al.* Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; **63**: 219–28.
- Walsh TR, Weeks J, Livermore DM *et al.* Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis* 2011; **11**: 355–62.
- Taylor DE, Grant RB. Incompatibility and surface exclusion properties of H1 and H2 plasmids. *J Bacteriol* 1977; **131**: 174–8.
- Phan MD, Wain J. IncHI plasmids, a dynamic link between resistance and pathogenicity. *J Infect Dev Ctries* 2008; **2**: 272–8.
- Taylor DE, Levine JG. Studies of temperature-sensitive transfer and maintenance of H incompatibility group plasmids. *J Gen Microbiol* 1980; **116**: 475–84.
- Gunton JE, Gilmour MW, Alonso G *et al.* Subcellular localization and functional domains of the coupling protein, TraG, from IncHI1 plasmid R27. *Microbiology* 2005; **151**: 3549–61.
- Sherburne C, Lawley TD, Gilmour MW *et al.* The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. *Nucleic Acids Res* 2000; **28**: 2177–86.
- Gilmour MW, Thomson NR, Sanders M *et al.* The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. *Plasmid* 2004; **52**: 182–202.
- Gabant P, Newnham P, Taylor D *et al.* Isolation and location on the R27 map of two replicons and an incompatibility determinant specific for IncHI1 plasmids. *J Bacteriol* 1993; **175**: 7697–701.
- Poirel L, Ros A, Carricajo A *et al.* Extremely drug-resistant *Citrobacter freundii* isolate producing NDM-1 and other carbapenemases identified in a patient returning from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 447–8.
- Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 1984; **12**: 19–36.
- Parkhill J, Dougan G, James KD *et al.* Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 2001; **413**: 848–52.
- Holt KE, Thomson NR, Wain J *et al.* Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A harbors IncHI1 plasmids similar to those found in serovar Typhi. *J Bacteriol* 2007; **189**: 4257–64.
- Smith HR, Grindley ND, Humphreys GO *et al.* Interactions of group H resistance factors with the F factor. *J Bacteriol* 1973; **115**: 623–8.
- Ogura Y, Ooka T, Iguchi A *et al.* Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 17939–44.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; **16**: 111–20.
- Phan MD, Kidgell C, Nair S *et al.* Variation in *Salmonella enterica* serovar Typhi IncHI1 plasmids during the global spread of resistant typhoid fever. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 716–27.
- McGann P, Hang J, Clifford RJ *et al.* Complete sequence of a novel 178-kilobase plasmid carrying *bla*<sub>NDM-1</sub> in a *Providencia stuartii* strain isolated in Afghanistan. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 1673–9.
- Du XD, Li DX, Hu GZ *et al.* Tn1548-associated *armA* is co-located with *qnrB2*, *aac(6′)-Ib-cr* and *bla*<sub>CTX-M-3</sub> on an IncFII plasmid in a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B strain isolated from chickens in China. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 246–8.
- Fernández-Alarcón C, Singer RS, Johnson TJ. Comparative genomics of multidrug resistance-encoding IncA/C plasmids from commensal and pathogenic *Escherichia coli* from multiple animal sources. *PLoS One* 2011; **6**: e23415.
- Li B, Sun JY, Liu QZ *et al.* First report of *Klebsiella oxytoca* strain coproducing KPC-2 and IMP-8 carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 2937–41.
- Jiang Y, Yu D, Wei Z *et al.* Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plasmid pKP048, carrying *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>DHA-1</sub>, *qnrB4*, and *armA*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **54**: 3967–9.
- González-Zorn B, Teshager T, Casas M *et al.* *armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2005; **11**: 954–6.
- Golebiewski M, Kern-Zdanowicz I, Zienkiewicz M *et al.* Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>CTX-M-3</sub>. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 3789–95.
- Zhou H, Zhang T, Yu D *et al.* Genomic analysis of the multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain MDR-ZJ06 widely spread in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 4506–12.
- Petty NK, Feltwell T, Pickard D *et al.* *Citrobacter rodentium* is an unstable pathogen showing evidence of significant genomic flux. *PLoS Pathog* 2011; **7**: e1002018.
- Wang X, Kim Y, Ma Q *et al.* Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nat Commun* 2010; **1**: 147.
- Wang X, Kim Y, Wood TK. Control and benefits of CP4-57 prophage excision in *Escherichia coli* biofilms. *ISME J* 2009; **3**: 1164–79.
- Christie GE, Calendar R. Interactions between satellite bacteriophage P4 and its helpers. *Annu Rev Genet* 1990; **24**: 465–90.
- Muniesa M, Garcia A, Miro E *et al.* Bacteriophages and diffusion of  $\beta$ -lactamase genes. *Emerg Infect Dis* 2004; **10**: 1134–7.

## Příloha 16

LITERAK, I., REITSCHMIED, T., BUJNAKOVA, D., DOLEJSKA, M., CIZEK, A., BARDON, J., POKLUDOVA, L., ALEXA, P., HALOVA, D., JAMBOROVA, I., 2013, Broilers as a source of quinolone-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in the Czech Republic: Microbial Drug Resistance, v. 19, p. 57-63.

### Souhrn

---

Cílem studie bylo vyšetřit opracovaná těla jatečných brojlerů na přítomnost rezistentních a patogenních kmenů *E. coli*. Rezistence k antibiotikům byla prokázána u 82 % izolátů, přičemž dominovala rezistence ke kyselině nalidixové a ciprofloxacinu. Dvacet procent rezistentních kmenů náleželo k ExPEC. Plazmidově determinovaná rezistence k fluorochinolonům se vyskytovala ojediněle a žádné izoláty s produkcí ESBL nebyly zachyceny. Vysoká prevalence kmenů rezistentních k ciprofloxacinu je odrazem frekventovaného použití fluorochinolonů v chovech drůbeže v ČR. Drůbeží maso může představovat významný zdroj rezistentních a patogenních bakterií pro člověka.





## Broilers as a Source of Quinolone-Resistant and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in the Czech Republic

Ivan Literak,<sup>1,2</sup> Tomas Reitschmied,<sup>1</sup> Dobroslava Bujnakova,<sup>3</sup> Monika Dolejska,<sup>1,2</sup> Alois Cizek,<sup>2,4</sup> Jan Bardon,<sup>5,6</sup> Lucie Pokludova,<sup>7</sup> Pavel Alexa,<sup>8</sup> Dana Halova,<sup>1</sup> and Ivana Jamborova<sup>1</sup>

Extraintestinal *Escherichia coli* infections are associated with extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) strains. A total of 114 *E. coli* isolates were characterized regarding their antimicrobial resistance in a prospective study of 319 broilers from 12 slaughterhouses in the Czech Republic, a European Union member, during 2008. PCR-based assays to define ExPEC-associated traits were performed in resistant strains. Consumption of antimicrobial drugs by poultry in the Czech Republic was also analyzed. Antibiotic resistance was detected in 82% of isolates. Resistance to nalidixic acid and ciprofloxacin was predominant. Plasmid-mediated quinolone resistance genes, *qnrB19* and *qnrS1*, were detected in 1 and 3 of 93 resistant isolates, respectively. Twenty-three percent of resistant isolates were considered as ExPEC. In total, 972 kg of flumequine, enrofloxacin, and difloxacin were used in poultry in the Czech Republic during 2008. High prevalence of broilers with ciprofloxacin-resistant *E. coli* isolates was linked to consumption of quinolones in poultry. Broilers may comprise an important vehicle for community-wide dissemination of fluoroquinolone-resistant *E. coli* and ExPEC. Withdrawal of fluoroquinolones from use in chicken production should be seriously considered in the Czech Republic and the European Union as well.

### Introduction

**E***SCHERICHIA COLI* CAUSING extraintestinal diseases are known as extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) and include the uropathogenic *E. coli* (UPEC), neonatal meningitis *E. coli*, and avian-pathogenic *E. coli* (APEC) subpathotypes.<sup>44</sup> A number of studies have shown that members of various ExPEC subpathotypes harbor similar virulence-associated genes. Characterization of ExPEC strains using various typing techniques has shown many similarities, despite their isolation from different host species, thus leading to the hypothesis that ExPEC may have zoonotic potential.<sup>44</sup>

The use of fluoroquinolone agents in food animal production is suspected of selecting fluoroquinolone-resistant

*E. coli* that can be transmitted to humans via the food chain.<sup>18</sup> The epidemiological link between poultry consumption and human disease due to fluoroquinolone-resistant bacteria, combined with the high prevalence of fluoroquinolone-resistant bacteria in retail poultry products, has prompted the U.S. Food and Drug Administration to propose the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry.<sup>6</sup> In the European Union, including the Czech Republic, there are currently, in place, recommendations for the prudent use of fluoroquinolones in food-producing animals.<sup>16</sup>

Retail poultry products are routinely contaminated heavily with avian fecal *E. coli*. Such *E. coli* extensively contaminate kitchen surfaces during meal preparation and can subsequently be isolated from the feces of a person preparing

<sup>1</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic.

<sup>2</sup>CEITEC VFU, Veterinary and Pharmaceutical University Brno, Brno, Czech Republic.

<sup>3</sup>Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Kosice, Slovakia.

<sup>4</sup>Department of Infectious Diseases and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic.

<sup>5</sup>State Veterinary Institute, Olomouc, Czech Republic.

<sup>6</sup>Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Olomouc, Czech Republic.

<sup>7</sup>Institute for State Control of Veterinary Biologicals and Medicaments, Brno, Czech Republic.

<sup>8</sup>Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic.

meals.<sup>32</sup> Thus, the possibility of foodborne transmission of ExPEC and/or fluoroquinolone-resistant *E. coli* from poultry to humans is highly plausible.

As early as 1976, Levy *et al.* reported the transfer of tetracycline resistance genes between chicken *E. coli* strains, from chicken to chicken, and from chicken to humans.<sup>31</sup> The aim of our study was to characterize fluoroquinolone- and cephalosporin-resistant *E. coli* and ExPEC isolates from broilers in the Czech Republic and the overall consumption of quinolones and cephalosporins used in poultry in the country during 2008.

## Materials and Methods

### Chicken meat sampling scheme and isolation of *E. coli*

Broilers were examined from April to December 2008 at 12 poultry slaughterhouses in the Czech Republic serving more than 300 Czech broiler farms. A total of 319 broilers were sampled. Each randomly sampled broiler originated from a group of broilers from one farm sent to a slaughterhouse on 1 day. The whole chilled broiler was placed individually into a sterile plastic bag and transported on ice to the laboratory. The skin of the broiler's body was detached from the rest of the body and a piece weighing 27 g was taken as a sample. The skin sample was homogenized for 1 min using a homogenizer in 243 ml of buffered peptone water (Oxoid). One-milliliter aliquots from individual suspension samples were frozen with a few drops of glycerin at  $-18^{\circ}\text{C}$  until further examination. Individual samples were then enriched in the MacConkey broth and cultivated on MacConkey agar (MCA; Oxoid) for *E. coli* isolation. All *E. coli* strains were identified using the API 10S test (bioMérieux). One *E. coli* isolate per sample was randomly selected and further analyzed.

### Antibiotic susceptibility testing

The disk-diffusion method<sup>8</sup> was used to test susceptibilities of *E. coli* isolates to 12 antimicrobial substances: amoxicillin/clavulanic acid (30  $\mu\text{g}$ ), ampicillin (10  $\mu\text{g}$ ), cephalothin (30  $\mu\text{g}$ ), ceftazidime (30  $\mu\text{g}$ ), chloramphenicol (30  $\mu\text{g}$ ), ciprofloxacin (5  $\mu\text{g}$ ), gentamicin (10  $\mu\text{g}$ ), nalidixic acid (30  $\mu\text{g}$ ), streptomycin (10  $\mu\text{g}$ ), sulfamethoxazole/trimethoprim (25  $\mu\text{g}$ ), sulfonamide compounds (300  $\mu\text{g}$ ), and tetracycline (30  $\mu\text{g}$ ) (Oxoid). For the selective isolation of ESBL (extended-spectrum beta-lactamase)-positive *E. coli*, all samples enriched in the MacConkey broth were subcultivated on MCA with cefotaxime (2 mg/L) and the cefotaxime-resistant isolates should have been tested in the double-disk synergy test.<sup>43</sup>

### PCR and testing of antibiotic resistance genes

In *E. coli* isolates found to be resistant to one or more of the antibiotics listed above, antibiotic resistance genes and integrons were detected by PCR using specific primers as described previously.<sup>33</sup> These *E. coli* isolates were also tested for the plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* and the PCR products were further analyzed by sequencing.<sup>3,4,12,27,28,37,38,40,47</sup> PMQR-positive isolates were examined for minimum inhibition concentrations of ciprofloxacin and nalidixic acid using the agar dilution method in accordance with CLSI standards.<sup>8</sup>

### Detection of extraintestinal pathogenic *E. coli*

Lysates of each *E. coli* isolate resistant to antimicrobials were tested by PCR amplification for virulence factors or genes *iutA*, *cvaC*, *kpsII*, *iss*, *tsh*, *papC*, *ibeA*, and *felA*.<sup>11,13,17,22,30,35</sup> The PCR cycle was  $94^{\circ}\text{C}$  for 5 min followed by 30 cycles at  $94^{\circ}\text{C}$  for 1 min, at the annealing temperature specific for each pair of primers for 1 min, and at  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 min. As previously reported,<sup>23</sup> ExPEC was defined by detection of  $\geq 2$  of *iutA*, *kpsII*, *tsh*, *papC*, *ibeA*, and *felA* genes.

### Serotyping

Somatic O-antigen typing was performed using a U-type microplate agglutination assay. *E. coli* strains were cultured in the nutrient broth (Imuna). After cultivation, viability staining of *E. coli* strains was made using triphenyltetrazolium chloride and heating at  $120^{\circ}\text{C}$  for 1 h followed. Agglutination was performed with a set of 70 types of O-antisera, encompassing the most common O-serogroups. O-antisera were prepared by immunization of rabbits.<sup>41</sup>

### Pulse-field gel electrophoresis, determination of *E. coli* phylogenetic group, and transferability of PMQR genes by conjugation

PMQR-positive *E. coli* isolates were typed by XbaI pulse-field gel electrophoresis (PFGE).<sup>5</sup> Macrorestriction patterns were analyzed using the BioNumerics 6.6 fingerprinting software (Applied Maths). Cluster analysis of the Dice similarity indices was done to generate a dendrogram describing the relationships among PFGE profiles. The level of similarity between patterns was defined at 85%. Identification of *E. coli* phylogenetic groups (A, B1, B2, and D) was performed using PCR.<sup>7</sup> Transferability of PMQR genes was tested by conjugation and transformation.<sup>36</sup>

### Consumption of antimicrobial drugs in poultry in the Czech Republic

Sales data were collected from all wholesalers and feed mills licensed in the Czech Republic during the period monitored during 2008. Special attention was given to the groups of fluoroquinolones and cephalosporins of the 3rd and 4th generations, in relation to which detailed data have been collected, as these substances have been under a prudent use regimen in the Czech Republic since 1998.

## Results

### Antimicrobial resistance in chicken *E. coli* isolates

A total of 114 *E. coli* isolates was obtained from 319 broiler samples. Resistance to one or more antibiotics was detected in 93 (82%) isolates. In total, 33 (29%) of 93 isolates were resistant to only one antimicrobial agent and the remaining 60 isolates were resistant to more than one agent. The resistance patterns in individual isolates were highly variable. Resistance to nalidixic acid and ciprofloxacin was predominant, being found in 78 (68%) and 30 (26%, Table 1) isolates, respectively. Resistance to tetracycline was detected in 29 (25%) isolates, to ampicillin in 27 (24%), to sulfonamides in 22 (19%), to streptomycin in 18 (16%), to sulfamethoxazole/trimethoprim in 11 (10%), to cephalothin and chloramphenicol each in 4 (4%), and to amoxicillin-clavulanic acid and

TABLE 1. CIPROFLOXACIN-RESISTANT *ESCHERICHIA COLI* (RESULTS OF DISK DIFFUSION METHOD) FROM BROILERS (*N*=319) SLAUGHTERED IN THE CZECH REPUBLIC

Antibiotic resistance phenotype	Antibiotic resistance genes and integrons	Number of isolates
CipNa	Not determined	10
CipNa	<i>int1</i> , class 1 integron 1 kb: <i>aadA1</i>	1
ACipNa	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	3
CipNaS	<i>aadA1</i>	1
CipNaS	<i>strA</i>	1
CipNaT	<i>tetA</i>	2
ACipNaS	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA</i>	1
ACipNaSu	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>sul2</i>	1
CipNaSSu	<i>strA</i> , <i>sul2</i>	1
CipNaSuT	<i>sul2</i> , <i>tetA</i>	1
ACCipNaSu	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>cat</i> , <i>sul1</i> , <i>int1</i> , class 1 integron 1 kb: <i>aadA1</i>	1
ACipNaSSu	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA</i> , <i>sul2</i>	1
ACipNaST	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA</i> , <i>tetB</i>	1
CipNaSuSxtT	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>	1
ACipNaSSuT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>	1
CipNaSSuSxtT	<i>strA</i> , <i>aadA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>	1
ACfCipNaSuSxtT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>sul2</i> , <i>tetB</i>	1
ACCFipNaSSuSxtT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>cmlA</i> , <i>aadA1</i> , <i>sul3</i> , <i>tetA</i> ,	1
Total		30

Antibiotic resistance phenotype: A, ampicillin; C, chloramphenicol; Cf, cephalothin; Cip, ciprofloxacin; Na, nalidixic acid; S, streptomycin; Su, sulfonamides cp.; Sxt, sulfamethoxazole/trimethoprim; T, tetracycline.

ceftazidime each in two (2%) isolates. None of the isolates was resistant to gentamicin. No ESBL-producing isolates were found in the Czech broilers.

The following genes were identified in *E. coli* isolates: *tetA*, *tetB* (resistance to tetracycline), *bla*<sub>TEM</sub> (beta-lactams), *strA*,

*aadA1* (streptomycin), *sul1*, *sul2*, *sul3* (sulfonamides), *cat* and *cmlA* (chloramphenicol). All ampicillin-resistant isolates were positive for the presence of the *bla*<sub>TEM</sub> gene. As regards to tetracycline resistance determinants, the *tetA* gene was detected in 22 and *tetB* in 7 of 29 tetracycline-resistant strains. Screening for *sul*-genes revealed the presence of at least one *sul*-type determinant in sulfonamide-resistant *E. coli* isolates. In 18 isolates, a single *sul*-type resistance determinant was found (*sul1* in 5, *sul2* in 11, and *sul3* in two isolates), while in 5 isolates, 2 different *sul* genes (both *sul1* and *sul2*) were found. Resistance to streptomycin was connected with the gene *strA* and/or *aadA1*. All chloramphenicol-resistant isolates were positive for presence of either the gene *cat* or *cmlA*.

Eleven of 93 antibiotic-resistant *E. coli* isolates from the broiler samples yielded the *int11* gene and class 1 integron. A class 1 integron of 1 kb with the gene cassette *aadA1* was present in seven *E. coli* isolates, and four isolates contained a 1.5-kb integron with the gene cassettes, *dfr1-aadA1*. Two of all the antibiotic-resistant isolates were positive for the *int12* and class 2 integron with the gene cassettes, *estX-sat-aadA1* (Table 2).

From a total of 93 antibiotic-resistant *E. coli* isolates obtained from the broiler samples, PMQR genes were detected in 4 (4%) strains. Three isolates were positive for the *qnrS1* gene and one isolate was positive for the *qnrB19* gene (Table 3). The genes *qnrA*, *qnrC*, *qnrD*, *aac(6′)-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* were not detected. Transformation and conjugation to the *E. coli* and *Salmonella* strains of plasmids harboring the *qnr* genes were successful.

*Phylogenetic analysis, detection of virulence genes (ExPEC), O-antigen serotypes*

PCR analysis of the 93 resistant isolates showed that phylogroup B2 was predominant (41%) followed by phylogroups A (26%) and D (24%), whereas phylogroup B1 (9%) was minor in our collection. In total, 65% of isolates belonged to pathogenic groups B2 and D. Two of the PMQR-positive isolates showed the same PFGE profile and belonged to the B1 phylogenetic group (Table 3).

TABLE 2. CHARACTERISTICS OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES WITH CLASS 1 AND 2 INTEGRONS AND GENE CASSETTES

Isolate No.	Phylo-genetic group	O-antigen serotype	Size of class 1 and 2 integron (kb)	Gene cassettes	<i>int11</i>	<i>int12</i>	<i>sul</i>	Antibiotic resistance phenotype	Additional resistance genes	Virulence genes
O/67	A	O20	1	<i>aadA1</i>	+	-	-	Na	-	<i>iutA</i>
J/85	D	O25	1	<i>aadA1</i>	+	-	-	CipNa	-	<i>iutA</i> , <i>coaC</i> , <i>iss</i> , <i>kps</i>
J/102	B2	nt	1	<i>aadA1</i>	+	-	<i>sul3</i>	ACSu	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>cmlA</i>	<i>iutA</i> , <i>tsh</i>
J/33	B2	O108	1	<i>aadA1</i>	+	-	-	NaST	<i>tetA</i>	<i>iutA</i> , <i>coaC</i>
P/70	B2	nt	1	<i>aadA1</i>	+	-	<i>sul2</i>	ASSuSxt	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA</i>	<i>iutA</i> , <i>coaC</i> , <i>iss</i>
J/43	B2	nt	1	<i>aadA1</i>	+	-	<i>sul1</i>	ANaSuT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tetB</i>	<i>iutA</i> , <i>coaC</i> , <i>tsh</i> , <i>papC</i>
J/53	B2	O145	1	<i>aadA1</i>	+	-	<i>sul1</i>	ACCipNaSu	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>cat</i>	<i>iutA</i>
J/3	B2	O140	1.5	<i>dfr1-aadA1</i>	+	-	-	ANa	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>coaC</i>
J/76	B2	nt	1.5	<i>dfr1-aadA1</i>	+	-	-	NaT	<i>tetA</i>	<i>iutA</i> , <i>coaC</i> , <i>kps</i>
J/4	D	nt	1.5	<i>dfr1-aadA1</i>	+	-	<i>sul1</i>	NaSuSxtT	<i>tetA</i>	<i>coaC</i> , <i>tsh</i>
P/64	B2	nt	1.5	<i>dfr1-aadA1</i>	+	-	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	ASSuSxtT	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>strA</i> , <i>tetA</i>	<i>tsh</i>
J/99	B2	O8	2.5	<i>estX-sat-aadA1</i>	-	+	-	ANaS	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>iutA</i> , <i>coaC</i>
P/105	D	O86	2.5	<i>estX-sat-aadA1</i>	-	+	-	ANaS	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>iutA</i>

Antibiotic resistance phenotype: A, ampicillin; C, chloramphenicol; Cip, ciprofloxacin; Na, nalidixic acid; S, streptomycin; Su, sulfonamides cp.; Sxt, sulfamethoxazole/trimethoprim; T, tetracycline; nt, not typeable.

TABLE 3. CHARACTERIZATION OF PMQR-POSITIVE *ESCHERICHIA COLI* FROM BROILERS

Strain No.	Antibiotic resistance		Additional resistance genes	MIC (mg/L) <sup>a</sup> Na/Cip	PFGE profile	Phylo-genetic group	O-antigen serotype	Virulence factor genes	Conjugation to <i>E. coli</i>	Salmonella
	phenotype	PMQR genes								
J/13	ANa	<i>qnrS1</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	256/1	a	A	nt	<i>cvaC</i> , <i>iss</i> , <i>iut</i> , <i>kps</i> , <i>tsh</i>	+	+
O/66	CfT	<i>qnrB19</i>	<i>tetB</i>	32/0.25	b	B1	nt	<i>kps II</i>	+	+
P/65	ANa	<i>qnrS1</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	512/4	c	B1	nt	<i>iss</i> , <i>kps II</i>	+	+
P/67	ANa	<i>qnrS1</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	512/4	c	B1	nt	<i>iss</i> , <i>kps II</i>	+	+

<sup>a</sup>Minimum inhibitory concentration of nalidixic acid and ciprofloxacin to donor strains.

Antibiotic resistance phenotype: A, ampicillin; Cf, cephalothin; Cip, ciprofloxacin; Na, nalidixic acid; T, tetracycline; PMQR, plasmid-mediated quinolone resistance; MIC, minimum inhibition concentration; PFGE, Pulse-field gel electrophoresis.

At least one virulence gene was detected in 68 (73%) out of 93 resistant isolates. The genes *iutA*, *cvaC*, *tsh*, *kpsII*, *iss*, *papC*, *ibeA*, and *felA* occurred in frequencies of 46%, 28%, 26%, 22%, 20%, 4%, 1%, and 0%, respectively. Among these 93 isolates, 21 (23%) carried two or more virulence genes *iutA*, *kpsII*, *tsh*, *papC*, and *ibeA*, and hence, were considered as ExPEC isolates.

The O-antigen serotypes were highly variable. A total of 48 out of 93 resistant isolates were successfully determined by agglutination. These strains belonged to the following serotypes (according Johnson *et al.*,<sup>24</sup> those strains in bold should be considered as associated with ExPEC: **O2** (1 isolate, B2 phylogroup, with *iutA*, *cvaC*, *tsh*, *kpsII*, *iss*, and *iba* genes), **O4** (1, A, without virulence genes tested), **O7** (1, A, without virulence genes tested), O8 (6), O9 (3), **O11** (1, B2, *cvaC*, *tsh*, *kpsII*), **O18** (1, A, *iutA*), O20 (2), O22 (2), **O25** (1, D, *iutA*, *cvaC*, *iss*, *kpsII*), O51 (1), O54 (1), O69 (1), O71 (2), **O75** (1, A, *iss*), O86 (6), O88 (1), O103 (2), O108 (2), O115 (1), O119 (2), O139 (4), O140 (1), and O145 (4).

#### Consumption of antimicrobial drugs in chickens and turkeys in the Czech Republic

In 2008, tetracyclines (15,200 kg), aminopenicillins (5,400 kg), and sulfonamides, including sulfonamides in combinations (2,660 kg) were the three groups of antimicrobials used most frequently in chickens and turkeys (for mass medication). One substance from the quinolone group (flumequine) and two from the fluoroquinolone group (enrofloxacin and difloxacin) are used in poultry in the Czech Republic. Totally, 972 kg of these substances were consumed in chickens and turkeys in 2008. This takes in ~70% of the total consumption of all quinolones and fluoroquinolones used in animals for which veterinary medicinal products containing these substances are authorized in the Czech Republic. Veterinary medicinal products containing cephalosporins are not authorized for poultry in the Czech Republic.

#### Discussion

Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry was broadly reviewed by Gyles.<sup>19</sup> APEC isolates were found to be often highly resistant, especially to tetracycline, streptomycin, and sulfonamides. The European data on antimicrobial resistance in commensal *E. coli* from poultry show remarkable differences in various countries. The situation in the Czech Republic is similar to those in the Netherlands, France, and UK regarding the resistance to old-generation

antibiotics and similar to those in Spain, Slovakia, and Iran regarding the fluoroquinolones.

Surprisingly, a high percentage of *E. coli* strains resistant to such new quinolones as ciprofloxacin, norfloxacin, flumequine, and pefloxacin (7%–16%) was found in healthy chickens in Spain already in the 1990s and a high prevalence in chickens of *E. coli* resistant to nalidixic acid and ciprofloxacin and carrying a virulence factor specific to ExPEC has been found in Spain recently.<sup>2,10</sup> Moreover, 35% of the chicken *E. coli* isolates in Spain satisfied criteria for ExPEC.

It has been postulated that the most likely evolutionary source of human fluoroquinolone-resistant *E. coli* strains is fluoroquinolone-susceptible chicken and not fluoroquinolone-susceptible human strains.<sup>9,25</sup> Chicken *E. coli* strains are not species-specific. Fluoroquinolone-resistant isolates in humans were found to be similar to resistant isolates in chickens and quite different from susceptible human isolates.<sup>25</sup> It was indicated that fluoroquinolone use in food animals is an important source of the emerging fluoroquinolone resistance among ExPEC and that resistant *E. coli* should therefore be considered a foodborne pathogen.<sup>25</sup>

Healthy broiler chickens from various farms in Slovakia were tested for the presence of *E. coli* isolates resistant to nalidixic acid and ciprofloxacin during 2006–2008.<sup>29</sup> High frequencies of resistance to nalidixic acid and ciprofloxacin were found. High quinolone resistance was considered to be a consequence of frequent therapeutic administrations of enrofloxacin on Slovak poultry farms. Moreover, broiler meat at retail originating from Slovakia, Czech Republic, and Poland was examined for the presence of ExPEC isolates.<sup>14</sup> A total of 28 isolates were analyzed. Thirteen of these belonged to the B2 phylogroup and all of these B2 isolates harbored ≥2 of the virulence factors *iutA*, *iss*, *cvaC*, *tsh*, and *papC*. The majority of those isolates belonged to the pathogenic serotype O78.

High frequencies of *E. coli* isolates resistant to nalidixic acid and ciprofloxacin were observed in Iran, and this resistance pattern was presumed to be linked to flumequine and enrofloxacin commonly used in poultry flocks there.<sup>34</sup> The results of our study strongly support the hypothesis that the emergence and dissemination of fluoroquinolone-resistant *E. coli* is a consequence of fluoroquinolone use in chickens.

Regarding the high prevalence of fluoroquinolone-resistant *E. coli* in broilers presumably caused by high consumption of fluoroquinolones on Czech chicken farms, it is useful to mention the results of a similar nationwide study from 2009 on the prevalence of *Campylobacter* spp. including



antibiotic-resistant isolates in the Czech Republic.<sup>1</sup> The patterns of antibiotic resistance in *Campylobacter* spp. and *E. coli* isolates from broilers in the Czech Republic are very similar, and they probably are caused by the same selection pressure of quinolones administered on farms.

We found broilers to be contaminated with 23% of *E. coli* isolates considered as ExPEC. Some of the APEC strains tested in a rat model of human neonatal meningitis were able to cause meningitis, supporting the hypothesis that APEC strains have a zoonotic potential.<sup>44</sup> *E. coli* isolates from broiler chicken meat in Denmark belonging to the B2 phylogroup and carrying  $\geq 2$  virulence factors were tested for their ability to cause urinary tract infection (UTI) in a murine model representative of UTI in humans.<sup>21</sup> All isolates tested caused UTI in mice, and thereby *in vivo* evidence was provided for the first time that *E. coli* UTI is a zoonosis. Moreover, UPEC can cause significant diseases in poultry, as has been demonstrated *in vivo* using a chicken challenge model.<sup>48</sup> Comparing serotypes supposedly associated with ExPEC according Johnson *et al.*<sup>24</sup> with the presence of virulence genes tested, we have confirmed such an association in serotypes O2, O11, and O25, but not in O4, O7, O18, and O75.

The proportion of ExPEC isolates with resistance to fluoroquinolones increased from 8% in 2001 to 26% in 2008 in Czech human microbiology laboratories<sup>15</sup> and it can be associated with the fact that chicken meat consumption was increasing simultaneously in the Czech Republic to 25 kg per person per year in 2008, which is above the EU average.

A quite different situation regarding fluoroquinolone-resistant *E. coli* isolates from poultry has been reported in the U.S. Only 1 of 62 retailed chicken products with nalidixic acid-resistant *E. coli* was found to be also resistant to ciprofloxacin.<sup>23</sup> In that study, 21% of the *E. coli* isolates satisfied the criteria for ExPEC.<sup>23</sup> In a later study from Minnesota and Wisconsin, only 7 out of 931 *E. coli* isolates of human and poultry origin were found to be resistant to ciprofloxacin.<sup>26</sup> Similarly, resistance to ciprofloxacin was found to be only exceptionally occurring in ExPEC in Canada, and no such isolate was isolated from chicken in that country.<sup>39</sup>

Due to the increasing emergence of antimicrobial resistance, several measures have come into force within the EU during the past decade. Using of antimicrobials as growth promoters in food-producing animals has been wholly prohibited in the EU since 1 January 2006. Recommendations for the prudent use of quinolones/fluoroquinolones in food-producing animals were published by the European Medicines Agency.<sup>16</sup> Comparing EU policy to, for example, the U.S., where growth promoters are allowed to be used to enhance production in food-producing animals, EU rules seems to be more restrictive. On the other hand, U.S. policies are more restrictive regarding the use of fluoroquinolones, especially in respect to utilizing this antimicrobial group in poultry. A ban is in force on using enrofloxacin in poultry and off-label use of fluoroquinolones also is prohibited.<sup>45</sup> These different approaches in the EU and U.S. can explain the great difference in the prevalence of ciprofloxacin-resistant *E. coli* in chicken in these areas. While the prevalence is high in Europe, in the U.S. it is quite substantially lower.

The three most frequently used groups of antimicrobials on poultry farms in the Czech Republic correspond well to the detected resistances to tetracyclines, aminopenicillins, and

sulfonamides (including sulphonamide in combinations) in chicken *E. coli* in our study. The resistance determinants indicating the presence of ESBLs were not detected in the samples examined. This corresponds to the fact that cephalosporins are not approved for use in broilers in the Czech Republic.

Excessive use of antimicrobials on chicken and turkey farms in Tunisia resulted in a high percentage of resistance to some antimicrobials (up to 95%), including fluoroquinolones (20% resistance to ciprofloxacin) in *E. coli* isolates from meat samples.<sup>42</sup> The presence of class 1 and 2 integrons was demonstrated in 52% ( $n = 166$ ) of *E. coli* isolates in that study. Even though we found some similar integrons and *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes in *E. coli* isolates from chicken reared in the Czech Republic, the prevalence of integron-positive isolates was much lower (only 14%). This could mean that the use of antimicrobials in poultry in the Czech Republic is not so excessive as is that in North African Tunisia.

We found the PMQR genes, *qnrS1* and *qnrB19*. *Salmonella* and/or *E. coli* isolates with the *qnrS1* and *qnrB19* genes were found recently in food and food-producing animals in various European countries.<sup>20,46</sup> Our findings of these genes correspond with these reports.

In conclusion, our results provide support from the Czech Republic for the hypothesis that chicken products can be a source of fluoroquinolone-resistant ExPEC for humans and that selection of fluoroquinolone-resistant *E. coli* strains in chickens is a result of fluoroquinolone use in chickens. These are good reasons for efforts to eliminate such organisms from the food supply, including by withdrawing fluoroquinolones from use in chicken production, improving the hygienic aspects of chicken processing, and improving distribution practices. We agree that reducing fluoroquinolone use in food animals will improve human health and that widespread use of these critically important antimicrobial agents in food animals poses a needless additional risk to humans in both the community and the hospital.<sup>9</sup>

### Acknowledgments

We thank Ivo Papousek, Marie Slavikova, Eva Suchanova, Dagmar Tausova, and Raluca Uricariu for their cooperation in the laboratory. Our thanks go to Lars Hansen (University of Copenhagen, Denmark), Lina Cavaco, and Henrik Hasman (National Food Institute, Copenhagen, Denmark) for providing control strains. This work was supported by the project "CEITEC—Central European Institute of Technology" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from the European Regional Development Fund.

### Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

### References

- Bardon, J., M. Kolar, R. Karpiskova, and K. Hricova. 2011. Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* spp. in broilers at retail in the Czech Republic and their antibiotic resistance. *Food Control* 22:328–332.
- Blanco, J.E., M. Blanco, A. Mora, and J. Blanco. 1997. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 35:2184–2185.

3. Cattoir, V., L. Poirel, V. Rotimi, C.J. Soussy, and P. Nordmann. 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**:394–397.
4. Cavaco, L.M., H. Hasman, S. Xia, and F.M. Aarestrup. 2009. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovars Kentucky and Bovismorbificans of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:6038.
5. CDC. 2004. One-Day (24–28 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). [www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli\\_salmonella\\_shigella\\_protocols.pdf](http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli_salmonella_shigella_protocols.pdf) (1 May 2011, date last accessed) (Online).
6. Cimons, M. 2001. FDA planning to halt ag use of two antibiotics. *ASM News* **67**:9–10.
7. Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen. 2000. Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4555–4558.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 8th Informational Supplement. CLSI, Wayne, PA.
9. Collignon, P., and F.J. Angulo. 2006. Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*: food for thought. *J. Infect. Dis.* **194**:8–10.
10. Cortes, P., V. Blanc, A. Mora, G. Dahbi, J.E. Blanco, M. Blanco, C. Lopez, A. Andreu, F. Navarro, M.P. Alonso, G. Bou, J. Blanco, and M. Llagostera. 2010. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:2799–2805.
11. Delicato, E.R., B. Guimaraes de Brito, L.C.J. Gaziri, and M.C. Vidotto. 2003. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet. Microbiol.* **94**:97–103.
12. Dolejska, M., E. Duskova, J. Rybarikova, D. Janoszowska, E. Roubalova, K. Dibdakova, G. Maceckova, L. Kohoutova, I. Literak, J. Smola, and A. Cizek. 2011. Plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**:757–764.
13. Dozois, C.M., M. Dho-Moulin, A. Bree, J.M. Fairbrother, C. Desautels, and R. Curtiss. 2000. Relation between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. *Infect. Immun.* **68**:414–554.
14. Drugdova, Z., V. Kmet, and D. Bujnakova. 2010. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from chicken meat in Slovakia. *J. Food Nutr. Res.* **49**:10–13.
15. European Centre for Disease Prevention and Control. 2011. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm.
16. European Medicines Agency. 2006. Reflection Paper on the Use of Fluoroquinolones in Food Producing Animals—Precautions for Use in the SPC Regarding Prudent Use Guidance, EMEA/CVMP/416168/2006-FINAL. 8 November 2006. Available at: [www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Other/2009/10/WC500005173.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2009/10/WC500005173.pdf), Accessed 23 March 2012) (Online).
17. Foley, S.L., S.M. Horne, C.W. Giddings, M. Robinson, and L.K. Nolan. 2000. *Iss* from a virulent avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* **44**:185–191.
18. Garau, J., M. Xercavins, M. Rodriguez-Carballeira, J. Gomez-Vera, I. Coll, D. Vidal, T. Llovet, and A. Ruiz-Bremon. 1999. Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2736–2741.
19. Gyles, C.L. 2008. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Anim. Health Res. Rev.* **9**:149–58.
20. Hordijk, J., A.B. Bosman, A. van Essen-Zandbergen, K. Veldman, C. Dierikx, J.A. Wagenaar, and D. Mevius. 2011. *qnrB19* gene bracketed by IS26 on a 40-kilobase IncR plasmid from an *Escherichia coli* isolate from a veal calf. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:4534.
21. Jakobsen, L., A.M. Hammerum, and N. Frimodt-Moller. 2010. Virulence of *Escherichia coli* B2 isolates from meat and animals in a murine model of ascending urinary tract infection (UTI): evidence that UTI is a zoonosis. *J. Clin. Microbiol.* **48**:2978–2980.
22. Johnson, J.R., and A.L. Stell. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.* **181**:261–272.
23. Johnson, J.R., A.C. Murray, A. Gajewski, M. Sullivan, P. Snippes, M.A. Kuskowski, and K.E. Smith. 2003. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2161–2168.
24. Johnson, J.R., M.A. Kuskowski, K. Smith, T.T. O'Bryan, and S. Tatini. 2005. Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail food. *J. Infect. Dis.* **191**:1040–1049.
25. Johnson, J.R., M.A. Kuskowski, M. Menard, A. Gajewski, M. Xercavins, and J. Garau. 2006. Similarity between human and chicken *Escherichia coli* isolates in relation to ciprofloxacin resistance status. *J. Infect. Dis.* **194**:71–78.
26. Johnson, J.R., M.R. Sannes, C. Croy, B. Johnston, C. Clabots, M.A. Kuskowski, J. Bender, K.E. Smith, P.L. Winokur, and E.A. Belongia. 2007. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002–2004. *Emerg. Infect. Dis.* **13**:838–846.
27. Kim, H.B., C.H. Park, C.J. Kim, E.C. Kim, G.A. Jacoby, and D.C. Hooper. 2009. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:639–645.
28. Kim, H.B., M. Wang, C.H. Park, E.C. Kim, G.A. Jacoby, and D.C. Hooper. 2009. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:3582–3584.
29. Kmet, V., and M. Kmetova. 2010. High level of quinolone resistance in *Escherichia coli* from healthy chicken broilers. *Folia Microbiol.* **55**:79–82.
30. Le Bouguenec, C., M. Archambaud, and A. Labigne. 1992. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa* and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**:1189–1193.
31. Levy, S.B., G.B. Fitzgerald, and A.B. Macone. 1976. Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature* **260**:40–42.
32. Linton, A.H., K. Howe, P.M. Bennett, and M.H. Richmond. 1977. The colonization of the human gut by antibiotic resistant *Escherichia coli* from chickens. *J. Appl. Bacteriol.* **43**:465–469.
33. Literak, I., M. Dolejska, T. Radimersky, J. Klimes, M. Friedman, F.M. Aarestrup, H. Hasman, and A. Cizek. 2010.

- Antimicrobial resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *J. Appl. Microbiol.* **108**:1702–1711.
34. Moniri, R., and K. Dastehgoli. 2005. Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from healthy broilers with previous exposure to fluoroquinolones: is there a link? *Microbiol. Ecol. Health Dis.* **17**: 69–74.
  35. Moulin-Schouleur, M., C. Schouleur, P. Tailliez, M.R. Kao, A. Bree, P. Germon, E. Oswald, J. Mainil, M. Blanco, and J. Blanco. 2006. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3484–3492.
  36. Olesen, I., H. Hasman, and F.M. Aarestrup. 2004. Prevalence of beta-lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microb. Drug Resist.* **10**:334–340.
  37. Park, C.H., A. Robicsek, G.A. Jacoby, D. Sahm, and D.C. Hooper. 2006. Prevalence in the United States of *aac(6')Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:3953–3955.
  38. Perichon, B., P. Courvalin, and M. Galimand. 2007. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by *qepA*-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2464–2469.
  39. Racicot Bergeron, C., C. Prussing, P. Boerlin, D. Daignault, L. Dutil, R.J. Reid-Smith, G.G. Zhanel, and A.R. Manges. 2012. Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* **18**:415–421.
  40. Robicsek, A., G.A. Jacoby, and D.C. Hooper. 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect. Dis.* **6**:629–640.
  41. Sojka, W.J. 1965. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Poultry. Review Series No. 7 of the Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, England, 205–206.
  42. Soufi, L., Y. Saenz, L. Vinue, M.S. Abbassi, E. Ruiz, M. Zarazaga, A.B. Hassen, S. Hammami, and C. Torres. 2011. *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. *Int. J. Food Microbiol.* **144**:497–502.
  43. Thomson, K.S., and C.C. Sanders. 1992. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:1877–1882.
  44. Tivendale, A.K., C.M. Logue, S. Kariyawasam, D. Jordan, A. Hussein, G. Li, Y. Wannemuehler, and L.K. Nolan. 2010. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infect. Immun.* **78**:3412–3419.
  45. United States Food and Drug Administration. 2005. Enrofloxacin for poultry; final decision on withdrawal of new animal drug application following formal evidentiary public hearing (FR Doc No: 05-15224). *Fed. Regist.* **70**:44105.
  46. Veldman, K., L.M. Cavaco, D. Mevius, A. Battisti, A. Franco, N. Botteldoorn, M. Bruneau, A. Perrin-Guyomard, T. Cerny, C.D. Escobar, B. Guerra, A. Schroeter, M. Gutierrez, K. Hopkins, A.L. Myllyniemi, M. Sunde, D. Wasyl, and F.M. Aarestrup. 2011. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *J. Antimicrobiol. Chemother.* **66**:1278–1286.
  47. Yamane, K., J. Wachino, S. Suzuki, and Y. Arakawa. 2008. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 1564–1566.
  48. Zhao, L., S. Gao, H. Huan, X. Xu, X. Zhu, W. Yang, Q. Gao, and X. Liu. 2009. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. *Microbiology* **155**:1634–1644.

Address correspondence to:

Ivan Literak, DVM, PhD

Department of Biology and Wildlife Diseases

Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology

University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Palackeho tr. 1/3

612 42 Brno

Czech Republic

E-mail: literaki@vfu.cz





## Příloha 17

DOLEJSKA, M., VILLA, L., DOBIASOVA, H., FORTINI, D., FEUDI, C., CARATTOLI, A., 2013, Plasmid content of a clinically relevant *Klebsiella pneumoniae* clone from the Czech Republic, producing CTX-M-15 and QnrB1: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 57, p. 1073-1076.

### Souhrn

---

Byla stanovena primární nukleotidová sekvence plazmidů multirezistentního kmene *K. pneumoniae* ST416, který pocházel z pacientů hospitalizovaných na Klinice dětské onkologie v ČR. Kmen nesl dva velké IncFII<sub>k</sub> plazmidy, které kromě genů rezistence k různým skupinám antibiotik jako součást multirezistentní variabilní oblasti plazmidu, nesly další geny pro přídatné funkce. Jednalo se o geny pro rezistenci k těžkým kovům, vysoké teplotě, pro produkci biofilmu a virulenci. Studie poukazuje na obrovskou plasticitu IncF plazmidů klinických izolátů a jejich schopnost sdružovat se s novými faktory, které mohou hrát úlohu v adaptaci a fitness bakterie v hostiteli.



# Plasmid Content of a Clinically Relevant *Klebsiella pneumoniae* Clone from the Czech Republic Producing CTX-M-15 and QnrB1

Monika Dolejska,<sup>a,b</sup> Laura Villa,<sup>c</sup> Hana Dobiasova,<sup>a</sup> Daniela Fortini,<sup>c</sup> Claudia Feudi,<sup>c</sup> Alessandra Carattoli<sup>c</sup>

Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic<sup>a</sup>; CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic<sup>b</sup>; Department of Infectious, Parasitic and Immune-Mediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy<sup>c</sup>

**The entire plasmid content of a multidrug-resistant, CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* ST416 clone was investigated. Two FII<sub>K</sub> plasmids, pKDO1 (127 kb) and pKPN-CZ (207 kb), were identified and found to carry a formidable set of genes conferring resistance to toxic compounds, metals, and antimicrobial drugs and exhibiting novel features putatively associated with adaptation and fitness of the bacterium in the human host.**

Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* strains are opportunistic pathogens responsible for nosocomial infections primarily in intensive care units, and represent a high risk, especially for immunocompromised patients treated in these wards (1, 2). CTX-M-15 is the dominant type of cephalosporinase in *Enterobacteriaceae* in hospitalized patients as well as in the broader community (3) and is mobilized by plasmids of several incompatibility (Inc) groups, predominantly IncI1 and IncF (4, 5).

Plasmids of the IncF group represent one of the most frequent plasmid types, playing a major role in the dissemination of antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae*. They contribute to the fitness of their bacterial hosts by providing virulence and antimicrobial resistance genes and show rapid evolution (6).

Recently, an outbreak caused by ESBL-producing *Enterobacteriaceae*, mainly *K. pneumoniae*, was observed in a pediatric oncological clinic in the Czech Republic (7). Thirty-five *K. pneumoniae* strains belonging to seven sequence types (STs), carrying related CTX-M-15-positive IncFII<sub>K</sub> plasmids, were previously identified and characterized (7) (Table 1). In this study, the entire plasmid content of the most frequently isolated *K. pneumoniae* clone, ST416, was investigated to ascertain the structure and features of the CTX-M-15-carrying plasmid and to identify other plasmids contributing to the successful dissemination of this clone.

The complete DNA sequence of plasmids was obtained by applying the 454 genome sequencer FLX procedure on a library constructed from total plasmid DNA purified from an ST416 *K. pneumoniae* strain, by using an Invitrogen PureLink HiPure plasmid filter midiprep kit (Invitrogen, Milan, Italy), according to the manufacturer's procedure (Roche Diagnostics, Monza, Italy). Sixty-two contigs ranging from 33,451 to 252 bp, with at least 30-fold coverage, were obtained using GS-FLX gsAssembler software and compared to GenBank data using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). After the read status output and BLAST results were obtained, contigs were assembled by PCR-based gap closure and sequencing.

DNA sequence analysis showed the presence of two plasmids: pKDO1 (JX424423) and pKPN-CZ. pKDO1 is 127,509 bp and has high similarity to several *K. pneumoniae* plasmids, such as pKF3-94 (GenBank accession no. FJ876826), pKPHS2 (CP003224), and pKpQIL (GU595196; 52 to 61% coverage, 84 to 100% nucleotide identity) (Fig. 1). It belongs to the incompatibility group FII<sub>K</sub>, as it

carries the FII<sub>K7</sub> replicon allele (assigned by replicon sequence typing [8]). pKDO1 also carries another replicon, encoding a Rep-3 family initiator replication protein showing 99.6% amino acid identity with replication proteins of pK245 (NC\_010886) and pKF3-94, identified in *K. pneumoniae* strains from Taiwan and China, respectively. pKPN-CZ is 207,819 bp, carries replicon FII<sub>K8</sub> and an additional FIB<sub>KPN</sub> replicon specific for pKPN3-like *Klebsiella* plasmids (marked by violet boxes in Fig. 1), and is highly related (62 to 72% coverage, 81 to 100% nucleotide identity) to the IncFII<sub>K</sub> IncFIB<sub>KPN</sub> plasmids pKPN-IT (JN233704), from the KPC-producing *K. pneumoniae* ST258 clone (9), and pKPN3 (CP000648) (Fig. 1).

The plasmid pKDO1 contains a multidrug resistance region (MRR) of 39,761 bp carrying an interesting set of antibiotic resistance genes (red line in Fig. 1). The MRR is flanked on one side by IS26 followed by *qnrB1* and  $\Delta$ IS3000 and on the other by additional common resistance genes with the end defined by an integron terminal repeat (IRT) of an In4-type class 1 integron. In particular, the MRR contains the ESBL *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene in a region showing high similarity to the MRR of plasmids pEK516 (EU935738) and pC15-1a (NC\_005327), previously identified in *Escherichia coli* strains belonging to pandemic lineage ST131 (Fig. 1) (10, 11). It also carries the plasmid-mediated quinolone resistance *qnrB1* gene, for the first time associated with an IncFII<sub>K</sub> plasmid, flanked by an IS26 element on the left and  $\Delta$ IS3000 truncated by Tn5403 on the right. The same *qnrB1*-carrying element structure (99% nucleotide identity) was identified in *K. pneumoniae* plasmid pUC38-7 (EF682134). In addition, pKDO1 harbors the EcoRII restriction/antirestriction system flanked by the In4-type class 1 integron with the *dfrA14* gene cassette on the left, which showed 0 to 5 nucleotide differences from a region on some IncN plasmids and the IncF plasmid pK245 (Fig. 1), suggesting the

Received 13 September 2012 Returned for modification 30 September 2012  
Accepted 2 December 2012

Published ahead of print 10 December 2012

Address correspondence to Monika Dolejska, m.dolejska@centrum.cz.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01886-12>.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.  
doi:10.1128/AAC.01886-12

TABLE 1 Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains harboring IncFII<sub>K</sub> replicons<sup>a</sup>

MLST	Strain	Plasmid size(s) (kb) <sup>b</sup>	PCR result for <sup>c</sup> :				
			<i>repA</i>	<i>fecA</i>	<i>clpK</i>	<i>yliB</i>	<i>mrk</i>
ST416	16	200, 120	+	+	+	+	+
	3	190, 120	+	+	+	+	+
	7	200, 120	+	+	+	+	+
	9	210, 120	+	+	+	+	+
	22	200, 120	+	+	+	+	+
	55	200, 120	+	+	+	+	+
	13	220, 120	+	–	+	+	–
	23	220, 140	+	–	+	+	–
49	120		–	–	–	–	
ST323	20	180, 120, 45	+	+	+	–	–
	27	180, 120, 45	+	+	+	–	–
	25	180, 100	+	+	+	–	–
	19	280, 220, 100	+	+	+	–	–
	11	255, 220, 100	+	+	+	–	–
	5	255, 220, 100	+	+	+	–	–
	12	120, 70	–	–	–	–	–
ST627	15	235	+	+	+	–	–
	30	235	+	+	+	–	–
	33	235	+	+	+	–	–
	39	235, 100	+	+	+	–	–
	43	235	+	+	+	–	–
	44	235	+	+	+	–	–
ST321	41	205, 120	+	+	+	–	–
	8	217, 120, 70	+	+	+	–	–
	2	203, 92, 63	+	+	+	–	–
	4	203, 115, 63	+	+	+	–	–
ST626	46	160, 120	–	+	+	–	–
	52	160, 120	–	+	+	–	–
	29	150, 120	–	+	+	–	–
ST280	56	220, 120, 60	+	+	+	–	–
	18	220, 100, 55	+	+	+	–	–
	42	220, 120, 55	+	+	+	–	–
ST628	6	183, 68	+	–	+	–	–
	17	180, 120	+	–	+	–	–

<sup>a</sup> All the strains except those belonging to ST627 and strain no. 6 carry *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. *K. pneumoniae* strain 16 was selected for complete plasmid sequencing. All the strains are positive for the FII<sub>K</sub> replicon.

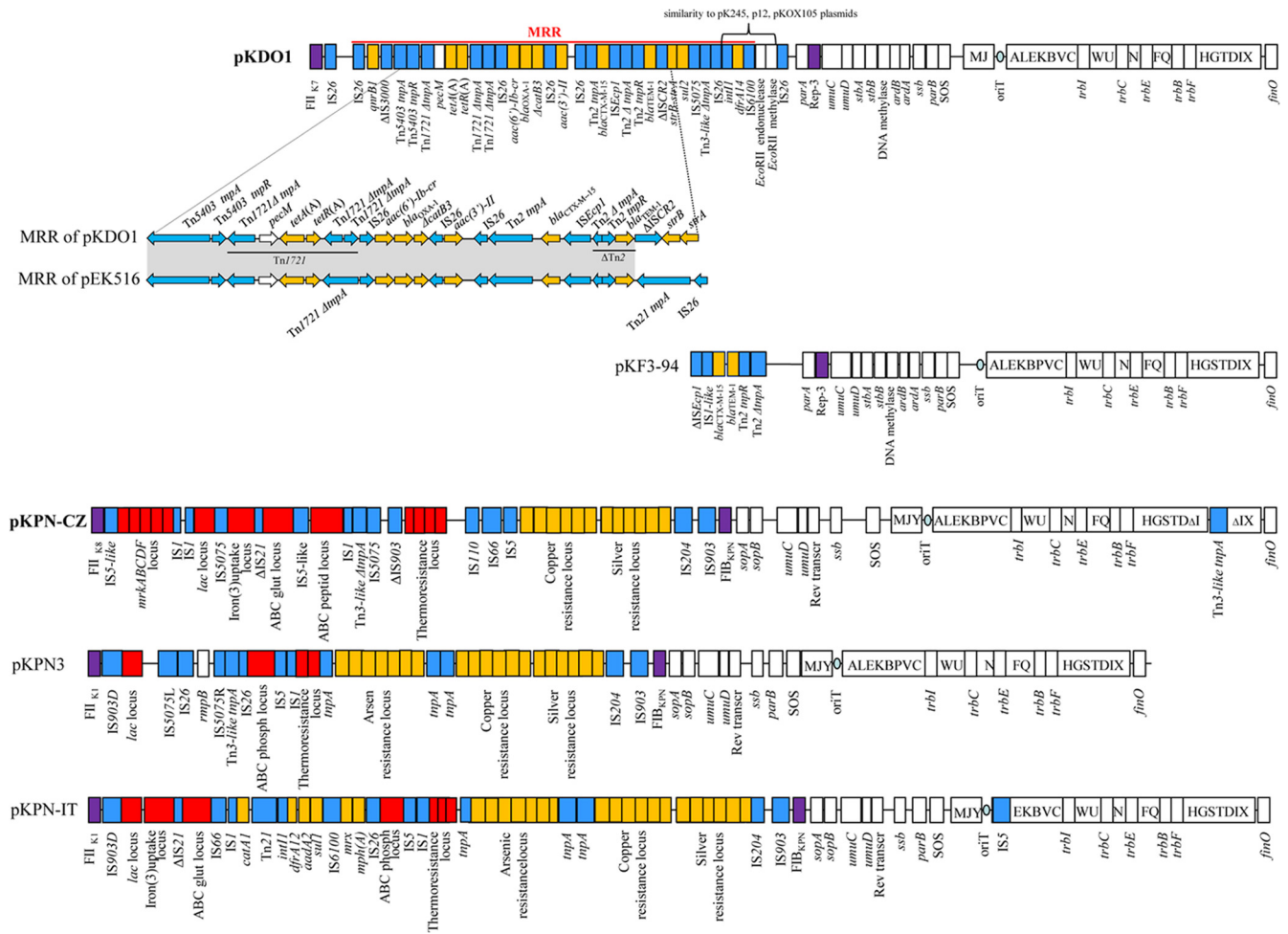
<sup>b</sup> The plasmid sizes were determined by S1 pulsed-field gel electrophoresis in a previous study (7).

<sup>c</sup> Results of PCR-based screening for putative virulence determinants found in pKPN-CZ in a collection of *K. pneumoniae* strains from pediatric oncological patients. *repA* is used for detection of the FIB<sub>KPN</sub> replicon, *fecA* for iron(III) dicitrate transport system, *clpK* for the marker of thermoresistance, *yliB* for the peptide/nickel ABC transporting system of *Pantoea* origin, and *mrk* for the junction between the type 3 fimbria cluster *mrkABCDF* and the pKPN-CZ plasmid scaffold.

exchange of the EcoRII restriction/antirestriction module among unrelated plasmids. In pKDO1, this region is flanked by two IS26 elements that were likely involved in the acquisition of this module.

Plasmid pKPN-CZ showed an increased number of putative virulence-encoding clusters compared with other similar plasmids previously identified in *K. pneumoniae* strains, such as a KPC-producing ST258 clone (Fig. 1). In particular, a peptide/nickel ABC transporting system, previously found in plasmids pPANA10 (HE617161) and PAGR\_p (CP003086) and on the chromosome (CP001875) of the human- and plant-pathogenic species *Pantoea anatis*, was identified on pKPN-CZ. The involvement of peptide transporting systems in increasing colonization

abilities and virulence of bacterial strains was described previously (12, 13). pKPN-CZ contains the *mrkABCDF* gene cluster, showing >99% nucleotide identity with the *mrk* cluster, encoding type 3 fimbria, identified in the chromosomes of *K. pneumoniae* strains HS11286 (CP003200) and MGH 78578 (CP000647) (14). The same cluster was previously identified on IncX plasmids from *E. coli*, profoundly enhancing the ability of *E. coli* to form biofilms and increasing its conjugation efficiency (15, 16). To the best of our knowledge, this is the first evidence of a type 3 fimbria cluster associated with *Klebsiella* plasmids. The thermoresistance cluster (positions 63,633 to 78,484) identified in the chromosome of the human *Cronobacter sakazakii* strain ATCC 29544 (92% coverage, 99% nucleotide identity; accession no. FR714908) was also iden-



**FIG 1** Major structural features of pKDO1 and pKPN-CZ. Plasmids sequenced in this study were compared as follows: pKDO1 was compared with pKF-94 (FJ876826); a part of the MRR of pKDO1 was compared with the similar region on pEK516 (EU935738), a plasmid identified in *E. coli* clone ST131; and pKPN-CZ was compared with pKPN-IT (JN233704) found in *K. pneumoniae* ST258 clones and with pKPN3 (CP000648). White boxes indicate plasmid scaffold regions that are in common among the plasmids. The *tra* locus is indicated by white boxes with capital letters indicating the respective *tra* genes (i.e., W represents *traW* and so on). Resistance genes are indicated by orange boxes. Transposon-related genes (*tnpA* and *tnpR*), the class 1 integrase gene, and insertion sequences are indicated by blue boxes. Other genes are indicated by colored boxes as follows: violet, replicate genes; red, the putative virulence clusters acquired by pKPN-IT, pKPN-CZ and pKPN3 including the *lac* operon, and loci corresponding to the iron(III) uptake system, phosphate/phosphonate ABC transport system (ABC phospho locus), nickel/peptide ABC transport system of *Pantoea* origin (ABC peptid locus), glutathione ABC transport system (ABC glut locus), type 3 fimbriae (*mrkABCDF*), and thermoresistance. The *lac* operon, the iron(III) uptake system, and ABC transport systems represent clusters formed by several genes but they are indicated by a unique block. Gray shading indicates >99% identity in the MRRs of pKDO1 and pEK516. Labels common to both MRRs appear only in the pKDO1 diagram, and only differences in pEK516 are labeled. The black lines show the extent of Tn1721 and  $\Delta$ Tn2 of MRR of pKDO1 and pEK516. The red line indicates the position of MRR in pKDO1. The region common to pKDO1, the IncN plasmids pKOX105 (FJ223605) and p12 (HM126016), and the IncF plasmid pK245 (DQ449578) is formed by an In4-type class 1 integron with the *dfrA14* gene cassette and EcoRII restriction/antirestriction system and is flanked by two IS26 elements. The diagrams are not to scale.

tified in pKPN-CZ. Part of this cluster, including the gene *clpK*, that was demonstrated to increase bacterial thermal tolerance was previously found in other large IncFII<sub>K</sub> *Klebsiella* plasmids (17). We assume that transport systems, thermoresistance clusters, and fimbria clusters found in pKPN-CZ may be involved in virulence properties of the strains carrying them as well as in increased survival within the hospital environment, overall contributing to the successful dissemination and maintenance of these plasmids in *K. pneumoniae* during the hospital outbreak.

A PCR assay targeting five pKPN-CZ features, including the putative virulence determinants, was designed and tested on the 35 *K. pneumoniae* strains from the oncological clinic (Table 1; also, see Table S1 in the supplemental material). The FIB<sub>KPN</sub> rep-

licon, the *clpK* gene involved in thermotolerance, and the iron(III) uptake system were largely prevalent in the strains of our collection, while the novel *Pantoea*-like peptide ABC transport system and the type 3 fimbria cluster were found only in *K. pneumoniae* ST416 clones harboring large plasmids (190 to 210 kb) (Table 1). Plasmid analysis and the PCR-based screening revealed high plasticity of the pKPN-CZ-like plasmids, likely due to plasmid rearrangements that occurred during the course of the outbreak. We propose this PCR-based approach as an efficient method for screening virulence determinants that can be identified in *K. pneumoniae* strains, presumably associated with pKPN-CZ-like plasmids, as observed in our collection.

Our study confirms that *K. pneumoniae* plasmids possess a

dynamic nature, the capacity for rapid evolution, and the ability to integrate new resistance and virulence determinants, overall increasing fitness and viability of the bacteria hosting them.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The GenBank accession numbers for the sequences determined in this study are JX424423 (for pKDO1) and JX424424 (for pKPN-CZ).

## ACKNOWLEDGMENTS

Our thanks go to Eva Brhelova and Ivana Jamborova (University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic) for excellent assistance in the laboratory. We also thank Alena Sevcikova, Jana Jurankova, and Jaroslav Sterba (The University Hospital, Brno, Czech Republic) for providing strains for analysis.

This study was funded by the travel grant “FEMS Advanced Fellowship 2011” to M.D., by grants from the Czech Science Foundation (P502/10/P083) and CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) to M.D., and by a grant from the MIUR CNR flagship PB05 “InterOmics” project to A.C.

## REFERENCES

- Ruiz E, Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Olarte I, Esteban I, Rocha-Gracia R, Zarazaga M, Torres C. 2010. Outbreak caused by a multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain of new sequence type ST341 carrying new genetic environments of *aac(6′)-Ib-cr* and *qnrS1* genes in a neonatal intensive care unit in Spain. *Int. J. Med. Microbiol.* 300:464–469.
- Sandegren L, Linkevicius M, Lytsy B, Melhus Å, Andersson DI. 2012. Transfer of an *Escherichia coli* ST131 multiresistance cassette has created a *Klebsiella pneumoniae*-specific plasmid associated with a major nosocomial outbreak. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:74–83.
- Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front. Microbiol.* 3:110.
- Carattoli A. 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:2227–2238.
- Madec JY, Poirel L, Saras E, Gourguechon A, Girlich D, Nordmann P, Haenni M. 2012. Non-ST131 *Escherichia coli* from cattle harbouring human-like *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-carrying plasmids. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:578–581.
- Johnson TJ, Nolan LK. 2009. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73:750–754.
- Dolejska M, Brhelova E, Dobiasova H, Krivdova J, Jurnakova J, Sevcikova A, Dubska L, Literak I, Cizek A, Vavrina M, Kutnikova L, Sterba J. Dissemination of IncFII<sub>K</sub>-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing *Enterobacteriaceae* isolates from children in hospital paediatric oncology wards. *Int. J. Antimicrob. Agents*, in press.
- Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. 2010. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:2518–2529.
- García-Fernández A, Villa L, Carta C, Venditti C, Giordano A, Venditti M, Mancini C, Carattoli A. 2012. *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:2143–2145.
- Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGeer A, Muller MP, Willey BM, Bryce E, Gardam M, Nordmann P, Mulvey MR. 2004. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3758–3764.
- Woodford N, Carattoli A, Karisik E, Underwood A, Ellington MJ, Livermore DM. 2009. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:4472–4482.
- Hiron A, Posteraro B, Carrière M, Remy L, Delporte C, La Sorda M, Sanguinetti M, Juillard V, Borezée-Durant E. 2010. A nickel ABC-transporter of *Staphylococcus aureus* is involved in urinary tract infection. *Mol. Microbiol.* 77:1246–1260.
- Samen U, Gottschalk B, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ. 2004. Relevance of peptide uptake systems to the physiology and virulence of *Streptococcus agalactiae*. *J. Bacteriol.* 186:1398–1408.
- Gerlach GF, Allen BL, Clegg S. 1989. Type 3 fimbriae among enterobacteria and the ability of spermidine to inhibit Mr/K hemagglutination. *Infect. Immun.* 57:219–224.
- Norman A, Hansen LH, She Q, Sørensen SJ. 2008. Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid* 60:59–74.
- Ong CL, Beatson SA, McEwan AG, Schembri MA. 2009. Conjugative plasmid transfer and adhesion dynamics in an *Escherichia coli* biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:6783–6791.
- Bojer MS, Struve C, Ingmer H, Hansen DS, Krogfelt KA. 2010. Heat resistance mediated by a new plasmid encoded Clp ATPase, ClpK, as a possible novel mechanism for nosocomial persistence of *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One* 5:e15467. doi:10.1371/journal.pone.0015467.

## Příloha 18

KLIMES, J., MACHALKOVA, M., DOLEJSKA, M., CIZEK, A., JANOSZOWSKA, D., ALEXA, P., ALBRECHTOVA, K., VOJTECH, J., LITERAK, I., 2013, *Escherichia coli*-producing extended-spectrum beta-lactamases CTX-M-15 in a captive South American tapir (*Tapirus terrestris*): Journal of Zoo and Wildlife Medicine, v. 44, p. 173-175.

### Souhrn

---

V brněnské zoo byl z uhynulého tapíra s intermandibulárním abscesem a pneumonií izolován multirezistentní patogenní kmen *E. coli* produkující beta-laktamázu CTX-M-15. Z důvodu epidemiologického šetření byly odebrány další vzorky od zvířat ze stejného výběhu a z prostředí. Z těchto vzorků byl izolován kmen identický s tím, který byl zjištěn v plicích uhynulého tapíra. Studie ukazuje na šíření kmenů s patogenním potenciálem mezi zvířaty v zoo obývajících stejné prostředí.





## ***ESCHERICHIA COLI*-PRODUCING EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASE CTX-M-15 IN A CAPTIVE SOUTH AMERICAN TAPIR (*TAPIRUS TERRESTRIS*)**

**Jiri Klimes, D.V.M., Ph.D., Marketa Machalkova, D.V.M., Monika Dolejska, M.S., Ph.D., Alois Cizek, D.V.M., Ph.D., Dagmar Janoszowska, M. S., Pavel Alexa, D.V.M., Ph.D., Katerina Albrechtova, D.V.M., Jiri Vojtech, and Ivan Literak, D.V.M., Ph.D.**

**Abstract:** Only a few reports exist on the occurrence of resistant bacteria in zoo animals. Therefore, an isolation of multiresistant *Escherichia coli* from the lungs of a captive South American tapir (*Tapirus terrestris*) led to its characterization and further investigation of samples from animals inhabiting the same paddock and from the shared environment. The tapir suffered from an intermandibular abscess and pneumonia and was euthanatized after unsuccessful therapy, including administration of antibiotics. The authors performed selective isolation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *E. coli* strains and identification of resistance genes using polymerase chain reaction. Seven multiresistant, ESBL-producing *E. coli* isolates were obtained, all belonging to the B2 phylogenetic group and showing identical profile on pulsed-field gel electrophoresis. These isolates carried several resistance genes, including the gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. This case demonstrates the transmission of related epidemiologically important *E. coli* isolates whose potential transmission to other animals and zoo staff can be assumed.

**Key words:** Antibiotic resistance, *Escherichia coli*, extended-spectrum beta-lactamase, South American tapir, *Tapirus terrestris*.

### **BRIEF COMMUNICATION**

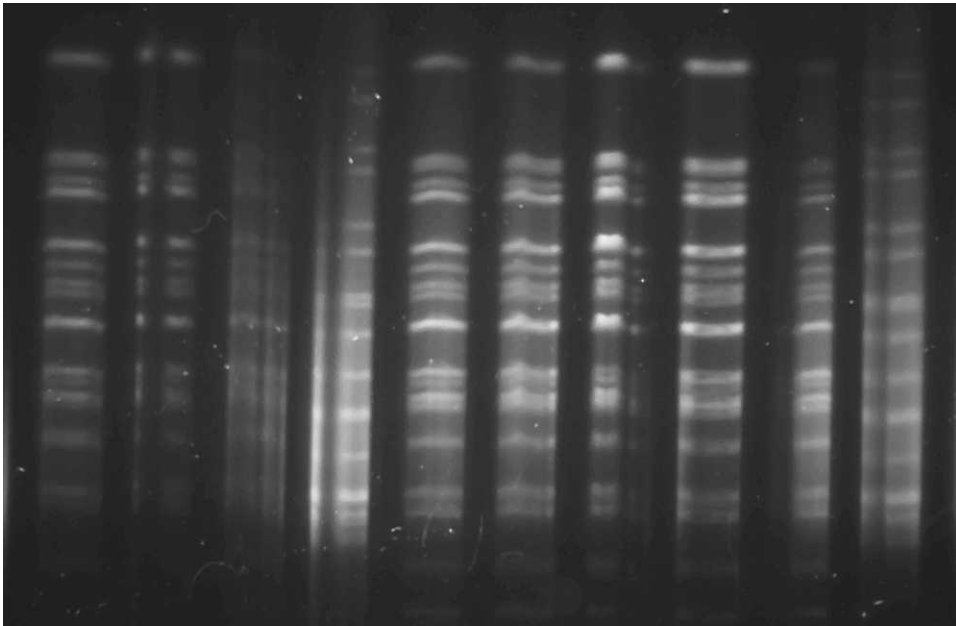
Despite the growing importance of antibiotic resistance and attention recently given to this topic, only a few reports exist on the occurrence of resistant bacteria in zoo animals.<sup>1,7</sup> In the present study, a multiresistant *Escherichia coli* isolate in a 5-yr-old male South American tapir (*Tapirus terrestris*) residing at the Brno Zoological Garden, Czech Republic, is described.

The animal suffered from diphtheroid-ulcerative stomatitis, swelling and prolapse of the tongue, and intermandibular abscess. After 3 wk of unsuccessful therapy, including administration of antibiotics (parenteral penicillin, gentamicin, enrofloxacin, and mouth rinsing with trimethoprim-sulfonamides), the animal was euthanatized

because of its deteriorating condition. Fibrinopurulent tracheobronchitis and acute purulent pneumonia were found on postmortem examination. Bacteriologic culture from the lungs yielded a multiresistant *E. coli* isolate harboring the gene encoding production of the extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) CTX-M-15. The tapir had come from the Gdansk Zoo (Poland) 4 yr earlier and was housed together with a female obtained from the Riga Zoo (Latvia) and their young, born in Brno. The three tapirs shared the paddock with three greater rheas (*Rhea americana*), a pair of capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), a pair of coscoroba swans (*Coscoroba coscoroba*), and a pair of upland geese (*Chloephaga picta*). In addition to samples from the dead tapir, the authors examined a total of 18 additional samples from other animals and their environment (mouth swabs from the female tapir and her young and pooled samples of feces from both tapirs, capybaras, rheas, and swans, respectively). Eight swabs from the housing of tapirs and capybaras, and four swabs from the shared paddock were also obtained. Selective isolation of ESBL-positive *E. coli* strains and their subsequent characterization using polymerase chain reaction for identifying selected resistance genes and phylogroup were performed as described previously.<sup>4,8</sup> The XbaI restriction profiles of chromosomal DNA extracted within agarose gel plugs were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis.<sup>3</sup> Transferability

---

From the Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1–3, 612 42 Brno, Czech Republic (Klimes, Machalkova, Dolejska, Janoszowska, Albrechtova, Vojtech, Literak); Department of Infectious Diseases and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1–3, 612 42 Brno, Czech Republic (Cizek); CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic (Dolejska, Cizek, Literak); and the Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic (Alexa). Correspondence should be directed to Dr. Klimes (klimesj@vfu.cz).



**Figure 1.** Pulsed-field profiles of the *E. coli* isolates obtained from the lungs of the tapir, other animals, and the environment. The gel plugs were embedded in 1% SEAKEM gold gel agarosis and run on Biorad a pulsed-field gel electrophoresis apparatus under the following conditions: initial time, 2.2 sec; final time, 54.2 sec; start ratio, 1; voltage, 200 V (6 V/cm); run time, 19 hr. *Salmonella* Braenderup H9812 was used as the molecular weight standard.

of antibiotic resistance genes was tested by plating conjugation experiments<sup>10</sup> and heat shock transformation of plasmid DNA to DH5 $\alpha$  competent cells. Resistance-encoding plasmids were analyzed by restriction fragment length polymorphism patterns obtained by *EcoRV* digestion and by replicon typing.<sup>2</sup> The ESBL-producing isolates were serotyped,<sup>5,11</sup> and virulence factors were determined by serologic and molecular methods,<sup>6,12</sup> including heat-stable and heat-labile enterotoxins; verotoxin; adherence factor intimin (*eaeA*); adhesins F4, F5, F6, F18, or F41; and genes for selected virulence factors associated with extraintestinal pathogenic *E. coli*.

A total of seven ESBL-producing *E. coli* isolates were obtained: one isolate from the lungs of the dead tapir, one isolate from the feces of rheas, one isolate from the feces of swans, one isolate from the tapir housing environment, and three isolates from the shared paddock. All isolates belonged to the B2 phylogenetic group and showed identical pulse profile on pulsed-field gel electrophoresis (Fig. 1). They were resistant to ampicillin, cephalothin, ciprofloxacin, nalidixic acid, and tetracycline and carried the antibiotic resistance genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *tetA*, and *aac(6')Ib-cr*, as well as the integrase gene *intI1*. Some isolates also demon-

strated resistance to amoxicillin-clavulanate, gentamicin, and ceftazidime, an exception being the lung isolate, which, on the other hand, was resistant to sulfonamides and trimethoprim-sulfamethoxazole. Serotyping was not successful, except for one isolate from the environment that belonged to the O8 serotype. No genes for the virulence factors tested except for *fimC* was detected. Conjugative transfer of plasmids carrying the genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> into recipient cells of *E. coli* and *Salmonella* was not demonstrated. The lung *E. coli* isolate differed from the other isolates by the absence of the gene *bla*<sub>OXA</sub> and by the presence of the resistance gene *aadA1* and the gene *intI2*. The genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> together with *tetA* and *aac(6')Ib-cr* on the incompatibility group F plasmid obtained from transformants of this isolate were detected. The plasmid size was 105 kb.

This current case demonstrates the epidemiologic spread of multiresistant *E. coli* strains carrying the gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Although the above-characterized isolate was probably nonpathogenic and has not been confirmed as the primary cause of the tapir's disease, potential transmission to other animals and zoo staff (animal keepers, veterinarians) could occur, as suggested by the

occurrence of related *E. coli* isolates in animals sharing the paddock with the tapir. A similar case was described on a large-scale pig farm in Denmark, where transmission of *E. coli* strains carrying IncN plasmids that mediate cephalosporin resistance was demonstrated between pigs and farm workers.<sup>9</sup> The findings of this current case suggest that the spread of resistant enteric bacteria in a captive environment is enhanced by a high density of animals in a limited space, where contact with feces is more frequent.

**Acknowledgments:** The study was funded by grant MSM6215712402 from the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic, grant P502/10/P083 of the Czech Science Foundation, and grant 64/2010/FVHE of the Internal Grant Agency, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno. This study was partly supported by the project “CEITEC—Central European Institute of Technology” (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from the European Regional Development Fund. The authors are grateful for the cooperation of Dr. Stanislav Mazanek, Ph.D., veterinarian at the Brno Zoological Garden, and for the bacteriologic examination of postmortem material by Dr. Ludmila Kohoutova.

#### LITERATURE CITED

- Ahmed, A. M., Y. Motoi, M. Sato, A. Maruyama, H. Watanabe, Y. Fukumoto, and T. Shimamoto. 2007. Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harbouring integrons and antimicrobial resistance genes. *Appl. Environ. Microb.* 73: 6686–6690.
- Carattoli, A., A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K. L. Hopkins, and E. J. Threlfall. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* 63: 219–228.
- Center for Disease Control and Prevention. 2004. Standardized molecular subtyping of foodborne bacterial pathogens by pulsed-field gel electrophoresis. CDC, Atlanta, Georgia.
- Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4555–4558.
- Clermont, O., H. Dhanji, M. Upton, T. Gibreel, A. Fox, D. Boyd, M. R. Mulvey, P. Nordmann, E. Ruppe, J. L. Sarthou, T. Frank, S. Vimont, G. Arlet, C. Branger, N. Woodford, and E. Denamur. 2009. Rapid detection of the O25-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 64: 274–277.
- DebRoy, C., E. Roberts, B. Jayarao, and J. W. Brooks. 2008. Bronchopneumonia associated with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in a horse. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20: 661–664.
- Gopee, N. V., A. A. Adesiyun, and K. Caesar. 2000. A longitudinal study of *Escherichia coli* strains isolated from captive mammals, birds, and reptiles in Trinidad. *J. Zoo Wildl. Med.* 31: 353–360.
- Literak, I., M. Dolejska, D. Janoszowska, J. Hrusakova, V. Meissner, H. Rzycka, S. Bzoma, and A. Cizek. 2010. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea coast of Poland. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 8136–8134.
- Moodley, A., and L. Guardabassi. 2009. Transmission of IncN plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 1709–1711.
- Olesen, I., H. Hasman, and F. M. Aarestrup. 2004. Prevalence of beta-lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microb. Drug Resist.* 10: 334–340.
- Salajka, E., Z. Salajkova, P. Alexa, and M. Hornich. 1992. Colonization factor different from K88, K99, F41 and 987P in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from postweaning diarrhoea in pigs. *Vet. Microbiol.* 32: 163–175.
- Sramkova Zajacova, Z., L. Konstantinova, and P. Alexa. 2012. Detection of virulence factors of *Escherichia coli* focused on prevalence of EAST1 toxin in stool of diarrheic and non-diarrheic piglets and presence of adhesion involving virulence factors in *astA* positive strains. *Vet. Microbiol.* 154: 369–375.

Received for publication 19 August 2011



## Příloha 19

ACCOGLI, M., FORTINI, D., GIUFRE, M., GRAZIANI, C., DOLEJSKA, M., CARATTOLI, A., CERQUETTI, M., 2013, IncI1 plasmids associated with the spread of CMY-2, CTX-M-1 and SHV-12 in *Escherichia coli* of animal and human origin: *Clinical Microbiology and Infection*, v. 19, p. E238-240.

### Souhrn

---

Byla provedena komparace sbírky plazmidů z izolátů *E. coli* humánního a aviárního původu nesoucích ESBL nebo AmpC původem především z Itálie. V souboru dominovaly epidemické IncI1 plazmidy. Aviární izoláty *E. coli* nesly IncI1-ST12 plazmidy s genem *bla*<sub>CMY-2</sub>. Podobné plazmidy byly dříve identifikovány u humánních izolátů salmonel v USA. Identické plazmidy sdílené humánními a aviárními kmeny *E. coli* nebyly prokázány.



## InclI plasmids associated with the spread of CMY-2, CTX-M-1 and SHV-12 in *Escherichia coli* of animal and human origin

M. Accogli<sup>1</sup>, D. Fortini<sup>1</sup>, M. Giufrè<sup>1</sup>, C. Graziani<sup>2</sup>,  
M. Dolejska<sup>3,4</sup>, A. Carattoli<sup>1</sup> and M. Cerquetti<sup>1</sup>

1) Department of Infectious, Parasitic and Immune-Mediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy, 2) Department of Veterinary Public Health and Food Safety, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy, 3) Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic and 4) CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic

### Abstract

Fourteen plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub> or *bla*<sub>CMY-2</sub> genes from *Escherichia coli* of both avian and human origin were analysed. InclI plasmids were largely predominant. Plasmid multilocus sequence typing and comparative analysis revealed that the *bla*<sub>CMY-2</sub>-ST12-InclI plasmids from avian *E. coli* were identical to those previously found in *Salmonella* from humans, but different to those associated with human *E. coli*. The InclI-ST3 plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> or *bla*<sub>SHV-12</sub> were related to those previously identified in avian *E. coli*, but different to those identified in human *E. coli*. Overall, no plasmids shared by *E. coli* of both origin (human/avian) were identified; however, further investigations are needed.

**Keywords:** Zoonosis, *Escherichia coli*, PBRT, ESBL, pMLST

**Original Submission:** 16 October 2012; **Revised Submission:** 26 November 2012; **Accepted:** 9 December 2012

Editor: R. Cantón

**Article published online:** 17 January 2013

*Clin Microbiol Infect* 2013; **19**: E238–E240

10.1111/1469-0691.12128

**Corresponding author:** Dr A. Carattoli, Department of Infectious, Parasitic and Immuno-Mediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, viale Regina Elena 299, 00161 Rome, Italy  
**E-mail:** alecara@iss.it

The presence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and/or AmpC-producing *Salmonella* and *Escherichia coli* in animals and food has been increasingly reported worldwide. In strains of animal origin, plasmids belonging to the Incompatibility group II (InclI) have been associated with genes such as *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub> and *bla*<sub>CMY-2</sub> [1–4]. Recently

in The Netherlands, Leverstein-van Hall and colleagues demonstrated that patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains [5]. Our previous investigation demonstrated that *E. coli* carrying ESBL and/or AmpC genes were genetically diverse between human and avian sources, but the potential horizontal transfer of ESBL determinants through plasmids was not investigated, and was the objective of this study [6].

A collection of 378 *E. coli* strains (277 extraintestinal pathogenic *E. coli* -ExPEC- strains and 101 strains from healthy avian species), previously characterized by phylogenetic typing, multilocus sequence typing (MLST) and for presence of the ESBL genes [6], was further analysed for the detection of the *bla*<sub>CMY-2</sub> gene, and for plasmid content and localization of ESBL and AmpC genes [4]. For plasmid comparison, six previously characterized InclI-carrying strains were also included: two carried the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene, three harboured the *bla*<sub>CMY-2</sub> gene and one the *bla*<sub>SHV-12</sub> gene. One strain was isolated in Italy [7], three *bla*<sub>CMY-2</sub>-positive *Salmonella* spp. strains were isolated in the USA [3] (kindly provided by Dr Jason Folster, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA), and two *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-positive *E. coli* were from France and Poland, respectively [8,9]. Plasmid content was analysed by the PCR-based replicon typing (PBRT) method [10]. InclI plasmids were further typed by plasmid multilocus sequence typing (pMLST), as previously described [7]. Selected prototypic plasmids were further characterized by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using *Pst*I restriction (New England Bio-Labs, Inc., Ipswich, MA, USA) [7]. InclI plasmids were transferred by transformation (MAX Efficiency DH5 $\alpha$ ; Invitrogen, Milan, Italy) and transformants were screened by PBRT and for the *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CMY</sub> genes [6,7,10].

A total of 14 *E. coli* strains (six human isolates and eight avian isolates) possessing ESBL or AmpC genes were identified: five strains carried the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene, five *bla*<sub>CMY-2</sub>, one harboured both *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *bla*<sub>CMY-2</sub>, one *bla*<sub>CTX-M-2</sub> and *bla*<sub>CMY-2</sub>, and two strains carried the *bla*<sub>SHV-12</sub> gene (Table 1). By PBRT, all 14 *bla*<sub>CTX-M-1</sub><sup>+</sup>, *bla*<sub>SHV-12</sub><sup>+</sup> and/or *bla*<sub>CMY-2</sub>-positive strains contained multiple replicons (Table 1). IncF and InclI plasmids were the most frequent plasmid types identified in *E. coli* strains of both origins and were further analysed. Transformation experiments were carried out on the 10 InclI-IncF-positive strains, demonstrating that InclI plasmids were associated with the *bla*<sub>CTX-M-1</sub><sup>+</sup>, *bla*<sub>SHV-12</sub><sup>+</sup> and/or *bla*<sub>CMY-2</sub><sup>+</sup> genes in nine of 10 human and avian strains. (Table 1).

By pMLST, the nine InclI plasmids were classified into seven different sequence types (STs, Table 1): two on four *bla*<sub>CMY-2</sub>-carrying plasmids were assigned to ST12, the remaining two



**TABLE 1.** Characteristics of ESBL or AmpC-carrying plasmids in *E. coli* ( $n = 17$ ) and *Salmonella* ( $n = 3$ ) analysed in this study

Strain	Origin	Country	Year	Plasmid characterization							Reference		
				ESBL or AmpC gene	PBRT in donors	PBRT in transformants	pMLST <sup>a</sup> IncI1-plasmid						
							<i>repI1</i>	<i>ardA</i>	<i>trbA</i>	<i>sogS</i>		<i>pilL</i>	ST
<i>E. coli</i> OC144	Human	Italy	2009	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	II, FIA, FIB, F, XI	II	1	2	16	9	1	97	This study
<i>E. coli</i> 5c	Poultry	Italy	2009	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	II, HI2, FIB, F	II	1	3	3	6	2	11	This study
<i>E. coli</i> 50c	Poultry	Italy	2009	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	II, F	II	2	1	4	1	2	3	This study
<i>E. coli</i> OC146	Human	Italy	2009	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	FIB, F	ND						ND	This study
<i>E. coli</i> BE305	Human	Italy	2009	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	FIA, FIB, F	ND						ND	This study
<sup>b</sup> <i>E. coli</i> 37c	Poultry	Italy	2009	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	II, N, FIB, F, K	K						–	This study
<i>E. coli</i> 41c	Poultry	Italy	2009	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	HI2, FIB, F, K, XI	ND						ND	This study
<i>E. coli</i> 65c	Poultry	Italy	2009	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	II, FIB, F	II	1	4	3	4	1	12	This study
<i>E. coli</i> 90c	Poultry	Italy	2009	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	II, FIB, F, XI	II	1	4	3	4	1	12	This study
<i>E. coli</i> BE310	Human	Italy	2009	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	II, FIB, F	II	2	4	15	11	2	85	This study
<i>E. coli</i> 44c	Poultry	Italy	2009	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	II, HI2, FIB, F	II	1	4	2	4	2	86	This study
<i>E. coli</i> PA263	Human	Italy	2009	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	FIB, F, K	ND						ND	This study
<i>E. coli</i> OC169	Human	Italy	2009	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	II, FIB, F	II	1	4	13	2	1	26	This study
<i>E. coli</i> 31c	Poultry	Italy	2009	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	II, FIB, F	II	2	1	4	1	2	3	This study
<i>S. heidelberg</i> AM31196	Human	USA	2007	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	ND	II	1	4	3	4	1	12	3
<i>S. saintpaul</i> AM31875	Human	USA	2007	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	ND	II	1	4	3	4	1	12	3
<i>S. typhimurium</i> AM33047	Human	USA	2007	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	ND	II	1	4	3	4	1	12	3
<i>E. coli</i> 22T	Poultry	France	2005	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	II	II	2	1	4	1	2	3	8
<i>E. coli</i> 2392T	Poultry	Italy	2005	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	II	II	2	1	4	1	2	3	7
<i>E. coli</i> 96	Poultry	Poland	2009	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	II	II	2	1	4	1	2	3	9

ND, not determined.

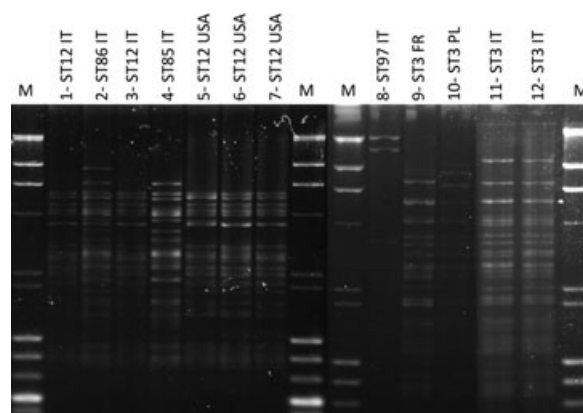
<sup>a</sup>Plasmid multilocus sequence typing (pMLST). Allele variants for each sequenced gene (*repI1*, *ardA*, *trbA*, *sogS* and *pilL*) were identified and numbered. Different sequence types (STs) were assigned to the different combinations of allele variants observed among the IncI1 plasmids.

<sup>b</sup>The *bla*<sub>CMY-2</sub> was transferred on the IncK plasmid in this strain.

plasmids showed novel sequence types (ST85 and ST86). The three positively transferred *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-carrying plasmids were assigned to ST3, ST11 and ST97, respectively. The two *bla*<sub>SHV-12</sub>-carrying plasmids were assigned to ST3 and ST26, respectively (Table 1).

The four *bla*<sub>CMY-2</sub>-IncI1 plasmids (two ST12 and one ST86 from poultry, and one ST85 of human origin) were compared with three *bla*<sub>CMY-2</sub>-IncI1/ST12 plasmids previously identified in *S. enterica* serovars Saintpaul, Typhimurium and Heidelberg in the USA from human sources (strains AM31196, AM31875 and AM33047), by PstI-RFLP analysis [3]. Plasmids belonging to the same ST12 exhibited an indistinguishable profile, irrespective of both isolate species and source, while plasmids belonging to ST85 and ST86 showed different restriction profiles, as expected (Fig. 1). IncI1/ST3 and IncI1/ST97 plasmids carrying *bla*<sub>SHV-12</sub> and/or *bla*<sub>CTX-M-1</sub> from different sources and origins were also compared. Two *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-IncI1/ST3 plasmids, both from an avian source but of different geographical origin, showed related but not identical profiles. Notably, two IncI1/ST3 plasmids carrying SHV-12, identified from poultry in Italy in 2005 [7] and 2009 (this study), showed identical restriction profiles (Fig. 1). A different profile was exhibited by the *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-ST97 IncI1 plasmid.

Overall, ESBL-positive plasmids from our collection of *E. coli* appeared different according to the human or avian source, because they did not share any ST or RFLP types, even when they carried the same ESBL or CMY-2 determinant and belonged to the same Inc group.



**FIG. 1.** Restriction analysis by PstI of the IncI1 plasmid DNAs isolated from *E. coli* and *Salmonella* transformants. Lane M, markers (Roche Diagnostics); lane 1, *E. coli* 90c (*bla*<sub>CMY-2</sub>); lane 2, *E. coli* 44c (*bla*<sub>CMY-2</sub>); lane 3, *E. coli* 65c (*bla*<sub>CMY-2</sub>); lane 4, *E. coli* BE310 (*bla*<sub>CMY-2</sub>); lane 5, *S. heidelberg* AM31196 (*bla*<sub>CMY-2</sub>); lane 6, *S. saintpaul* AM31875 (*bla*<sub>CMY-2</sub>); lane 7, *S. typhimurium* AM33047 (*bla*<sub>CMY-2</sub>); lane 8, *E. coli* OC144 (*bla*<sub>CTX-M-1</sub>); lane 9, *E. coli* 22T (*bla*<sub>CTX-M-1</sub>); lane 10, *E. coli* 96 (*bla*<sub>CTX-M-1</sub>); lane 11, *E. coli* 31c (*bla*<sub>SHV-12</sub>); lane 12, *E. coli* 2392T (*bla*<sub>SHV-12</sub>). pMLST type and the geographical origin of the strain are reported above each line.

IncI1/ST3 plasmids have been found to be associated with the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene among *E. coli* strains of avian and human origin in the Netherlands [5]. In this study, related *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-IncI1/ST3 plasmids were detected among avian strains isolated



in different countries, including Italy, but not among ExPEC strains.

InclI/ST3 plasmids harbouring *bla*<sub>SHV-12</sub> were previously identified in *E. coli* isolates from poultry in Italy and from humans in the Netherlands [5,7]. Our results showed persistence of an identical *bla*<sub>SHV-12</sub>-InclI/ST3 plasmid over 5 years across avian isolates from Italy, but SHV-12 was found to be carried by a different plasmid in ExPEC, indicating that the epidemiology of SHV-12 on InclI in avian and human *E. coli* may differ from that described in the Netherlands, although this needs to be confirmed in additional isolates and plasmids.

Finally, InclI/ST12 plasmids carrying *bla*<sub>CMY-2</sub> were detected worldwide in *E. coli* and *Salmonella*, suggesting that the InclI/ST12 plasmids identified in our study might be highly related to other globally diffused epidemic plasmids (<http://pubmlst.org/plasmid/>). This was clearly confirmed by RFLPs analysis that showed indistinguishable InclI/ST12 plasmids obtained from both *Salmonella* of human origin from the USA and *E. coli* of an avian source from Italy, suggesting that this plasmid type can be successfully exchanged between commensal *E. coli* and *Salmonella* in poultry. However, despite the intense worldwide spread of the InclI/ST12-CMY-2 plasmid, it was not identified in our ExPEC collection.

A limitation of this study is the low number of plasmids analysed. Such a low number makes any conclusion regarding absence of genetic relatedness among plasmids a suggestion that needs further confirmation.

In conclusion, our results suggest that, although globally diffused epidemic plasmids were identified in *E. coli* from an avian source from Italy, there was no evidence of common plasmids shared by both human and poultry ESBL and AmpC *E. coli* producers in our collection. Whether a different plasmid epidemiology actually occurs in Italy compared with other European countries needs to be confirmed by further studies.

## Acknowledgments

We are grateful to Tonino Sofia for editorial assistance and to Dr Jason P. Folster and Dr Jean Whichard, Division of Foodborne, Bacterial and Mycotic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA, for providing control strains.

## Funding

This work was financed by Italy-USA cooperation project – Italian Ministry of Health Grant DRE 29/12/2010-0001090 (AC) and by Ministry of Health-Centro Controllo Malattie project ‘Surveillance on antibiotic resistance in the community and in food-borne and zoonotic diseases’ (Grant number 9M06).

## Transparency Declaration

The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Carattoli A. Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 (suppl 1): 117–123.
2. Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2227–2238.
3. Folster JP, Pecic G, McCullough A, Rickert R, Whichard JM. Characterization of *bla*<sub>CMY</sub>-encoding plasmids among *Salmonella* isolated in the United States in 2007. *Foodborne Pathog Dis* 2011; 8: 1289–1294.
4. Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Smith H, Mevius D. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet Microbiol* 2010; 145: 273–278.
5. Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen SJ *et al.* Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 873–880.
6. Giufre M, Graziani C, Accogli M *et al.* *Escherichia coli* of human and avian origin: detection of clonal groups associated with fluoroquinolone and multidrug resistance in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 860–867.
7. García-Fernández A, Chiaretto G, Bertini A *et al.* Multilocus sequence typing of InclI plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 1229–1233.
8. Girlich D, Poirel L, Carattoli A *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 4681–4685.
9. Literak I, Dolejska M, Janoszowska D *et al.* Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and *QnrS*, in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 8126–8134.
10. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; 63: 219–228.



## Příloha 20

DOBIASOVA, H., DOLEJSKA, M., JAMBOROVA, I., BRHELOVA, E., BLAZKOVA, L., PAPOUSEK, I., KOZLOVA, M., KLIMES, J., CIZEK, A., LITERAK, I., 2013, Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic: FEMS Microbiology Ecology, v. 85, p. 604-611.

### Souhrn

---

V zoologické zahradě v Ostravě bylo sledováno rozšíření *E. coli* s ESBL a plazmidově determinovanou rezistencí k fluorochinolonům u různých druhů savců a ptáků. Izoláty náležely k 18 sekvenčním typům a nesly geny *bla*<sub>CTX-M-1</sub> nebo *qnrS1* na epidemických plazmidech různých imkompatibilních skupin (Inc1, IncN, IncX1). Komparativní analýza genotypových charakteristik ukázala na šíření specifických klonů *E. coli* a plazmidových linií u různých skupin zvířat v rámci zoo.



# Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic

Hana Dobiasova<sup>1,2</sup>, Monika Dolejska<sup>1,2</sup>, Ivana Jamborova<sup>1</sup>, Eva Brhelova<sup>1</sup>, Lucie Blazkova<sup>1</sup>, Ivo Papousek<sup>1</sup>, Marketa Kozlova<sup>1</sup>, Jiri Klimes<sup>1</sup>, Alois Cizek<sup>2,3</sup> & Ivan Literak<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic; <sup>2</sup>CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic; and

<sup>3</sup>Department of Infectious Diseases and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic

**Correspondence:** Hana Dobiasova, Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1–3, CZ-612 42 Brno, Czech Republic. Tel.: +420 541 562647; fax: +420 541 562631; e-mail: dobiasova.hanka@gmail.com

**Present address:** Eva Brhelova, CEITEC MU, Masaryk University, Kamenice 753/5, CZ-625 00, Brno, Czech Republic

Received 25 January 2013; revised 24 March 2013; accepted 12 May 2013.  
Final version published online 19 June 2013.

DOI: 10.1111/1574-6941.12149

Editor: Kornelia Smalla

## Keywords

captive animals; CTX-M-1; *Escherichia coli*; multilocus sequence typing; *qnrS*; plasmids.

## Abstract

Commensal *Escherichia coli* isolates from healthy zoo animals kept in Ostrava Zoological Garden, Czech Republic, were investigated to evaluate the dissemination of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes. A total of 160 faecal samples of various animal species were inoculated onto MacConkey agar with cefotaxime (2 mg L<sup>-1</sup>) or ciprofloxacin (0.05 mg L<sup>-1</sup>) to obtain ESBL- or PMQR-positive *E. coli* isolates. Clonality of *E. coli* isolates was investigated by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. Plasmids carrying ESBL or PMQR genes were typed by PCR-based replicon typing, plasmid multilocus sequence typing and restriction fragment length polymorphism. Forty-nine (71%, *n* = 69) cefotaxime-resistant and 15 (16%, *n* = 94) ciprofloxacin-resistant *E. coli* isolates harboured ESBL or PMQR genes. Isolates were assigned to 18 sequence types (ST) and 20 clusters according to their macrorestriction patterns by pulsed-field gel electrophoresis. The genes *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnrS1* were detected on highly related IncI1 plasmids assigned to clonal complex 3 (ST3, ST38) and on non-related IncN plasmids of ST1 and ST3, respectively. The gene *qnrS1* was located on related IncX1 plasmids. Dissemination of antibiotic resistance is associated with spreading of particular *E. coli* clones and plasmids of specific incompatibility groups among various animal species.

## Introduction

Emergence and dissemination of multidrug-resistant (MDR) gram-negative bacteria is a significant health problem worldwide. The impact of antibiotic resistance is associated with a considerable decrease in the number of efficient antimicrobials available for the treatment of various bacterial infections (Livermore *et al.*, 2007; Strahilevitz *et al.*, 2009; Platell *et al.*, 2011). Cephalosporins and fluoroquinolones belong to critically important antimicrobials in human and veterinary medicine (FAO/WHO/OIE, 2007). The predominant mechanism of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics is mediated by extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) or

AmpC-type  $\beta$ -lactamases (Bergenholtz *et al.*, 2009). Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes confer only a low degree of resistance but their expression can enable development of strains highly resistant to fluoroquinolones (Strahilevitz *et al.*, 2009). The co-localization of ESBL and PMQR genes on the same mobile genetic elements and their association with other resistance genes is of particular concern (Literak *et al.*, 2010; Dolejska *et al.*, 2011a, b).

A number of studies have been focused on MDR *Escherichia coli* derived from humans, wild, domesticated or food animals and from the environment (Literak *et al.*, 2010; Dolejska *et al.*, 2011a, b; Platell *et al.*, 2011).

Captive animals in zoological gardens can serve as a reservoir of antibiotic-resistant pathogenic bacteria such as *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., and pathogenic *E. coli* strains (Gopee *et al.*, 2000; Stirling *et al.*, 2008a). A high frequency of resistance including ESBL production and the presence of PMQR genes was found in *E. coli* isolated from zoo animals in Japan and China (Ahmed *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012).

In this study we performed the detailed genotypic characterization of ESBL- and PMQR-positive *E. coli* isolates from animals kept in a zoo in the Czech Republic over a period of 1 year to assess the potential role of captive animals as a reservoir of emerging MDR bacteria and plasmids carrying antibiotic resistance genes.

## Materials and methods

### Ostrava Zoological Garden and antibiotic practice

Ostrava Zoological Garden, Czech Republic, houses about 3300 animals of 430 different species including 76 mammalian, 126 avian and 33 reptilian species. It occupies a wooded 1-km<sup>2</sup> site in a suburb of the industrial city of Ostrava in the northeastern part of the Czech Republic. The zoo is visited by about 330 000 people per year.

Antibiotics were administered only on an individual basis under the guidance of the veterinary surgeon for a limited period of < 1–2 weeks in the case of suspected or documented bacterial infections, treatment of bite wounds or as surgical prophylaxis. In the year 2010, when our study was conducted, and during the preceding year, antimicrobials were therapeutically administered to only seven mammalian and two bird species. Antimicrobials used included cefovecin (3rd generation cephalosporin), cefprozil (2nd generation cephalosporin), cefadroxil (1st generation cephalosporin), amoxicillin–clavulanic acid, penicillin, streptomycin, enrofloxacin, marbofloxacin, tetracycline, oxytetracycline, doxycycline and neomycin.

The zoo feeds chickens to 19 animal species including eight mammalian and 11 bird species. All newly-hatched chickens were treated prophylactically with doxycycline for 5 days upon delivery and kept alive in the zoo until being used as feed within 1 month. A limited number of rabbits were also kept in the zoo and fed to zoo animals. The rabbits were treated with trimethoprim–sulphonamide irregularly in cases of digestive disorders. Carnivores were also fed meat from slaughtered food animals not suitable for human consumption. The meat might have contained antibiotic-resistant bacteria and antibiotic residues from recent antibiotic treatments.

### Sampling

During the year 2010, Ostrava Zoological Garden was visited four times to obtain faecal specimens of defined individuals of various animal species kept in four distinct geographic areas of the zoo. Within each of four samplings, different animal species occupying a particular geographic area were sampled on one-time basis.

A total number of 160 faecal samples using sterile cotton swabs were obtained from 132 mammalian, avian and reptilian species. From the total of 160 faecal samples, 127 faecal samples were obtained from enclosures that were occupied by a single animal, 21 faecal samples were taken from enclosures occupied by two or more individuals of the same species and 12 faecal samples were taken from enclosures occupied by defined groups of animals belonging to two or more genera. The samples were placed into Amies transport medium (Oxoid, UK) and transported in an isothermal box to a laboratory for further processing. Samples were incubated in buffered peptone water (Oxoid) at 37 °C overnight.

### Selective isolation of *E. coli* and antimicrobial susceptibility testing

All samples were enriched in MacConkey (MC) broth (Oxoid) at 37 °C for 24 h and subsequently cultured on MC agar (Oxoid) supplemented with cefotaxime (2 mg L<sup>-1</sup>) or ciprofloxacin (0.05 mg L<sup>-1</sup>) at 37 °C overnight. One lactose-positive colony grown on MC agar with antibiotics was selected per one sample and identified using the API 10S test kit (bioMérieux, France) and MALDI-TOF (MALDI Biotyper, Bruker Daltonics). Cefotaxime-resistant *E. coli* isolates were tested using the double-disk synergy test to identify ESBL-production (CLSI, 2008). *Escherichia coli* isolates selected on media with ciprofloxacin were tested for MIC of nalidixic acid and ciprofloxacin using the agar dilution method (CLSI, 2008). Both cefotaxime- and ciprofloxacin-resistant *E. coli* isolates were tested for susceptibility to 12 antimicrobial agents as described previously by Dolejska *et al.* (2011a) according to CLSI guidelines (CLSI, 2008).

### Testing of antibiotic resistance genes, integrons and replicons

Genes responsible for ESBL phenotype (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub>) were identified by PCR and sequencing (Literak *et al.*, 2010). The colonies grown on MCA with ciprofloxacin were tested for PMQR genes [*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6′)-Ib-cr*, *qepA* and *oqxAB*] by PCR and sequencing (Kim *et al.*, 2009; Literak *et al.*, 2010). All isolates were screened for additional

antibiotic resistance genes and integrons as described previously (Literak *et al.*, 2010). Investigated resistance genes and integrons, primers, conditions of PCR and positive control strains used in the study are listed in Table S1 (available as Supporting Information on the FEMS Microbiology Ecology website). Replicons were tested using PCR-based replicon typing (Carattoli *et al.*, 2005).

### ***Escherichia coli* molecular typing methods**

All *E. coli* isolates were divided into phylogenetic groups (Clermont *et al.*, 2000). Isolates belonging to phylogenetic groups B2 and D were tested by allele-specific rapid PCR to determine O25b-ST131 *E. coli* clone (Clermont *et al.*, 2009). Epidemiological relatedness of *E. coli* isolates was analysed by XbaI-pulsed field gel electrophoresis (PFGE) (PulseNetUSA, 2004). All macrorestriction profiles were compared using the BIONUMERICS fingerprinting software (Applied Maths, Belgium) dividing the isolates into epidemiologically related clusters (I–XV for cefotaxime- and 1–5 for ciprofloxacin-resistant *E. coli* isolates, respectively) because of a Dice similarity index  $\geq 85\%$ . The clusters I and V of cefotaxime-resistant isolates and the clusters 1 and 5 of ciprofloxacin-resistant isolates were divided into subgroups on the basis of intraclonal diversity of these clusters (Ia–d, Va–c of cefotaxime- and 1a–b, 5a–b of ciprofloxacin-resistant isolates). Multilocus sequence typing (MLST) was performed according to Wirth *et al.* (2006).

### **Plasmid characterization**

Transferability of plasmids carrying ESBL or PMQR genes was achieved using conjugation and transformation experiments as described elsewhere (Dolejska *et al.*, 2011b). Genomic DNA of transconjugants and transformants was isolated using the boiling technique described by Cattoir *et al.* (2007). Transconjugants and transformants with one plasmid were typed by PCR-based replicon typing (Carattoli *et al.*, 2005), tested for the presence of additional antibiotic resistance genes using PCR (Table S1) and plasmid size was determined using S1-PFGE (Barton *et al.*, 1995). Plasmids were isolated using the alkaline extraction method (Birnboim & Doly, 1979) and compared using restriction fragment length polymorphism performed by EcoRV digestion of plasmid DNA from transformants or transconjugants, dividing them into separate groups based on their restriction patterns. Plasmids showing an identical profile or one band difference were designated with the same letter (e.g. 'A') and those with two to three band differences were designated with a letter and a number of the particular type (e.g. 'A1'). Plasmids belonging to incompatibility

groups II and N were typed by plasmid multilocus sequence typing (pMLST) (Garcia-Fernandez *et al.*, 2008, 2011) and assigned to sequence types (ST) using the on-line database <http://pubmlst.org/plasmid/>. Detection of insertion sequences *ISEcp1* and *IS26* located upstream of *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *ISEcl2* upstream of the gene *qnrS1* was carried out by PCR mapping (Table S1). Investigation of the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> upstream region was conducted as previously described (Dolejska *et al.*, 2011b). The upstream region of *qnrS1* was investigated using forward primer *ISEcl2* binding to *orfB* of the insertion sequence (Poirel *et al.*, 2007) in combination with *qnrS* reverse primer (Cattoir *et al.*, 2007) targeting a region of c. 1.5 kb.

## **Results**

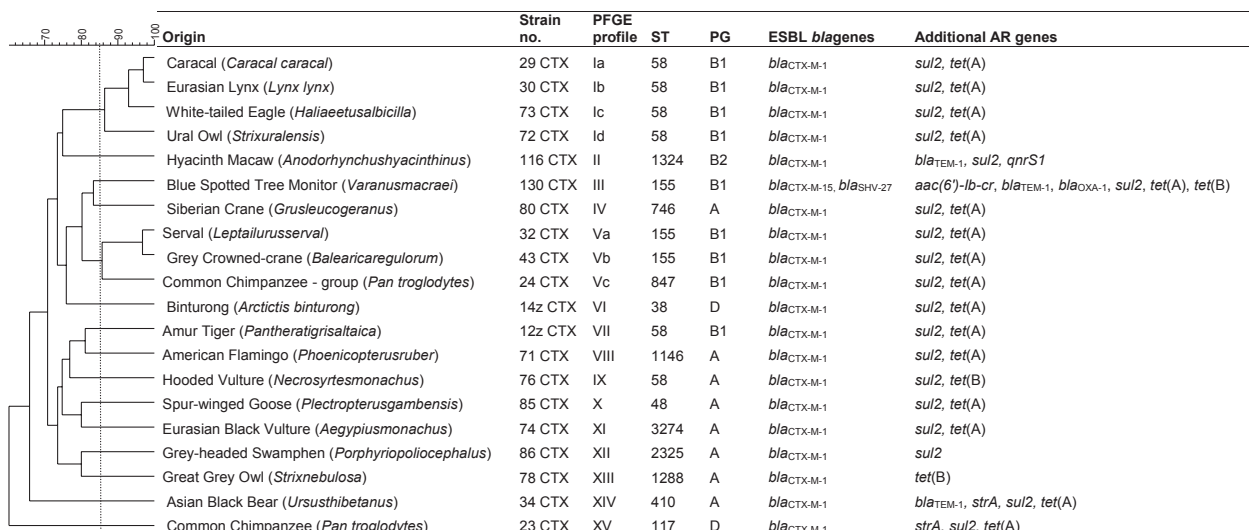
### **Isolation of ESBL- and PMQR-positive *E. coli* isolates and their antibiotic resistance phenotypes**

From the 160 faecal samples of various animal species, 69 (43%) cefotaxime- and 94 (59%) ciprofloxacin-resistant *E. coli* isolates were found. Forty-nine (71%) cefotaxime-resistant and 15 (16%) ciprofloxacin-resistant *E. coli* isolates harboured ESBL or PMQR genes, respectively. All the ESBL-producing *E. coli* isolates were multiresistant (resistant to two or more antibiotic groups). ESBL-positive isolates showed resistance to tetracycline (98%) sulphonamides (96%), nalidixic acid (18%), streptomycin (16%), trimethoprim–sulphamethoxazole and gentamicin (both 4%). Of the PMQR-positive *E. coli* isolates, 12 isolates (80%) were multiresistant. PMQR-positive *E. coli* isolates showed resistance to ampicillin (73%), tetracycline (53%), sulphonamides and trimethoprim–sulphamethoxazole (both 47%), streptomycin (20%), cephalotin and amoxicillin–clavulanic acid (both 13%) and gentamicin (7%). Among the PMQR-positive *E. coli* isolates, MIC of nalidixic acid and ciprofloxacin varied from 8 to > 256 mg L<sup>-1</sup> and from 0.06 to > 8 mg L<sup>-1</sup>, respectively.

### **Resistance genes and integrons detected in ESBL- and PMQR-positive *E. coli* isolates**

In the 49 ESBL-producing *E. coli* isolates, the gene *bla*<sub>CTX-M-1</sub> was detected in 48 isolates, and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and *bla*<sub>SHV-27</sub> in one isolate (130 CTX, Fig. 1). One CTX-M-1-producing isolate (116 CTX) also harboured PMQR gene *qnrS1*. In all PMQR-positive *E. coli* isolates, the gene *qnrS1* was detected (Table 1). The additional antibiotic resistance genes were detected in the ESBL/PMQR-positive isolates (Fig. 1, Table 1): *tet(A)*, *tet(B)* encoding resistance to tetracycline, *sul1*, *sul2* encoding resistance to





**Fig. 1.** Characteristics of ESBL-positive *Escherichia coli* isolates from animals in the zoo. AR, antibiotic resistance; PG, phylogenetic group; ST, sequence type. Dendrogram represents diversity of *E. coli* isolates carrying ESBL genes. *Escherichia coli* isolates were divided into clusters (I–XV) according to Dice similarity index of their XbaI macrorestriction profiles  $\geq 85\%$ . *Escherichia coli* isolates assigned to the clusters I and V were divided into subgroups (Ia–d, Va–c) owing to intraclonal diversity in these clusters.

**Table 1.** Characteristic of PMQR-positive *Escherichia coli* isolates from animals in the zoo

Origin	Strain no.	MIC (mg L <sup>-1</sup> )*	PFGE profile†	ST	PG	PMQR genes	Additional AR genes and integrons
King Vulture ( <i>Sarcoramphus papa</i> )	143 CIP	> 256/0.25	1a	155	B1	<i>qnrS1</i>	–
Amur Tiger ( <i>Panthera tigris</i> )	13z CIP	> 256/> 8	1b	3275	B1	<i>qnrS1</i>	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>tet</i> (A), <i>Int1</i> ‡
Cottontop Tamarin - group ( <i>Saguinus oedipus</i> )	3 CIP	> 256/> 8	2	1249	B1	<i>qnrS1</i>	<i>tet</i> (A)
Serval ( <i>Leptailurus serval</i> )	32 CIP	8/1	3	1434	A	<i>qnrS1</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-32</sub> , <i>strA</i> , <i>tet</i> (A)
American Flamingo ( <i>Phoenicopterus ruber</i> )	71 CIP	128/0.25	4	10	A	<i>qnrS1</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (A)
Southern Screamer ( <i>Chauna torquata</i> )	101 CIP	16/0.125	5a	1431	B1	<i>qnrS1</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (A)
Indian Crested Porcupine ( <i>Hystrix indica</i> )	103 CIP	8/0.5	5b	1431	B1	<i>qnrS1</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>sul1</i> , <i>tet</i> (A)

AR, antibiotic resistance; PG, phylogenetic group; ST, sequence type.

\*Minimal inhibitory concentration of NAL, nalidixic acid and CIP, ciprofloxacin to donor strains.

†*Escherichia coli* isolates were divided into clusters (1–5) consisting of clonally related isolates according to Dice similarity index of their XbaI macrorestriction profiles  $\geq 85\%$ . *Escherichia coli* isolates assigned to the clusters 1 and 5 were divided into subgroups (1a–b, 5a–b) owing to intraclonal diversity in these clusters.

‡Class 1 integron 1.5 kb: *dfrA1-aadA1*.

sulphonamides, and *strA* encoding resistance to streptomycin. The presence of class 1 integron was detected only in one isolate (13z CIP, Table 1).

### Molecular typing of *E. coli* isolates

Forty-nine ESBL-producing *E. coli* isolates were divided into phylogenetic groups A (19 isolates), B1 (18), B2 (1) and D (11). Fifteen PMQR-harbouring *E. coli* isolates belonged to phylogenetic groups A (6) and B1 (9). None of the isolates assigned to phylogenetic groups B2 and D belonged to the O25b-ST131 type.

All *E. coli* were typed using XbaI-PFGE. Sixteen ESBL-producing and four PMQR-positive isolates were

non-typeable using this method. Cluster analysis of macrorestriction patterns was performed on 33 ESBL-producing *E. coli* isolates and 11 PMQR-harbouring *E. coli* isolates. For MLST analysis, one to four representative ESBL- and PMQR-positive *E. coli* isolates of each cluster were chosen at random.

ESBL-producing isolates were grouped into 15 clusters (I–XV). Seventy per cent of them belonged to one of five clusters of clonally related isolates. Four of these clusters (I, V, VIII, X) consisted of three to eight isolates that were clonally related. Isolates belonging to the same cluster of clonally related isolates were obtained from different animal species. Ten *E. coli* isolates had unique macrorestriction profiles. Twenty representative ESBL-



positive *E. coli* isolates of each cluster were assigned to 13 different STs (Fig. 1).

Eleven PMQR-harboring *E. coli* isolates were grouped into five clusters (1–5). In all, 82% of PMQR-positive *E. coli* belonged to one of three clusters of clonally related isolates. Two of these clusters (clusters 2 and 5) consisted of three and four isolates originating from different animal species, respectively. Two PMQR-positive isolates had unique macrorestriction profiles. Seven representative PMQR-positive *E. coli* isolates of each cluster were assigned to six distinct STs (Table 1).

### Characterization of plasmids carrying ESBL or PMQR genes

From a total of 33 CTX-M-producing and 11 PMQR-positive isolates, conjugation to *E. coli* or *Salmonella enterica* was demonstrated in 31 and 7, respectively. Only two CTX-M-carrying and none of the PMQR-harboring plasmids were transferred through transformation. All transformants carried multiple plasmids and these plasmids were therefore not investigated further. For plasmid analysis, one to four transconjugants carrying a single plasmid with ESBL and/or PMQR gene were chosen per one cluster. A total of 14 *bla*<sub>CTX-M-1</sub>- and 4 *qnrS1*-carrying plasmids were characterized (Table 2).

Plasmids carrying ESBL or PMQR genes belonging to three incompatibility (Inc) groups IncI1, IncN and IncX1 were identified. The genes *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnrS1* were located on IncI1 plasmids varying in size from 100 to 140 kb identified in 13 transconjugants. Plasmids showed related restriction profile (A1–A4) and belonged to clonal complex 3 (CC-3) except for IncI1 plasmid from the isolate 73 CTX, which could not be typed using pMLST. IncN plasmids of ST1 and ST3 carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> or *qnrS1* genes were found in three transconjugants. Two *qnrS1*-harboring IncX1 plasmids showed identical restriction profiles. *ISEc12* was located upstream of *qnrS1* at the identical distance on all IncX1, IncI1 and IncN plasmids carrying this gene, whereas the gene *bla*<sub>CTX-M-1</sub> was found downstream of the continuous or truncated *ISEc11* element (Table 2).

### Discussion

Pepperell et al. (2002), Lavigne et al. (2007) and Cavaco et al. (2008) proposed that commensal microflora could represent a long-term reservoir of resistance genes that could be transferred horizontally to other bacteria. In this study, we describe the high prevalence of resistance to third generation cephalosporins and fluoroquinolones in commensal *E. coli* isolates from healthy captive animals in a zoo in the Czech Republic. ESBL-producing and

**Table 2.** Characteristic of ESBL- and PMQR-positive plasmids from *Escherichia coli* isolates

<i>E. coli</i> isolates			ESBL-/PMQR-positive plasmids						
Strain no.	PFGE profile	ST	Inc group	Size (kb)	RFLP profile*	ST/CC	ESBL-/PMQR-genes	Additional AR genes	Upstream region of <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> / <i>qnrS1</i>
73 CTX	Ic	58	I1	100	A1	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	<i>ISEc11</i>
72 CTX	Id	58	I1	100	A1	38/CC-3	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	<i>ISEc11</i>
71 CTX	VIII	1146	I1	105	A1	3/CC-3	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	<i>ISEc11</i>
85 CTX	X	48	I1	105	A1	3/CC-3	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	<i>ISEc11</i>
80 CTX	IV	746	I1	100	A2	3/CC-3	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	<i>ISEc11</i>
76 CTX	IX	58	I1	100	A2	3/CC-3	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<i>sul2</i>	<i>ISEc11</i>
86 CTX	XII	2325	I1	105	A2	3/CC-3	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<i>sul2</i>	<i>ISEc11</i>
29 CTX	Ia	58	I1	100	A3	3/CC-3	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	<i>ISEc11</i>
30 CTX	Ib	58	I1	100	A3	3/CC-3	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	<i>ISEc11</i>
116 CTX	II	1324	I1	100	A3	3/CC-3	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<i>sul2</i> , <i>qnrS1</i>	<i>ISEc11</i>
12z CTX	VII	58	I1	140	A3	3/CC-3	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	<i>ISEc11</i>
74 CTX	XI	3274	I1	100	A3	3/CC-3	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	<i>ISEc11</i>
71 CIP	4	10	I1	125	A4	38/CC-3	<i>qnrS1</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	<i>ISEc12</i>
78 CTX	XIII	1288	N	40	a	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	–	<i>ISEc11</i> :: <i>IS26</i>
34 CTX	XIV	410	N	40	a	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	<i>ISEc11</i> :: <i>IS26</i>
32 CIP	3	1434	N	50	b	3	<i>qnrS1</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-32</sub> , <i>strA</i> , <i>tet(A)</i>	<i>ISEc12</i>
101 CIP	5a	1431	X1	50	–	–	<i>qnrS1</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	<i>ISEc12</i>
13z CIP	1b	3275	X1	50	–	–	<i>qnrS1</i>	–	<i>ISEc12</i>

AR, antibiotic resistance; CC, clonal complex; Inc, incompatibility group; NT, non-typeable; ST, sequence type.

All plasmids were successfully transferred via conjugation to *E. coli* MT102RN and *Salmonella* Typhimurium SL5325 or *Salmonella* Enteritidis Fa8065 recipient strains.

\*RFLP profile determined by EcoRV digestion.

PMQR-harboring isolates were found in 31% ( $n = 160$ ) and 9% of sampled animals belonging to different avian, mammalian and reptilian species, respectively. Similar results were obtained by Wang *et al.* (2012), who found 32% ( $n = 206$ ) ESBL-producing *E. coli* isolates including strains carrying various PMQR genes in primates kept in six zoos in China.

The high occurrence of ESBL-producing and PMQR-harboring isolates found in our study could be associated with antibiotic therapy used in animals for treatment of various infections. Beta-lactam antibiotics including the second and the third generation cephalosporins, fluoroquinolones, tetracyclines and aminoglycosides were applied, however, only to limited number of animals. Selection of ESBL-producing *E. coli* in the gut microflora of animals induced by cephalosporin treatment has been demonstrated (Cavaco *et al.*, 2008). Most isolates showed resistance to multiple antibiotics including tetracyclines, sulphonamides, aminoglycosides and quinolones; therefore, the drugs of other antibiotic groups might have played a role in co-selection of ESBL- and PMQR-positive *E. coli* clones or plasmids carrying particular resistance genes.

Several studies have concentrated on the possible transmission of zoonotic ESBL-producing *E. coli* through the food chain (Livermore *et al.*, 2007; Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Platell *et al.*, 2011). In the zoological garden, 19 sampled animals were fed chickens and rabbits treated with antibiotics. These chickens and rabbits are a plausible source of ESBL-producing and PMQR-harboring *E. coli* isolates found in the zoo animals. *Escherichia coli* clones belonging to particular sequence types (ST10, ST58, ST117) harbouring *bla*<sub>CTX-M-1</sub> or *qnrS1* isolated from different avian and mammalian species kept in the Czech zoo have been identified previously in poultry, poultry meat and humans in the Netherlands (Leverstein-van Hall *et al.*, 2011), supporting our theory of zoonotic transmission of antibiotic-resistant *E. coli* clones via the food chain. However, samples of food (chickens, rabbits or other food sources) and water sources of zoo animals or faecal samples of possible vectors (e.g. zoo-keepers) were not analysed in our study.

Identical or closely related IncI1 plasmids of clonal complex 3 were the most prevalent among *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-harbouring *E. coli* isolates of different clonal lineages originating from several animal species fed chickens and rabbits. IncI1 plasmids belonging to ST3 carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> are widely disseminated in *E. coli* and *S. enterica* isolates from poultry throughout Europe (Garcia-Fernandez *et al.*, 2008; Cloeckert *et al.*, 2010; Leverstein-van Hall *et al.*, 2011) but they have been also found in other food-producing and companion animals as well as humans (Madec *et al.*, 2011). Results of plasmid analysis might

indicate that CTX-M-1-positive *E. coli* harbouring IncI1 plasmids isolated from zoo animals could originate in poultry.

Plasmids of incompatibility group IncN harbouring ESBL or PMQR genes identified in our study have been previously demonstrated in *E. coli* and *S. enterica* isolates from humans, animals and the environment in various European countries (<http://pubmlst.org/plasmid>, Dolejska *et al.*, 2013). IncN plasmids belonging to ST1 harbouring *bla*<sub>CTX-M-1</sub> are broadly disseminated in *E. coli* isolates from poultry, pigs, horses, cattle, wild waterbirds and humans (<http://pubmlst.org/plasmid>, Dolejska *et al.*, 2013). Plasmids of IncX1 group carrying *qnrS1* genes have been identified in *E. coli* from poultry (Cerquetti *et al.*, 2009), wild waterbirds (Literak *et al.*, 2010), horses (Dolejska *et al.*, 2011a) and humans (Literak *et al.*, 2011).

The abundance of MDR *E. coli* isolates in respective faecal samples of zoo animals was not determined in our study. ESBL- or PMQR-positive *E. coli* might have constituted either the predominant population of *E. coli* in the intestine of particular zoo animals or might have been transient flora. Duval-Iflah *et al.* (1981) showed that indigenous flora that was adapted to host intestine was the dominant population and exerted a barrier against the establishment of externally introduced *E. coli* strains. However, even the transient presence of MDR *E. coli* harbouring conjugative ESBL- or PMQR-carrying plasmids might be of particular concern. Licht *et al.* (1999) showed that conjugation in the intestine of a streptomycin-treated mouse model occurred initially at high rates after introduction of high numbers of the *E. coli* donor cells. Thereafter the rate of horizontal transfer of plasmids dropped but transconjugants remained present in the faeces of investigated mice at rather high levels.

In our study, we showed that zoo animals can represent a reservoir of resistance genes to critically important antimicrobials. Dissemination of these resistance genes is of particular concern. Multiresistance can be transmitted via direct contact between animals and humans, as has been shown by Moodley & Guardabassi (2009) and Dolejska *et al.* (2011a). Moreover, there has been a rise in the popularity of petting farm areas of zoos with direct contact between animals and visitors, especially children (Stirling *et al.*, 2008b).

In conclusion, our study showed a high prevalence of *E. coli* harbouring ESBL or PMQR genes among various animal species in the Czech zoological garden. The extensive distribution of MDR *E. coli* is associated with successful spread of particular clones as well as horizontal gene transfer of related plasmids. Results of molecular analyses might indicate a common source of MDR

*E. coli* possibly spreading via the food chain. However, further investigation is warranted to assess the potential impact of transmission of MDR *E. coli* via the food chain in dissemination of antimicrobial resistance in zoo animals.

## Acknowledgements

The authors are grateful to the zoo director Petr Colas, the head of zoological department II Ivo Firla, and the zoo veterinarian Petr Gajdosik for their co-operation. We thank George Jacoby (Lahey Clinic Inc., Burlington, MA), Lina Cavaco, Henrik Hasman (National Food Institute, Copenhagen, Denmark), Ming-Gui Wang (Institute of Antibiotics, Huashan Hospital, Shanghai, China), Surbhi Malhotra-Kumar (University of Antwerp, Antwerp, Belgium) and Alessandra Carattoli (Istituto Superior di Sanita, Rome, Italy) for positive control strains. We thank Eva Suchanova and Martina Masarikova for their excellent laboratory work. This study drew on the pMLST website (<http://pubmlst.org/plasmid/>) developed by Keith Jolley and sited at the University of Oxford, UK. This study was funded by the project 'CEITEC – Central European Institute of Technology' (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from the European Regional Development Fund and Grant no. P502/10/P083 of the Czech Science Foundation.

## References

- Ahmed AM, Motoi Y, Sato M, Maruyama M, Watanabe H, Fukumoto Y & Shimamoto T (2007) Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6686–6690.
- Barton BM, Harding GP & Zuccarelli AJ (1995) A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* **226**: 235–240.
- Bergenholtz RD, Jorgensen MS, Hansen LH, Jensen LB & Hasman H (2009) Characterization of genetic determinants of extended-spectrum cephalosporinases (ESCs) in *Escherichia coli* isolates from Danish and imported poultry meat. *J Antimicrob Chemother* **64**: 207–209.
- Birnboim HC & Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513–1523.
- Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL & Threlfall EJ (2005) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* **63**: 219–228.
- Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ & Nordmann P (2007) Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother* **60**: 394–397.
- Cavaco LM, Abatih E, Aarestrup FM & Guardabassi L (2008) Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 3612–3616.
- Cerquetti M, Garcia-Fernandez A, Giufre M, Fortini D, Accogli M, Graziani C, Luzzi I, Caprioli A & Carattoli A (2009) First report of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* in an *Escherichia coli* strain of animal origin in Italy. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 3112–3114.
- Clermont O, Bonacorsi S & Bingen E (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4555–4558.
- Clermont O, Dhanji H, Upton M et al. (2009) Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *J Antimicrob Chemother* **64**: 274–277.
- Cloekcaert A, Praud K, Lefevre M, Doublet B, Pardos M, Granier SA, Brisabois A & Weill FX (2010) Inc11 plasmid carrying extended-spectrum-beta-lactamase gene *bla*(CTX-M-1) in *Salmonella enterica* isolates from poultry and humans in France, 2003 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 4484–4486.
- CLSI (2008) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement M100-S18*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Dolejska M, Duskova E, Rybarikova J et al. (2011a) Plasmids carrying *bla*(CTX-M-1) and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *J Antimicrob Chemother* **66**: 757–764.
- Dolejska M, Frolkova P, Florek M, Jamborova I, Purgertova M, Kutilova I, Cizek A, Guenther S & Literak I (2011b) CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *J Antimicrob Chemother* **66**: 2784–2790.
- Dolejska M, Villa L, Hasman H, Hansen L & Carattoli A (2013) Characterization of IncN plasmids carrying *bla*(CTX-M-1) and *qnr* genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans. *J Antimicrob Chemother* **68**: 333–339.
- Duval-Iflah Y, Raibaud P & Rousseau M (1981) Antagonisms among isogenic strains of *Escherichia coli* in the digestive tracts of gnotobiotic mice. *Infect Immun* **34**: 957–969.
- FAO/WHO/OIE (2007) *Report of the Joint FAO/WHO/OIE Expert Meeting on Critically Important Antimicrobials*. FAO, Rome.
- Garcia-Fernandez A, Chiarretto G, Bertini A, Villa L, Fortini D, Ricci A & Carattoli A (2008) Multilocus sequence typing of Inc11 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother* **61**: 1229–1233.

- Garcia-Fernandez A, Villa L, Moodley A, Hasman H, Miriagou V, Guardabassi L & Carattoli A (2011) Multilocus sequence typing of IncN plasmids. *J Antimicrob Chemother* **66**: 1987–1991.
- Gopee NV, Adesiyun AA & Caesar K (2000) A longitudinal study of *Escherichia coli* strains isolated from captive mammals, birds, and reptiles in Trinidad. *J Zoo Wildl Med* **31**: 353–360.
- Kim HB, Wang MH, Park CH, Kim EC, Jacoby GA & Hooper DC (2009) *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 3582–3584.
- Lavigne JP, Defez C, Bouziges N, Mahamat A & Sotto A (2007) Clinical and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Citrobacter* spp. infections in a French university hospital. *Eur J Clin Microbiol* **26**: 439–441.
- Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Stuart JC *et al.* (2011) Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect* **17**: 873–880.
- Licht TR, Christensen BB, Krogfelt KA & Molin S (1999) Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: the role of community structure and environment. *Microbiology* **145**: 2615–2622.
- Literak I, Dolejska M, Janoszowska D, Hrusakova J, Meissner W, Rzycka H, Bzoma S & Cizek A (2010) Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea coast of Poland. *Appl Environ Microbiol* **76**: 8126–8134.
- Literak I, Petro R, Dolejska M, Gruberova E, Dobiasova H, Petr J & Cizek A (2011) Antimicrobial resistance in faecal *Escherichia coli* isolates from healthy urban children of two age groups in relation to their antibiotic therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 3005–3007.
- Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M *et al.* (2007) CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* **59**: 165–174.
- Madec JY, Doublet B, Ponsin C, Cloeckaert A & Haenni M (2011) Extended-spectrum beta-lactamase *bla*(CTX-M-1) gene carried on an IncI1 plasmid in multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in cattle in France. *J Antimicrob Chemother* **66**: 942–944.
- Moodley A & Guardabassi L (2009) Transmission of IncN plasmids carrying *bla*(CTX-M-1) between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 1709–1711.
- Pepperell C, Kus JV, Gardam MA, Humar A & Burrows LL (2002) Low-virulence *Citrobacter* species encode resistance to multiple antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3555–3560.
- Platell JL, Johnson JR, Cobbold RN & Trott DJ (2011) Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. *Vet Microbiol* **153**: 99–108.
- Poirel L, Cattoir V, Soares A, Soussy CJ & Nordmann P (2007) Novel Ambler class A beta-lactamase LAP-1 and its association with the plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrS1. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 631–637.
- PulseNetUSA (2004) One-day (24–28 h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). *PulseNet PFGE manual 5.1–5.3*: 1–13.
- Stirling J, Griffith M, Blair I *et al.* (2008a) Prevalence of gastrointestinal bacterial pathogens in a population of zoo animals. *Zoonoses Public Health* **55**: 166–172.
- Stirling J, Griffith M, Dooley JSG *et al.* (2008b) Zoonoses associated with petting farms and open zoos. *Vector-Borne Zoonotic Dis* **8**: 85–92.
- Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC & Robicsek A (2009) Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* **22**: 664–689.
- Wang Y, He T, Han J, Wang J, Foley SL, Yang GY, Wan SX, Shen JZ & Wu CM (2012) Prevalence of ESBLs and PMQR genes in fecal *Escherichia coli* isolated from the non-human primates in six zoos in China. *Vet Microbiol* **159**: 53–59.
- Wirth T, Falush D, Lan RT *et al.* (2006) Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* **60**: 1136–1151.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Table S1.** List of primers for antibiotic resistance genes and mobile genetic elements used in the study.

## Příloha 21

VILLA, L., CAPONE, A., FORTINI, D., DOLEJSKA, M., RODRÍGUEZ, I., TAGLIETTI, F., DE PAOLIS, P., PETROSILLO, N., CARATTOLI, A., 2013, Reversion to susceptibility of a carbapenem resistant clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 68, p. 2482-2486.

### Souhrn

---

V této studii byla stanovena primární nukleotidová sekvence plazmidů nesených dvěma rezistentními izoláty *K. pneumoniae* ST258 získané z jednoho pacienta. Jeden izolát pocházel z infikované rány a vykazoval rezistenci ke karbapenemům v důsledku produkce KPC-3. Druhý izolát byl získán z krve téhož pacienta po léčbě tigecyklinem a narozdíl od prvního izolátu byl citlivý ke karbapenemům. U citlivého izolátu byl zjištěn plazmid příbuzný s IncF plazmidem rezistentního izolátu. V důsledku přeskupení genů a fúze s malým ColE plazmidem však plazmid citlivého izolátu ztratil gen pro karbapenemázu. Studie ukazuje na vysokou plasticitu plazmidů *K. pneumoniae* nesoucích karbapenemázy.





## Reversion to susceptibility of a carbapenem-resistant clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3

Laura Villa<sup>1†</sup>, Alessandro Capone<sup>2†</sup>, Daniela Fortini<sup>1</sup>, Monika Dolejska<sup>1,3</sup>, Irene Rodríguez<sup>1</sup>, Fabrizio Taglietti<sup>2</sup>, Paolo De Paolis<sup>4</sup>, Nicola Petrosillo<sup>2</sup> and Alessandra Carattoli<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy; <sup>2</sup>National Institute of Infectious Diseases ‘Lazzaro Spallanzani’, Rome, Italy; <sup>3</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic; <sup>4</sup>San Camillo-Forlanini Hospital, Rome, Italy

\*Corresponding author. Tel: +39-06-4990-3128; Fax: +39-06-4938-7112; E-mail: alecara@iss.it  
†L. V. and A. C. equally contributed to the work.

Received 1 March 2013; returned 3 May 2013; revised 15 May 2013; accepted 21 May 2013

**Objectives:** We report the case of a kidney-transplant patient, suffering an intra-abdominal abscess at the surgical site caused by a carbapenem-resistant ST258 *Klebsiella pneumoniae* clone, producing the KPC-3 carbapenemase. Under tigecycline treatment, the patient developed a sepsis caused by a carbapenem-susceptible ST258 *K. pneumoniae* strain. Complete DNA sequences of the plasmids carried by the resistant and susceptible strains from this patient were determined.

**Methods:** The complete DNA sequences of plasmids were obtained by applying the 454 Genome Sequencer FLX-PLUS procedure on a library constructed of total plasmid DNA purified from the carbapenem-resistant and -susceptible strains.

**Results:** In the carbapenem-resistant strain, four plasmids encoding 24 resistance genes, including *bla*<sub>KPC-3</sub>, and two putative virulence clusters were detected. In the susceptible strain, large rearrangements occurred in the KPC-carrying plasmid, causing the deletion of the entire Tn4401::*bla*<sub>KPC-3</sub> transposon, with the consequent reversion of the strain to carbapenem susceptibility. The patient was successfully treated with carbapenems and fully recovered.

**Conclusions:** The description of the plasmid content in these two strains gives interesting insights into the plasticity of KPC-carrying plasmids in *K. pneumoniae*.

**Keywords:** transplant, plasmids, sequence type 258

### Introduction

Solid organ transplant patients are at risk of infections caused by multidrug-resistant bacteria. In recent years, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* emerged as one of the most relevant pathogens causing healthcare-associated infections that in the immediate post-operative period have resulted in poor clinical outcomes after transplantation.<sup>1</sup> The mortality rate and the limited antimicrobial options for treatment adversely affect transplanted patient outcomes.<sup>2,3</sup> The *K. pneumoniae* clone designated by multilocus sequence typing (MLST) as sequence type 258 (ST258), producing the KPC carbapenemase, has caused epidemics of national and international proportions, with particularly high prevalence in Israel, Greece, Italy and the USA.<sup>4–6</sup> The genome of this clone has been recently determined, identifying 50 proteins that were unique to ST258, 30 of them located on various

plasmids.<sup>7</sup> In a previous work, we characterized the plasmid content of a *K. pneumoniae* ST258 strain isolated in Italy, identifying four plasmids that were also described in other ST258 strains: pKpQIL-IT, carrying the *bla*<sub>KPC-3</sub> gene in the Tn4401 transposon; pKPN-IT, conferring arsenic, copper, silver, trimethoprim, streptomycin, chloramphenicol and macrolide resistance; IncXST258; and the ColEST258 plasmid, conferring gentamicin resistance.<sup>8–12</sup>

Here we describe the clinical course and successful outcome of a patient who underwent kidney transplantation, followed by an intra-abdominal abscess caused by a KPC-3-producing *K. pneumoniae* ST258 strain. Under tigecycline therapy, this strain developed reduced susceptibility to tigecycline, but also reverted the carbapenem resistance. This change in the antimicrobial susceptibility profile of the infectious strain allowed the successful recovery of the patient with a combined carbapenem and colistin treatment and was due to major rearrangements of the KPC-3-carrying plasmid.

## Methods

### Bacterial typing

The identification and susceptibility of the *K. pneumoniae* strains were determined by the Vitek 2 system (AST-N089 cards, bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), except for colistin, fosfomycin and tigecycline susceptibilities, which were determined by disc diffusion assays and Etests (AB Biodisk, Solna, Sweden and bioMérieux SA, Chemin de l'Orme, France, respectively), following EUCAST guidelines.<sup>13</sup>

*K. pneumoniae* strains were assigned to sequence types by MLST, carried out as previously described.<sup>14</sup>

PCR amplification of the *bla*<sub>KPC</sub> gene and sequencing of the amplicon was performed using previously described primers and conditions.<sup>15</sup>

### Plasmid sequencing

The complete DNA sequences of plasmids were obtained by applying the 454 Genome Sequencer FLX-PLUS procedure (<http://454.com/applications/whole-genome-sequencing/>) on a library constructed of total plasmid DNA purified from the LS6 carbapenem-resistant and SC29 carbapenem-susceptible *K. pneumoniae* strains by using the Invitrogen PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen, Milan, Italy), according to the manufacturer's procedure.

### De novo assembly of DNA reads and gap closure

Seventy-three and 109 contigs, ranging from 77869 to 73 bp, with ~25-fold coverage were obtained from strains LS6 and SC29, respectively, using the GS-FLX gsAssembler software. Contigs were firstly assembled *in silico* by the 454 ReadStatus output file, generated by the gsAssembler software, identifying reads overlapping adjacent contigs. Contig assembly and predicted gaps were confirmed by PCR-based gap closure, by Sanger DNA sequencing of the amplicons (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### Annotation

Gene prediction was performed by the Artemis version 8 software (Sanger Institute). Pairwise alignments were performed by BLASTN and BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### Nucleotide accession numbers

Plasmids from the LS6 and SC29 strains were submitted to the EMBL GenBank and assigned to the following accession numbers: ColE-LS6, JX442973; pKPN3-LS6, JX442974; pKpQIL-LS6, JX442975; A/C-LS6, JX442976; and pKpQIL-SC29, JX442977.

### Ethics

The patient gave informed consent to publication after complete and comprehensive reading of the manuscript.

## Results and discussion

### Case report

In February 2011, a Caucasian patient, HIV negative, underwent kidney transplantation for end-stage kidney disease due to diabetic and hypertensive nephropathy. A ureteric stent was inserted during the surgical procedure and left in place. Six weeks after transplantation, the patient was readmitted to the hospital because of a subcutaneous abscess at the surgical wound site and a deep abscess close to the transplanted kidney and to the pancreas.

Percutaneous CT scan-guided abdominal abscess drainage was performed and a *K. pneumoniae* strain (identified as strain LS6) was isolated from the infected site. The LS6 strain was assigned to ST258 by MLST, showed resistance to carbapenems by the presence of the *bla*<sub>KPC-3</sub> gene (imipenem MIC >32 mg/L; meropenem MIC >32 mg/L) and was fully susceptible to fosfomycin (MIC=16 mg/L), while the tigecycline MIC was at the upper limit of susceptibility (MIC=2 mg/L). Intravenous tigecycline (100 mg initial loading dose, then 50 mg twice daily) plus fosfomycin (2 g once daily) were administered to treat the severe intra-abdominal infection, considering the optimal tigecycline pharmacokinetic and pharmacodynamic profile in combination with fosfomycin in abdominal tissues. After 20 days of this treatment, the patient experienced a new febrile episode. A carbapenem-susceptible *K. pneumoniae* strain (identified as strain SC29) was isolated from blood and showed resistance to tigecycline (MIC=4 mg/L), while carbapenems and colistin were in the susceptible range (imipenem MIC=0.38 mg/L; meropenem MIC=0.75 mg/L). The SC29 strain was assigned to ST258 by MLST and was negative for the *bla*<sub>KPC-3</sub> gene. The ureteric stent was removed and tigecycline plus fosfomycin treatment was halted. Meropenem (1000 mg, in prolonged 4 h intravenous infusion, thrice daily) plus colistin (240 mg twice daily after a loading dose of 720 mg) treatment was continued for 18 days. The patient remained afebrile and the abdominal and subcutaneous abscesses disappeared. The patient fully recovered and was finally discharged 43 days after admission.

### Plasmids and resistance genes in the LS6 carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strain

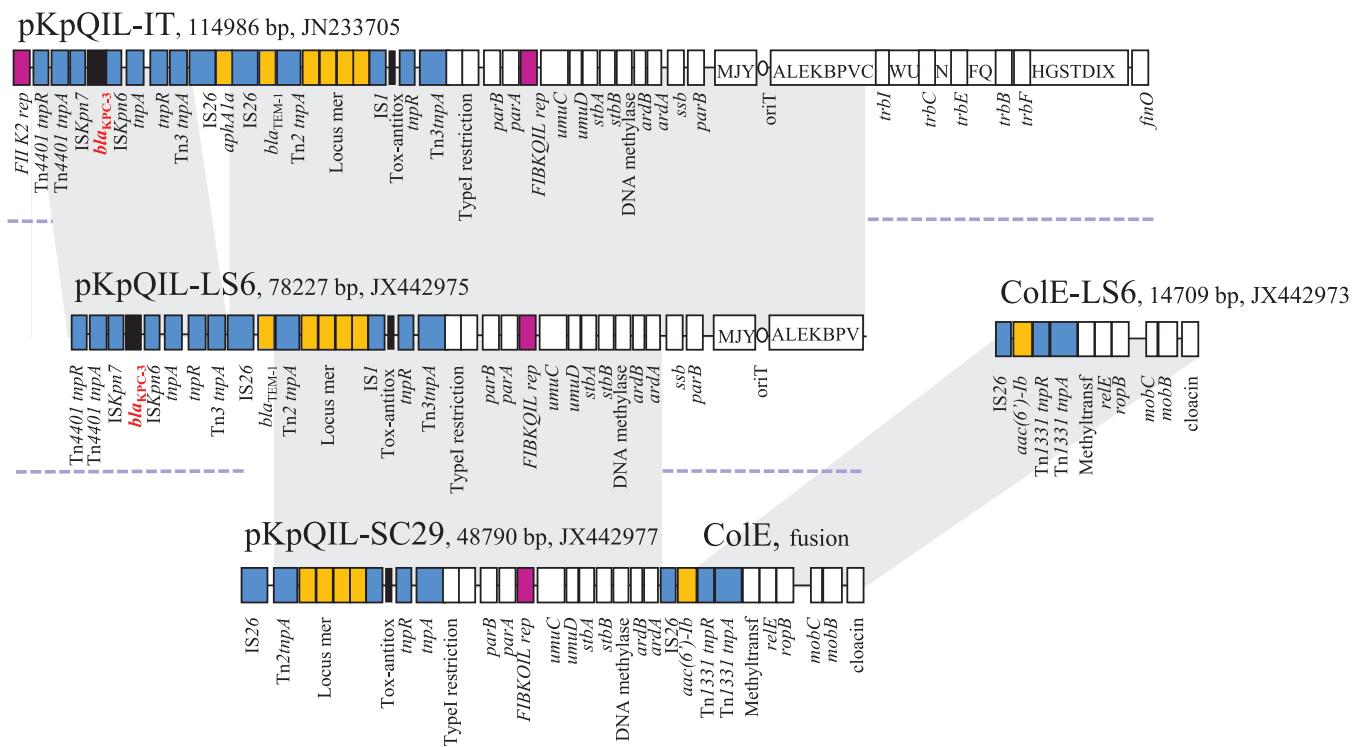
The entire plasmid content of the carbapenem-resistant strain was determined. The LS6 strain contained four plasmids with a total of ~500 kb of plasmid DNA, encoding 24 resistance genes and two putative virulence clusters.

The 78227 bp pKpQIL-LS6 plasmid (JX442975) carried the *bla*<sub>KPC-3</sub> gene in the Tn4401 transposon, conferring carbapenem resistance, and the *mer* operon, conferring resistance to mercuric ions (Figure 1). It was highly related to plasmid pKpQIL-IT (JN233705), but showed a deletion of the FIIK2 replicon, part of the *tra* locus and the *aphA1a* gene.<sup>8–10</sup>

The pKPN-LS6 plasmid (245869 bp; JX442974), related to pKPN-IT (JN233704), conferred resistance to arsenic, copper, silver, chloramphenicol, macrolides, trimethoprim and streptomycin by the *ars*, copper and silver loci and *catA1*, *mph(A)*, *dfrA12* and *aadA2* genes, respectively.<sup>8</sup> pKPN-LS6 also encoded the Fec iron(III) dicitrate transport system, probably involved in the capacity of the bacterium to acquire iron in the human host, and a completely novel region, whose functions are still unknown, which was highly related to the *Salmonella* enteric phage epsilon 15 (Figure 2).<sup>16</sup>

The plasmid A/C-LS6 (178130 bp; JX442976) showed a backbone similar to other IncA/C plasmids (Figure 2). In detail, A/C-LS6 carried the same array of resistance genes previously described in an IncA/C plasmid from *Providencia stuartii* from Tunisia, including the plasmid-mediated quinolone resistance *qnrA6* gene, an ISCR1 class 1 integron conferring streptomycin, β-lactam, chloramphenicol, rifampicin and trimethoprim resistance by the *aadA1*, *bla*<sub>OXA-10</sub>, *cmlA7*, *arr2* and *dfrA16* gene cassettes, and a region encoding aminoglycoside, chloramphenicol/florfenicol and tetracycline resistance by the





**Figure 1.** Major structural features of pKpQIL-type plasmids identified in the carbapenem-resistant and -susceptible *K. pneumoniae* ST258 strains. Plasmid pKpQIL-IT (JN233705) identified in *K. pneumoniae* ST258 in Italy in 2011 is compared with plasmids pKpQIL-LS6 (JX442975) and pKpQIL-SC29 (JX442977), identified in strains LS6 and SC29, respectively. The conserved regions among the three plasmids are shaded, including the small ColE-LS6 plasmid (JX442973) fused with pKpQIL-SC29. The deletions observed in pKpQIL-LS6 and pKpQIL-SC29 with respect to the pKpQIL-IT plasmid sequence are indicated by broken lines under the plasmid maps. Coloured boxes represent different functions/loci: white, plasmid scaffold regions (in the locus *tra* the white boxes include capital letters indicating the respective *tra* genes, i.e. J, *traJ*; D, *traD*; I, *traI* etc.); black, *bla*<sub>KPC-3</sub> gene; orange, other resistance determinants; blue, transposon-related genes (*tnpA*, *tnpR*, *tnpM*), class 1 integrase and insertion sequences; and purple, replicons of the plasmids.

*aphA6*, *aphA1*, *aacA4*, *strA*, *strB*, *floR* and *tet(A)* genes.<sup>17</sup> On this plasmid, the *mer* locus and the *ISEcp1-bla*<sub>CMY-6</sub> module were also found, conferring resistance to mercuric ions and amoxicillin/clavulanic acid, respectively.<sup>18</sup>

Finally, the ColE-LS6 plasmid (14 709 bp; JX442973), carried the *aac(6′)-Ib* gene, encoding gentamicin resistance, as previously described in other ST258 strains (Figure 1).<sup>8</sup>

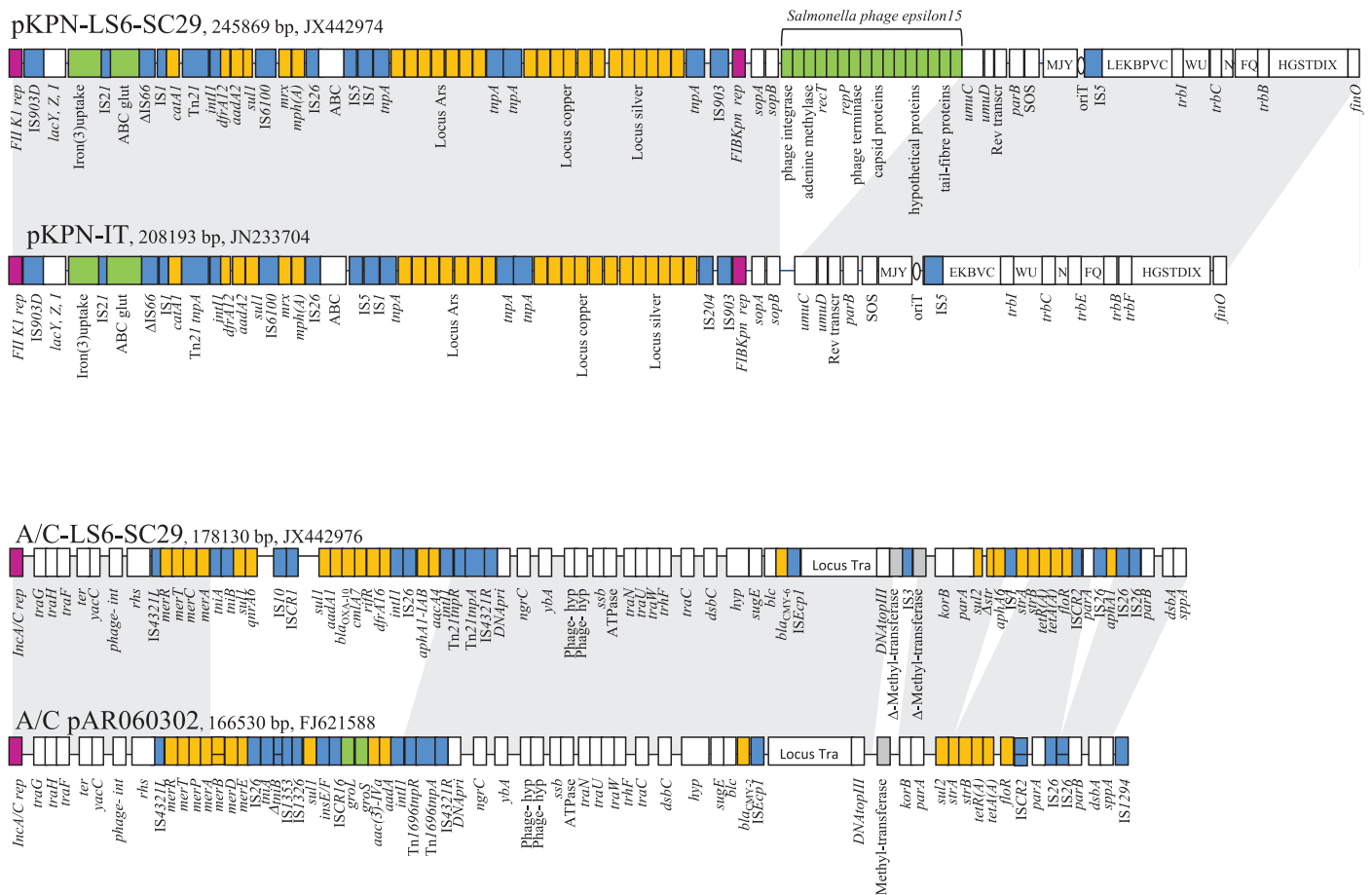
With regard to the number and diversity of plasmids and resistance genes, the plasmid content of the LS6 strain is one of the most interesting described in *K. pneumoniae* so far, showing a formidable set of resistance genes against toxic compounds, metals and all antimicrobial classes, but also containing phage-related and virulence genes, whose function and relevance remain to be ascertained.

### Plasmids and resistance genes in the SC29 carbapenem-susceptible *K. pneumoniae* strain

Three plasmids were identified in the SC29 carbapenem-susceptible strain: pKPN-SC29 and A/C-SC29 were identical to pKPN-LS6 and A/C-LS6, respectively, while the 48 790 bp pKpQIL-SC29 plasmid (JX442977) was a derivative of pKpQIL-LS6 showing important rearrangements. pKpQIL-SC29 derived from a

fusion of pKpQIL and the ColE plasmid, probably by an IS26-mediated recombination event in the region adjacent to the *ardA* gene (Figure 1). Furthermore, pKpQIL-SC29 showed the deletion of the entire *Tn4401::bla*<sub>KPC-3</sub> transposon, with the consequent reversion of the strain to carbapenem susceptibility. The deletion also involved the entire transfer locus and the *bla*<sub>TEM-1</sub> gene. This deletion was probably caused by an IS26-mediated looping out, probably associated with the IS26-mediated fusion of the pKpQIL and ColE plasmids (Figure 1).

The excision of the *bla*<sub>KPC-3</sub> gene from the *Tn4401* transposon reported here is not a rare event; partial deletions of this element were previously observed in *K. pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates of different genetic backgrounds in the USA, highlighting the notion that *Tn4401* is itself heterogeneous and highly plastic.<sup>17</sup> It is plausible that by removing the selective pressure exerted by the therapy with carbapenems, plasmid plasticity may favour the loss of the KPC resistance determinant in the ST258 *K. pneumoniae* clone. The presence of many homologous regions represented by the IS26 elements scattered on multiple plasmids, simultaneously resident within the same bacterial cell, can cause major rearrangements of the plasmid scaffolds. In this study, plasmid fusion and recombination events favoured by IS26 elements led to the restoration of carbapenem susceptibility in the infectious strain, allowing



**Figure 2.** Major structural features of pKPN- and IncA/C-type plasmids identified in the carbapenem-resistant and -susceptible *K. pneumoniae* ST258 strains. Plasmid pKPN-IT (JN233704) identified in *K. pneumoniae* ST258 in Italy in 2011 is compared with pKPN plasmids, identically identified in strains LS6 and SC29, here indicated as pKPN-LS6-SC29. Plasmid A/C pAR060302 (FJ621588) identified in the USA is compared with A/C plasmids, identically identified in strains LS6 and SC29, here indicated as A/C-LS6-SC29. The conserved regions among the two plasmids are shaded. Coloured boxes represent different functions/loci: white, plasmid scaffold regions (in the locus *tra* the white boxes include capital letters indicating the respective *tra* genes, i.e. J, *traJ*; D, *traD*; I, *traI* etc.); orange, other resistance determinants; blue, transposon-related genes (*tnpA*, *tnpR*, *tnpM*), class 1 integrase and insertion sequences; purple, replicons of the plasmids; pale green, putative virulence genes [Fec iron(III), ABC transporter, prophage-related genes]; and grey, methyl-transferase genes.

the successful recovery of the patient when treated with carbapenems.

### Funding

This work was supported by The Italian FLAGSHIP ‘InterOmics’ Project (PB.P05; Grant B81J12000980001) funded by the Italian Ministry of University and Scientific Research (MIUR) and coordinated by the Italian National Council of Research (CNR), and by a grant for Ricerca Corrente Istituti di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS). I. R. and M. D. were recipients of FEMS Research Fellowships.

### Transparency declarations

N. P. has received speaker fees from Novartis, GlaxoSmithKline, Merck Sharp & Dohme, Astellas, Johnson & Johnson, Carefusion, Bristol-Myers Squibb, Gilead, Pfizer and Janssen-Cilag. A. Carattoli has received a project grant from Pfizer (ASPIRE 2012). All other authors: none to declare.

### References

- 1 Kalpoe JS, Sonnenberg E, Factor SH *et al.* Mortality associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2012; **18**: 468–74.
- 2 Patel G, Hupriker S, Factor SH *et al.* Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; **29**: 1099–106.
- 3 Mathers AJ, Cox HL, Bonatti H *et al.* Fatal cross infection by carbapenem-resistant *Klebsiella* in two liver transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2009; **11**: 257–65.
- 4 Cuzon G, Naas T, Truong H *et al.* Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>KPC-2</sub> gene. *Emerg Infect Dis* 2010; **16**: 1349–56.
- 5 Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB *et al.* Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 3365–70.

- 6** Adler A, Paikin S, Sterlin Y et al. A swordless knight: epidemiology and molecular characteristics of the *bla*<sub>KPC</sub>-negative sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae* clone. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 3180–5.
- 7** Chmelnitsky I, Shklyar M, Hermesh O et al. Unique genes identified in the epidemic extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 74–83.
- 8** García-Fernández A, Villa L, Carta C et al. A *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 2143–5.
- 9** Leavitt A, Chmelnitsky I, Ofek I et al. Plasmid pKpQIL encoding KPC-3 and TEM-1 confers carbapenem resistance in an extremely drug-resistant epidemic *Klebsiella pneumoniae* strain. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 243–8.
- 10** Leavitt A, Chmelnitsky I, Carmeli Y et al. Complete nucleotide sequence of KPC-3-encoding plasmid pKpQIL in the epidemic *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 4493–6.
- 11** Cuzon G, Naas T, Nordmann P. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in *bla*<sub>KPC</sub> gene mobilization. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 5370–3.
- 12** Chen L, Chavda KD, Melano RG et al. Complete sequence of a *bla*<sub>KPC-2</sub>-harboring IncFIIK1 plasmid from a *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 1542–5.
- 13** EUCAST. *Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 3.1*. 2013. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/Breakpoint\\_table\\_v\\_3.1.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf) (15 May 2013, date last accessed).
- 14** Diancourt L, Passet V, Verhoef J et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4178–82.
- 15** Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG et al. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 432–8.
- 16** McConnell M, Walker B, Middleton P et al. Restriction endonuclease and genetic mapping studies indicate that the vegetative genome of the temperate, *Salmonella*-specific bacteriophage, epsilon 15, is circularly-permuted. *Arch Virol* 1992; **123**: 215–21.
- 17** Chen L, Chavda KD, Mediavilla JR et al. Partial excision of *bla*<sub>KPC</sub> from Tn4401 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 1635–8.
- 18** Arpin C, Thabet L, Yassine H et al. Evolution of an incompatibility group IncA/C plasmid harboring *bla*<sub>CMY-16</sub> and *qnrA6* genes and its transfer through three clones of *Providencia stuartii* during a two-year outbreak in a Tunisian burn unit. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 1342–9.



## Příloha 22

ALBRECHTOVA, K., PAPOUSEK, I., DE NYS, H., PAULY, M., ANOH, E., MOSSOUN, A., DOLEJSKA, M., MASARIKOVA, M., METZGER, S., COUACY-HYMAN, E., AKOUA-KOFFI, C., WITTIG, R.M., KLIMES, J., CIZEK, A., LEENDERTZ, F.H., LITERAK, I., 2014, Low rates of antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae in wildlife in Taï National Park, Côte d'Ivoire, surrounded by villages with high prevalence of multiresistant ESBL-producing *Escherichia coli* in people and domestic animals: PLoS One, v. 9, e113548.

### Souhrn

---

Cílem studie bylo zjistit výskyt rezistentních bakterií v odlehlých oblastech s minimálním selekčním tlakem antibiotik. V Pobřeží Slonoviny byly v Národním parku Taï, který slouží jako rezervace šimpanzů, a v přilehlých vesnicích vyšetřeny fekální vzorky volně žijících drobných savců, primátů, lidí a domestikovaných zvířat na přítomnost rezistentních bakterií. Kmeny *E. coli* s produkcí ESBL nebo nesoucí geny PMQR pro rezistenci k fluorochinolonům byly zjištěny ve 27-42 % vzorků z lidí a domestikovaných zvířat. Naopak u volně žijících zvířat v národním parku nebyly žádné takové izoláty zjištěny. Studie poukazuje, že přísná opatření pro návštěvníky národního parku omezují přenos rezistentních bakterií k volně žijícím živočichům.



RESEARCH ARTICLE

# Low Rates of Antimicrobial-Resistant Enterobacteriaceae in Wildlife in Taï National Park, Côte d'Ivoire, Surrounded by Villages with High Prevalence of Multiresistant ESBL-Producing *Escherichia coli* in People and Domestic Animals



CrossMark  
click for updates

**OPEN ACCESS**

**Citation:** Albrechtova K, Papousek I, De Nys H, Pauly M, Anoh E, et al. (2014) Low Rates of Antimicrobial-Resistant Enterobacteriaceae in Wildlife in Taï National Park, Côte d'Ivoire, Surrounded by Villages with High Prevalence of Multiresistant ESBL-Producing *Escherichia coli* in People and Domestic Animals. PLoS ONE 9(12): e113548. doi:10.1371/journal.pone.0113548

**Editor:** Gireesh Rajashekara, The Ohio State University, United States of America

**Received:** June 13, 2014

**Accepted:** October 29, 2014

**Published:** December 4, 2014

**Copyright:** © 2014 Albrechtova et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability:** The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper.

**Funding:** This study was funded by the project 'CEITEC - Central European Institute of Technology' (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from the European Regional Development Fund. MD and IP were supported by the Operational Programme "Education for Competitiveness" (CZ.1.07/2.3.00/30.0014) from the European Social Fund. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

Katerina Albrechtova<sup>1\*</sup>, Ivo Papousek<sup>1</sup>, Helene De Nys<sup>2,3</sup>, Maude Pauly<sup>3</sup>, Etile Anoh<sup>4</sup>, Arsene Mossoun<sup>5</sup>, Monika Dolejska<sup>1,6</sup>, Martina Masarikova<sup>6,7</sup>, Sonya Metzger<sup>2,3</sup>, Emmanuel Couacy-Hymann<sup>5</sup>, Chantal Akoua-Koffi<sup>4</sup>, Roman M. Wittig<sup>3,8</sup>, Jiri Klimes<sup>1</sup>, Alois Cizek<sup>6,7</sup>, Fabian H. Leendertz<sup>2\*</sup>, Ivan Literak<sup>1,6</sup>

1. Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic, 2. Project Group "Epidemiology of Highly Pathogenic Microorganisms", Robert Koch Institute, Berlin, Germany, 3. Department of Primatology, Max-Planck-Institute for Evolutionary Anthropology, Leipzig, Germany, 4. Research Center for Development - Alassane Ouattara University, University Teaching Hospital Bouaké, Bouaké, Côte d'Ivoire, 5. LANADA, Laboratoire Nationale de la Pathologie Animale, Bingerville, Côte d'Ivoire, 6. CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic, 7. Institute of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic, 8. Centre Suisse de Recherches Scientifiques, Abidjan, Côte d'Ivoire

\*[albkat@seznam.cz](mailto:albkat@seznam.cz) (KA); [leendertzf@rki.de](mailto:leendertzf@rki.de) (FHL)

## Abstract

Antimicrobial resistance genes can be found in all ecosystems, including those where antibiotic selective pressure has never been exerted. We investigated resistance genes in a collection of faecal samples of wildlife (non-human primates, mice), people and domestic animals (dogs, cats) in Côte d'Ivoire; in the chimpanzee research area of Taï National Park (TNP) and adjacent villages. Single bacteria isolates were collected from antibiotic-containing agar plates and subjected to molecular analysis to detect Enterobacteriaceae isolates with plasmid-mediated genes of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR). While the prevalence of ESBL-producing *E. coli* in the villages was 27% in people (n=77) and 32% in dogs (n=38), no ESBL-producer was found in wildlife of TNP (n=75). PMQR genes, mainly represented by *qnrS1*, were also present in human- and dog-originating isolates from the villages (36% and 42% in people and dogs, respectively), but no *qnrS* has been found in the

park. In TNP, different variants of *qnrB* were detected in *Citrobacter freundii* isolates originating non-human primates and mice. In conclusion, ESBL and PMQR genes frequently found in humans and domestic animals in the villages were rather exceptional in wildlife living in the protected area. Although people enter the park, the strict biosecurity levels they are obliged to follow probably impede transmission of bacteria between them and wildlife.

## Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) is a serious problem that affects the dynamics of microbial populations worldwide, pathogens as well as commensals [1]. Evolution of AMR is swift, owing to plethora of mobile genetic elements, short generation periods and adaptability inherent to many bacterial species [2]. It is presumed that the majority of the resistance gene pool co-evolves with the emergence of natural antibiotic traits. However, certain resistance alleles are given advantage by the use of antibiotics in medicine and agriculture [3]. Unfortunately, it is difficult to estimate which alleles of the naturally evolving resistome will become clinically relevant in future [4]. While some AMR genes have been dispersed globally, owing to successful bacterial clones or conjugative plasmids, other are typically found in particular continents, localities or hospital wards. The public health risk of resistance genes varies according to their genetic vehicle (plasmid, transposon, adjacent insertion sequence etc.) and bacterial species carrying the genes [5]. Monitoring of resistance genes occurring at the interface of pristine and human-influenced ecosystems helps us to estimate the frequency of gene exchange in microbial populations of people, domestic animals and wildlife and thereby to better understand the AMR epidemiology.

Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) confer resistance to wide spectrum of beta-lactams, up to third-generation cephalosporins [6]. Their increasing occurrence and diversity, documented since the 1980s [7–8], is intertwined with the use of these drugs in human and veterinary medicine. ESBL genes are often transferred on multiresistant conjugative plasmids, which facilitated their global emergence; these are not limited to hospitals but also abundant in community settings [8]. One of the most promiscuous and most widespread among the ESBLs is the CTX-M family [9]. AmpC-type beta-lactamases occur as inherent chromosome-mediated enzymes in several classes of non-pathogenic bacteria and they are being detected with an increasing frequency as plasmid-encoded enzymes in clinically relevant Enterobacteriaceae [10]. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) is represented by a heterogeneous group of genes *qnr*, *aac(6′)-Ib-cr*, *oqxAB* and *qepA*. Different types of genes *qnr* and the *cr*-mutation of *aac(6′)-Ib* gene have low ability to inactivate quinolones and therefore their presence usually does not generate resistance above the clinical breakpoints. Still, these genes play an important role in the multifactorial process of fluoroquino-



lone resistance generation and monitoring of their prevalence is important to our understanding to fluoroquinolone resistance epidemiology [11]. Although different alleles of *qnr* (specifically *qnrB* and *qnrS*) occur naturally as a part of intrinsic resistance in *Citrobacter* sp. and *Vibrio* sp., their mobilisation to *E. coli* is supposedly a human-influenced phenomenon, driven mainly by the use of fluoroquinolones in human and animal medicine and agriculture [11]. The global increase of Enterobacteriaceae with plasmid-mediated genes *aac(6')-Ib-cr*, *oqxAB* and *qepA* is also considered a consequence of quinolone use [12].

ESBLs, AmpCs and PMQR represent a serious public health problem in Africa, where the pressure of infectious diseases is high and the use of antibiotics is often inappropriate [13]. Many studies have investigated resistance and its genetic background in clinical or agricultural settings, but less data have been collected in ecosystems where the human impact is limited to minimum, e.g. nature reserves and other protected areas [14–16]. Taï National Park (TNP) in Côte d'Ivoire (CI) is one of the last remaining forest blocks in west Africa, its protection was established in 1970s to conserve endangered population of the western chimpanzee (*Pan troglodytes verus*), the pygmy hippopotamus (*Choeropsis liberiensis*) and other wildlife. Access of people is limited to researchers and local assistants in the northern part of the park. Nevertheless, even with such level of protection, microbial exchange between people and wildlife is not impossible, as demonstrated by the transmission of human respiratory viruses to the chimpanzees [17–18].

In this study we aimed to identify the spectrum of resistance genes in gastrointestinal flora of primates living in Taï National Park and inhabitants of villages surrounding the protected area. We were looking at possible overlaps in the spectrum of resistant bacteria in these two ecosystems, adjacent one to the other but totally different in terms of human impact. We address the prevalence of resistant bacteria in NHPs in TNP, as well as people and domestic animals living in its proximity. When discussing these issues, the presence of ESBL-producing Enterobacteriaceae is considered as a result of human-originating microbial pollution [19–20]. Indisputably, part of PMQR genes (*aac-6'-Ib-cr*, *qepA*, *oqxAB* and *qnr* in *E. coli*) can also be regarded as human-originating pollution, yet another part (*qnrB* in *Citrobacter* sp. or sole *oqxA* in *Klebsiella* sp.) probably represent evolving intrinsic resistance. [21–22]. The latter group of PMQR is noteworthy for their potential of transfer to human pathogens.

## Materials and Methods

### Study area

TNP, located at the western border of Côte d'Ivoire (geographic coordinates of the main research camp: lat.5.86767554/long.–7.33968803) represents the largest remaining tropical rainforest in West Africa (435,000 ha) [23]. It is covered with dense primary forest and lined by less dense secondary forest at the borders. Three groups of habituated chimpanzees dwell in the park; northern group (18

individuals in 2012), southern group (24 individuals) and eastern group (31 individuals). Additionally, unhabituated chimpanzees have been observed in the park; their total number is not known. While overlaps of ranging areas of the three groups are minimal and chimpanzees from different groups rarely meet face to face, immigration of females from neighbouring groups can occur. In 2004, 2007 and 2011, the chimpanzees of the South group and in 2007 the individuals of the East group were treated by a single shot of Extencilline (Benzathine Benzylpenicillin 2,400,000 IU; Sanofi-Aventis, France; 3–5 ml intramuscular injection per individual) due to severe respiratory outbreaks.

Four research camps have been built within the park – one in the middle of the range of each group (North, East, and South camp) and an additional quarantine camp in the northern area. Chimpanzees are followed daily by one to three researchers or assistants. Access of tourists and visitors is not possible to the park. For the Taï Chimpanzee Project (TCP), where this study has been carried out, only a small number of scientists (less than 10 in average) and local assistants (less than 30) have access to the camps and forest. Strict hygiene rules are in place to prevent transmission of any pathogens from people to animals [18, 24]. Persons who are about to approach the animals must be clinically healthy and have to go through 5 days quarantine after entering the park from outside. Face masks must be worn all the time in the presence of the chimpanzees and observers have to keep at least 7 m distance from them. Free defecation in the forest is not allowed; if necessary, faeces have to be collected immediately into plastic bags and transported to latrines at the camps (these are closed and not accessible to animals). Details of the hygienic protocol are available online [25].

The villages of Daobly, Ponan, Taï, Pauléola and Gouléako (with populations ranging from 1000 to 7000 inhabitants) are situated along the northern access road to TNP. People in the villages keep domestic animals such as dogs, cats, goats, cattle, poultry and pigs. The majority of assistants working in the park are residents of these villages; they come to work in the forest on four week rotations. There is no veterinarian operating in the region. According to questionnaire administered to participants of the study in the villages (M.P., unpublished data), dogs in the sampling area are not receiving antibiotics. People in the villages can acquire antibiotics from local hospitals or at local shops. Researchers working in the forest occasionally use doxycycline for malaria prophylaxis (for a period up to two months), however, treatment by beta-lactams or quinolones did not occur in the forest during the last five years.

## Sampling

Collection of faecal samples took place within and around the park from January 2012 to September 2012 (wildlife was sampled in January and February, people, dogs and cats from March to September). Chimpanzees of the three groups can be recognized individually, so individual faecal samples ( $n=43$ ) were taken. Faecal samples were collected into plastic bags immediately after defecation had been observed, without disturbing the natural behaviour [24]. A swab was made from

the central part of the faeces. Additionally, fresh faeces of Diana monkey (*Cercopithecus diana*, n=9), sooty mangabeys (*Cercocebus agilis*, n=9), upper Guinea red colobus (*Ptilocolobus badius*, n=9) and King colobus (*Colobus polykomos*, n=5) were sampled in a similar manner, but those cannot be considered as individual samples.

Within the quarantine camp, the latrine was sampled four times within a week interval (n=4 in total) by a swab attached to a bamboo pole. Faeces were collected from nests of house mice (n=4) in the camp. All swabs were preserved in Amies medium and kept refrigerated (the longest storage period was 8 weeks) until transported to the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic. In the villages samples were collected from 38 domestic dogs (12 in Daobly, 12 in Taï, 5 in Ponan, 9 in Pauléola) and 3 cats (all in Taï). Stool samples were also collected from 77 inhabitants of the villages (19 in Daobly, 39 in Ponan, 14 in Taï, 5 in Gouléako), stored in cryotubes in liquid nitrogen and transported on dry ice to Robert Koch Institute, Berlin, Germany and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Ethics statement

Sampling of humans was approved by the Ministère de la santé et de la lutte contre le SIDA, comité national d'éthique et de la recherche de la République de Côte d'Ivoire N°011-/MSHP/CNER-P. Before sampling, the aim of the study and the possibility to quit the study at any point, was explained individually in the local language. An individual study number was assigned to every participant to protect the privacy of the participant. Written informed consent was obtained from every study participant and sampling was performed according to the declaration of Helsinki. Sampling of domestic animals was done according to the Directive 86/609/EEC on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. The permit for sampling of domestic animals was issued by LANADA, Laboratoire Nationale de la Pathologie Animale, Bingerville, CI. Sampling of wildlife in TNP was done non-invasively, according to permit issued by Office Ivoirien des Parcs et Réserves (OIPR), Abidjan, CI.

### Microbiological techniques

Each swab was plated in parallel on plain MacConkey agar (MCA) (Oxoid, UK), MCA with cefotaxime (2 mg/l) and MCA with ciprofloxacin (0.05 mg/l). The human samples were swabbed directly from the frozen material in vials and plated on MCA with cefotaxime and MCA with ciprofloxacin. The swabs originating from the park were plated additionally on MCA with cefoxitin (16 mg/l). One lactose-fermenting colony was isolated from each plate. All isolates grown on MCA with cefotaxime were tested by double-disc synergy test (DDST) for production of ESBL [26]. Selected isolates were tested by disc-diffusion method [26] for sensitivity to 12 antibiotics – ampicillin (10  $\mu\text{g}$ ), cephalotin (30  $\mu\text{g}$ ), amoxicillin-clavulanate (20+10  $\mu\text{g}$ ), ceftazidime (30  $\mu\text{g}$ ), trimethoprim-sulfa-

methoxazole (1.25+23.7 µg), sulphonamides compounds (300 µg), gentamicin (10 µg), nalidixic acid (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), streptomycin (30 µg), tetracycline (30 µg) and chloramphenicol (30 µg). Isolates with resistance to all beta-lactams tested were additionally examined for sensitivity to aztreonam (30 µg), cefpodoxime (10 µg), ceftazidime (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg) and ertapenem (10 µg).

## Molecular typing

All isolates positive in DDST were tested by PCR for ESBL-encoding genes (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>) as described previously [27–28]. Multiplex PCR [29] was used to search for genes of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in all isolates grown on plates containing cefoxitin and in isolates grown on media with cefotaxime but negative in the DDST. The PMQR genes (*aac(6′)-Ib-cr*, *qepA*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* and *oqxAB*) were searched in isolates obtained on media with ciprofloxacin by PCRs as summarized elsewhere [30]. Forward primer *psp2* was used in combination with reverse primers *sc3*, *ds2* and *ds3* [22] to investigate the flanking sequences of the *qnrB* genes. PMQR, ESBL and AmpC genes were sequenced to specify the type of the allele (EZ-seq service performed at MacroGen Europe). According to their resistance phenotype, isolates were tested for additional antibiotic resistance genes and integrons as described before [27].

All isolates with resistance were identified to species level by MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry; Microflex LT, Bruker Daltonics, Brehmen, Germany). *E. coli* isolates were tested for phylogroup by multiplex PCR [31]. All the ESBL-, AmpC- or PMQR- positive isolates were typed by XbaI pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) [32]. The profiles obtained were analysed using the unweighed pair group method with arithmetic mean (UPGMA) in Bionumerics 6.6 software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Cluster analysis of the Dice similarity indices was conducted to generate a dendrogram describing the relationships among PFGE profiles.

## Transferability of resistance genes and plasmid characterization

Conjugation transfer of ESBL genes was made to plasmid-free, rifampin- and azid-resistant *E. coli* MT102RN and *Salmonella* Typhimurium SL5325 [33]. Plasmid DNA from ESBL-producing and PMQR-harboring isolates was extracted by rapid alkaline method [34] and introduced into competent *E. coli* DH5α (Invitrogen, USA) by chemical transformation. Transformants were selected on LB agar (Difco, USA) supplemented with 2 mg/l cefotaxime or 0.05 mg/l ciprofloxacin, according to the genes of donor isolates. Transformants and transconjugants were tested for the number of plasmids gained and their size using S1-PFGE [35]. Single plasmid-harboring and ESBL-producing transformants and transconjugants were screened for transferred resistance genes by PCR

as described above. Plasmids extracted from these transformants and transconjugants by the Birnboim-Doly method were replicon typed [36–37] and their resistance genes were tested by PCR as described above [27, 30].

## Results

### Resistant isolates obtained from humans and domestic animals of the villages

The most common bacterial species obtained by cultivation of human- and dog-originating faecal samples on plates with ciprofloxacin and cefotaxime was *E. coli* (73/76; 96% isolates). All four phylogenetic groups were present; the most frequent group A (52/76; 68%) was followed in frequency by group B1 (14/76; 18%), D (12/76; 16%) and B2 (3/76; 0.4%). Based on the results of DDST (i.e. ESBL phenotype) and molecular methods, a total of 35 ESBL-producing *E. coli* isolates (Table 1) were obtained by cultivation of samples from dogs (12/38 dogs; 32%), cats (2/3 cats) and humans (21/77 humans; 27%). All the DDST-positive isolates produced the CTX-M-15 type beta-lactamase and were multiresistant; besides the resistance to beta-lactams, they showed resistance to other groups of antibiotics, including tetracyclines, sulphonamides, aminoglycosides, chloramphenicol and fluoroquinolones. Six of the ESBL-producing isolates have shown decreased sensitivity to ceftazidime. Among these, none was resistant to imipenem or meropenem, but all were uniformly resistant to cefepime, aztreonam and cefpodoxime. As revealed by transformation and conjugation experiments, the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene was localized on various conjugative plasmids ranging in size from 60 to 90 kb, of incompatibility group FIB or N, together with different combinations of other resistance genes (Table 2). Some plasmids were not typable by any of replicon-typing primers available. In total, transformation experiments were successful in 6 ESBL-producing isolates and conjugation was successful in 8 ESBL-producing isolates.

By cultivation on MCA with ciprofloxacin, a total of 44 PMQR isolates was obtained from samples collected in the villages (Table 3). Of these, 14 dog-originating isolates of *E. coli* and 20 human-originating isolates of *E. coli* possessed the gene *qnrS1*. The gene *qnrB* was found in *E. coli* from three people and one *C. freundii* isolate from a dog, the *aac*-(6′)-*Ib-cr* was detected in two human-originating *E. coli* isolates and one human-originating *K. pneumoniae*. The *aac*-(6′)-*Ib-cr* gene was also present in four of the ESBL-producing isolates. One *E. coli* isolate had the *oqxAB* efflux pump. Similarly to the ESBL-producing isolates, the PMQR isolates were multiresistant; three to eight of the antibiotics tested have shown decreased sensitivity in the disc-diffusion test.

According to the PFGE analysis, the ESBL- and PMQR- resistant isolates grouped into 15 clusters of >80% similarity irrespective of their host (dogs versus humans) and sampling site (village). No clone seemed to be characteristic of a given locality. Isolates with identical PFGE profile were detected in humans and animals living in the same villages (Figure 1).

**Table 1.** Characteristics of ESBL-producing isolates from villages.

Locality	Source	Species, PG	Resistance genes	Resistance phenotype
Daobly	D 866 ctx	<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA1</sub> , <i>strA</i> , <i>aadA5</i> , <i>tet(B)</i> , <i>aac</i> -(6')- <i>lb-cr</i> , <i>sul2</i>	AmpCefNalCipTetSxtSptSul
	D 868 ctx	<i>E. coli</i> , D	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> (C), <i>bla</i> <sub>OXA1</sub> , <i>strA</i> , <i>aadA5</i> , <i>tet(B)</i> , <i>aac</i> -(6')- <i>lb-cr</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	AmpCefNalCipTetSxtChlSptSul
	D 878 ctx	<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>strA</i> , <i>int1</i> ( <i>dfr1-sat-aadA1</i> ), <i>sul2</i>	AmpCefNalSxtSul
	<b>D 879 ctx</b>	<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> (C), <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>strA</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i>	AmpCefTetSxtSptSul
	H 260 ctx	<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>tet(A)</i>	AmpCefTet
	H 267 ctx	<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , <i>aadA2</i>	AmpCefNalGenTetSxtSptSul
	<b>H 268 ctx</b>	<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> (T, C), <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>tet(B)</i> , <i>sul2</i>	AmpCefCazTetSxtSptSul
	H 271 ctx	<i>E. coli</i> , B2	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>strA</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul1</i> , <i>sul</i> , <i>aadA5</i>	AmpCefCazNalCipGenTetSxtSptSul
	H 285 ctx	<i>E. coli</i> , B1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>strA</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , <i>aadA2</i>	AmpCefNalTetSxtSptSul
	H 298 ctx	<i>E. coli</i> , D	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>strA</i> , <i>tet(A)</i> , <i>aac</i> -(6')- <i>lb-cr</i> , <i>aac</i> (3)II, <i>sul2</i>	AmpCefAmcNalCipGenTetSxtSptSul
Ponan	H 324 ctx	<i>E. coli</i> , B1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i>	AmpCefTetSxtSptSul
	<b>H 332 ctx</b>	<i>E. coli</i> , B1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> (T), <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i>	AmpCefTetSxtSptSul
	H 106 ctx	<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>strA</i> , <i>tet(B)</i> , <i>aac</i> -(6')- <i>lb-cr</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>aadA5</i>	AmpCefCazNalCipTetSxtSptSul
	H 110 ctx	<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>strA</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , <i>aadA2</i>	AmpCefTetSxtSptSul
	H 115 ctx	<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>strA</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>aadA2</i>	AmpCefCpdTetSxtSptSul
	H 127 ctx	<i>E. coli</i> , D	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>aac</i> (3)II, <i>aadA2</i> , <i>aadA5</i>	AmpCefCazAmcNalCipGenTetSxtSptSul
	H 149 ctx	<i>E. coli</i> , D	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>strA</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>	AmpCefCazNalTetSxtChlSptSul
	H 154 ctx	<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>tet(B)</i> , <i>aadA5</i>	AmpCefAmcNalCipTetSxtChlSptSul
	H 167 ctx	<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , <i>aadA2</i>	AmpCefNalTetSxtSptSul
	Tai	D 856 ctx	<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>strA</i> , <i>tet(A)</i>
<b>D 860 ctx</b>		<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>strA</i> , <i>tet(B)</i> , <i>sul2</i>	AmpCefTetSxtSptSul
<b>D 872 ctx</b>		<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> (T), <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>sul2</i>	AmpCefTetSxtSptSul
C 881 ctx		<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> (C), <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>strA</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i>	AmpCefTetSxtChlSptSul
C 882 ctx		<i>E. coli</i> , B1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>strA</i> , <i>tet(A)</i> , <i>qnrS1</i>	AmpCefNalCipTetSxtSptSul



Table 1. Cont.

Locality	Source	Species, PG	Resistance genes	Resistance phenotype
	D 884 ctx	<i>E. coli</i> , B1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>strA</i> , <i>intI2</i> ( <i>dfr1-sat-aadA1</i> ), <i>aac</i> -(6')-Ib-cr, <i>sul2</i>	AmpCefNalCipTetSxtSptSul
	<b>H 215 ctx</b>	<i>E. coli</i> , B1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> (T), <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>strA</i> , <i>tet</i> (A), <i>aadA2</i>	AmpCefTetSxtSptSul
	H 217 ctx	<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> <i>strA</i> , <i>tet</i> (A), <i>aadA5</i>	AmpCefNalTetSxtSptSul
	H 234 ctx	<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>strA</i> , <i>tet</i> (A), <i>aadA5</i>	AmpCefTetSxtSptSul
	H 241 ctx	<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>OXA1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	AmpCefCazAmcNalCipGenTetSxtChlSptSul
	<b>H 244 ctx</b>	<i>E. coli</i> , B1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> (C), <i>strA</i> , <i>tet</i> (A), <i>aadA2</i>	AmpCefNalTetSxtSptSul
Pauléola	<b>D 855 ctx</b>	<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> (C), <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>strA</i> , <i>tet</i> (B), <i>sul2</i>	AmpCefNalCipGenTetSxtSptSul
	<b>D 858 ctx</b>	<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> (C), <i>bla</i> <sub>OXA1</sub> , <i>strA</i> , <i>aadA5</i> , <i>tet</i> (B), <i>aac</i> -(6')-Ib-cr, <i>sul2</i>	AmpCefNalCipTetSxtSptSul
	D 859 ctx	<i>E. coli</i> , A	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>strA</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul2</i>	AmpCefTetSxtChlSptSul
	D 886 ctx	<i>E. coli</i> , B1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>strA</i> , <i>aadA5</i> , <i>intI2</i> ( <i>dfr1-sat1</i> ), <i>sul2</i>	AmpCefNalCipGenTetSxtChlSptSul
Gouléako	<b>H 344 ctx</b>	<i>E. coli</i> , B1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> (C), <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>tet</i> (A), <i>aac</i> (3)II, <i>sul2</i> , <i>aadA2</i>	AmpCefTetSxtSptSul

All isolates were obtained on MCA-cefotaxime.

“D” – isolate from dog, “H” – isolates from human, “C” – isolate from cat. “T” in brackets means that the resistance gene was successfully transformed into competent cells, “C” in brackets means that the gene was conjugated. Plasmids were isolated and characterized from isolates in bold font. See Table 2 for plasmid characteristics.

PG=phylogroup, Amp=ampicillin, Cef=cephalotin, Caz=ceftazidime, Amc=amoxicillin-clavulanate, Nal=nalidixic acid, Cip=ciprofloxacin, Tet=tetracycline, Sxt=trimethoprim-sulfamethoxazole, Spt=streptomycin, Sul=sulfonamides compounds, Gen=gentamicin, Chl=chloramphenicol, Cpd=cefpodoxime.

doi:10.1371/journal.pone.0113548.t001

### Resistant isolates found in NHPs and research camps in the forest

No lactose-fermenting colonies were obtained by cultivation of the 76 samples obtained within TNP (NHPs, mice, the latrine in the research camp) on plates with cefotaxime. A total of 25 lactose-fermenting colonies were obtained on MCA with ciprofloxacin (Table 4). Among those, four isolates originating from chimpanzees and three originating from monkeys were identified as *Citrobacter freundii* and carried variants of *qnrB*, one chimpanzee harboured a *qnrB13*-producing *Klebsiella pneumoniae*. A *qnrB*-harbouring *C. freundii* was found also in one house mouse in the North camp. The allele *qnrB13* was found exclusively in chimpanzees, *qnrB9* occurred only in monkeys and *qnrB28* was detected in chimpanzees, monkeys, house mouse and also in a dog living in Pauléola village. Besides the *qnrB*-harboring isolates, the cultivation on MCA with ciprofloxacin

**Table 2.** Characteristics of plasmids obtained by transformation.

Isolate ID	Donor isolate species	Locality of donor isolate	Inc group	Size (kb)	Resistance genes co-transferred on the plasmid
H 115 cip	<i>E. coli</i>	Ponan	NT	35	<i>qnrS1</i>
D 854 cip	<i>E. coli</i>	Tai	FIB	75	<i>qnrS1, tet(A), sul2, strA, bla<sub>TEM-1</sub></i>
D 855 cip	<i>E. coli</i>	Pauléola	FIB	75	<i>qnrS1, tet(A), sul2, strA, bla<sub>TEM-1</sub></i>
D 866 cip	<i>E. coli</i>	Daobly	NT	33	<i>qnrS1, sul3</i>
D 867 cip	<i>E. cloacae</i>	Daobly	R	75	<i>qnrS1, sul2, strA</i>
D 871 cip	<i>E. coli</i>	Tai	NT	40	<i>qnrS1, strA, bla<sub>TEM-1</sub></i>
D 877 cip	<i>E. coli</i>	Pauléola	NT	35	<i>qnrS1, tet(A)</i>
D 879 cip	<i>E. coli</i>	Daobly	NT	90	<i>qnrS1, bla<sub>TEM-1</sub></i>
H 215 ctx	<i>E. coli</i>	Tai	NT	70	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>TEM-1</sub>, tet(A), sul2, strA</i>
H 244 ctx	<i>E. coli</i>	Tai	NT	70	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub>, sul2, strA</i>
H 268 ctx	<i>E. coli</i>	Daobly	NT	70	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub>, sul2</i>
H 332 ctx	<i>E. coli</i>	Daobly	NT	70	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>TEM-1</sub>, tet(A), sul2, strA</i>
H 344 ctx	<i>E. coli</i>	Gouléako	NT	65	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub>, tet(A)</i>
D 859 ctx	<i>E. coli</i>	Pauléola	N	75	<i>qnrS1, bla<sub>TEM-1</sub>, tet(A), sul2, strA</i>
D 860 ctx	<i>E. coli</i>	Tai	NT	60	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>TEM-1</sub>, sul2, strA</i>
D 872 ctx	<i>E. coli</i>	Tai	FIB	75	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub>, tet(A), sul2, strA</i>
D 879 ctx	<i>E. coli</i>	Daobly	FIB	90	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>TEM-1</sub>, tet(A), sul2, strA</i>

“NT”—not typable. Note: transconjugants obtained in this study contained more than one plasmid and therefore were not used for plasmid characterization.

doi:10.1371/journal.pone.0113548.t002

generated five wildlife-originating *K. pneumoniae* with *oqxA* gene (not shown in tables) and one multiresistant *E. coli* originating from the camp latrine (Table 4).

Cefoxitin-resistant isolates of *Enterobacter asburiae* or *C. freundii* were obtained by cultivation of the chimpanzee, mouse and mangabey samples on MCA-cefoxitin and showed to harbour *bla<sub>DHA</sub>*, *bla<sub>CMY</sub>*, *bla<sub>EBC</sub>* and *bla<sub>ACT</sub>* genes (Table 4). Cultivability of *E. coli* from the wildlife-originating swabs was checked by their growth on MCA without antibiotics; *E. coli* was successfully obtained from all samples. Of the non-selectively cultivated isolates, two, originating from chimpanzees (821 and 842 – North and East group individuals, respectively), have shown resistance to multiple antibiotics (phenotypes AmpCefAmcSulSxt and AmpSulSpt; not shown in tables). Within other isolates obtained on the non-selective medium, five had decreased sensitivity to ampicillin, while the rest were sensitive to all 12 antibiotics.

## Discussion

### Resistance found in the villages

Multiresistant *E. coli* with the CTX-M-15 beta-lactamase were detected in 32% of people and 27% of dogs living in the investigated villages. Similar prevalence has been recently recorded in other rural communities in Africa [38–41]. CTX-M



**Table 3.** Characteristics of isolates with PMQR genes.

Locality	Source, ID	Species, PG	Resistance genes	Resistance phenotype	
Daobly	D 862 cip	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>strA</i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>sul2</i>	AmpTetSxtSulSpt	
	D 863 cip	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>sul2</i>	AmpTetSxtSulSpt	
	D 864 cip	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>strA</i>	AmpTetSxtSulSpt	
	<b>D 866 cip</b>	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1(T)</i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>sul3</i>	AmpCefTetSxt	
	<b>D 867 cip</b>	<i>E. cloacae</i>	<i>qnrS1 (T)</i> , <i>tet(A)</i> , <i>strA</i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>sul2</i>	AmpCefAmcTetSxtSulSpt	
	D 878 cip	<i>E. coli</i> , D	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>strA</i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>sul2</i>	AmpCefAmcTetSxtSulSpt	
	<b>D 879 cip</b>	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1 (T)</i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AmpSulSxt	
	D 883 cip	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>strA</i> , <i>sul2</i>	AmpTetSulSxtSpt	
	H 270 cip	<i>K. pneumoniae</i>	<i>aac-(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>aadA5</i>	AmpCefTet	
	H 298 cip	<i>E. coli</i> , D	<i>aac-(6')-Ib-cr</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i>	AmpNalCipGenTetSxtSul	
	H 285 cip	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i>	AmpTetSxtSul	
	H 295 cip	<i>E. coli</i> , B1	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i>	AmpTetSxtSulSpt	
	H 324 cip	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrB1</i> , <i>tet(A)</i>	SulSxtTet	
	H 336 cip	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>intl1 (dfrA1-aadA1)</i>	AmpTetSulSxt	
	Ponan	H 103 cip	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>oqxA</i> , <i>tet(A)</i> , <i>intl1 (dfrA1-aadA1)</i> , <i>aadA2</i>	AmpTetSxtSul
H 109 cip		<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>sul1</i>	AmpNalTetSxtSul	
H 110 cip		<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>strA</i> , <i>intl2 (dfrA1-sat-aadA1)</i> , <i>sul2</i> , <i>aadA2</i>	AmpCefTetSxtSul	
H 111 cip		<i>E. coli</i> , A	<i>aac-(6')-Ib-cr</i> , <i>tet(A)</i> , <i>strA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	AmpNalCipTetSxtSul	
H 112 cip		<i>E. coli</i> , B2	<i>qnrS1</i> , <i>oqxA</i>	AmpTetNal	
<b>H 115 cip</b>		<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1 (T, C)</i> , <i>tet(A)</i>	AmpSulTet	
H 120 cip		<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i>	AmpSulTetChl	
H 125 cip		<i>E. coli</i> , A	<i>oqxAB</i> , <i>aac-(6')-Ib-cr</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul1</i>	SxtSulTetNalCip	
H 127 cip		<i>E. coli</i> , D	<i>qnrB1</i> , <i>aac-(6')-Ib-cr</i> , <i>intl1 (aadA1)</i> , <i>aac(3)II</i> , <i>aadA2</i>	AmpCefSulSxtChlGen	
H 151 cip		<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i>	AmpSulTetSxt	
H 158 cip		<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i>	AmpSulTetSxt	
H 159 cip		<i>E. coli</i> , A	<i>qnrB19</i> , <i>tet(A)</i> , <i>strA</i> , <i>sul3</i>	AmpSulTetSxt	
H 167 cip		<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>oqxA</i> , <i>tet(A)</i> , <i>strA</i> , <i>intl2 (dfrA1-sat-aadA1)</i> , <i>sul2</i>	AmpTetSxtSulSptCfa	
Taï		H 212 cip	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i>	AmpTetSxtSul
		H 217 cip	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i>	AmpTetSxtSul
	H 220 cip	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>strA</i> , <i>sul2</i> , <i>aadA2</i>	AmpCipTetSxtSulSpt	

Table 3. Cont.

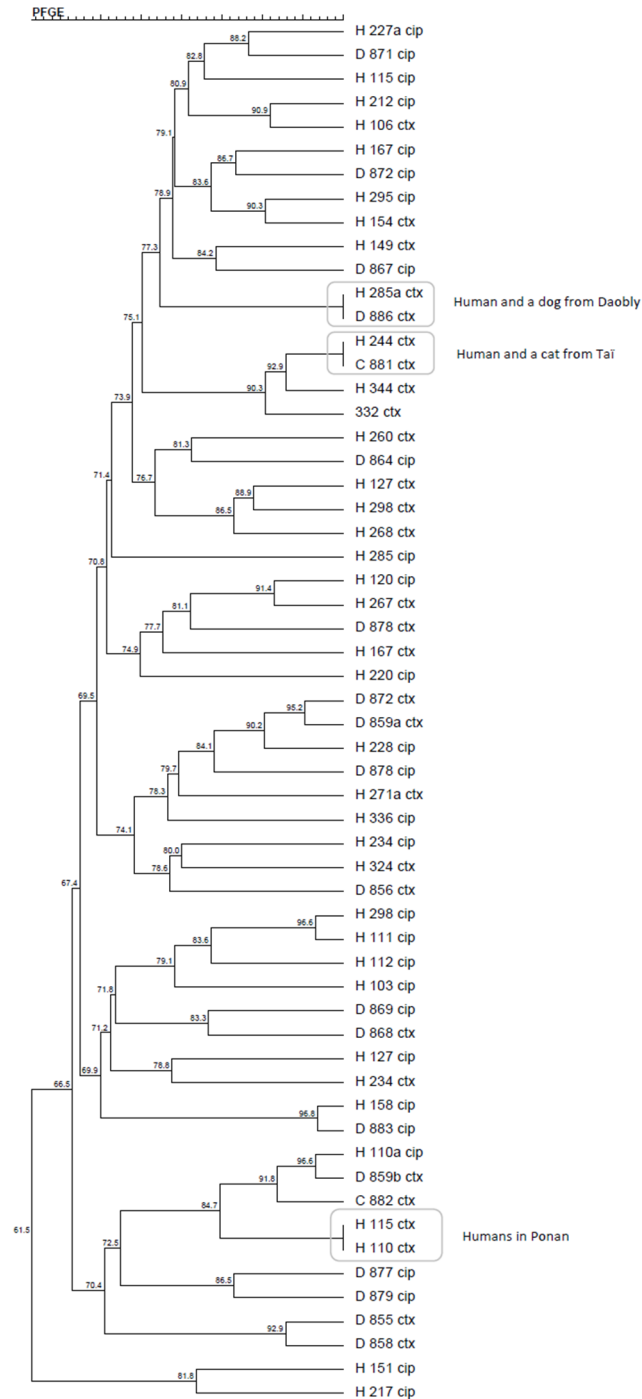
Locality	Source, ID	Species, PG	Resistance genes	Resistance phenotype
	H 224 cip	<i>E. coli</i> , B1	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i>	AmpTetSxtSulSpt
	H 227 cip	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>strA</i> , <i>sul2</i>	AmpTetSxtSul
	H 228 cip	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i>	AmpTetSxtSulSpt
	H 234 cip	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , <i>aadA2</i>	AmpTetSxtSulChlSpt
	<b>D 854 cip</b>	<i>E. coli</i> , B1	<i>qnrS1</i> (T), <i>tet(A)</i> , <i>strA</i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>sul2</i>	AmpCefTetSxtSulSpt
	<b>D 871 cip</b>	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> (T), <i>tet(A)</i> , <i>strA</i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AmpCefCipTetSulSxtSpt
	D 872 cip	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>strA</i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>sul2</i>	AmpNalCipTetSulSxtSpt
Gouléako	H 344 cip	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>strA</i> , <i>sul2</i> , <i>aadA5</i>	AmpTetSxtSul
	H 346 cip	<i>E. coli</i> , A	<i>aac</i> -(6')-Ib-cr, <i>tet(B)</i> , <i>strA</i> , <i>sul2</i>	AmpNalCipGenTetSulSxtSpt
Pauléola	<b>D 855 cip</b>	<i>E. coli</i> , B1	<i>qnrS1</i> (T), <i>tet(A)</i> , <i>strA</i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>sul2</i>	AmpCefTetSxtSulSpt
	D 858 cip	<i>E. coli</i> , B1	<i>qepA</i> , <i>tet(B)</i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>int1</i> ( <i>dfr2d</i> ), <i>sul1</i>	AmpCefAmcNalCipTetSxtSul
	<b>D 859 cip</b>	<i>E. coli</i> , A	<i>qnrS1</i> (T), <i>tet(A)</i> , <i>strA</i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>sul2</i>	AmpTetSxtSulSpt
	D 869 cip	<i>C. freundii</i>	<i>qnrB28</i>	Amp
	<b>D 877 cip</b>	<i>E. coli</i> , D	<i>qnrS1</i> (T), <i>tet(A)</i> , <i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	AmpNalTetSul

Isolates were obtained on MCA-ciprofloxacin.  
For legend see [table 1](#).

doi:10.1371/journal.pone.0113548.t003

actually represents a pandemic type of extended-spectrum beta-lactamase with faecal carriage prevalence reaching up to 66% [42]. The particular success of the allele *bla<sub>CTX-M-15</sub>* in human population has not been satisfactorily clarified, but its selection by use of ceftazidime and other third-generation cephalosporins is the very likely initial step [43]. In Africa, the use of third-generation cephalosporins is often warranted as a second-line alternative to treat multiresistant cholera, pneumonia, typhoid fever and other serious but frequent infections [44]. CTX-M-15 is known to occur on conjugative multiresistance-encoding plasmids, which was the case also in our study. Such plasmids can facilitate the process of co-selection [45] so that the beta-lactamase can be spread even under selective pressure of more common and cheaper antibiotics like sulfonamides, tetracyclines or aminoglycosides. Frequent need of antimicrobial treatment, together with poor sanitary conditions and warm climate, make ideal conditions for a widespread ESBL colonisation of people and animals in rural communities [13]. Although dogs are not directly subjected to the selective pressure exerted by antibiotic therapy, they often scavenge for food and water in human refuse (including the “free defecation zones”; [46]) and thus get easily colonized by human-originating bacteria from the environment.

The PMQR isolates, obtained by cultivation on ciprofloxacin, were dominated by *qnrS1*-harboring *E. coli*. This gene probably originates from *Salmonella* sp. and



**Figure 1. Dendrogram of resistant *E. coli* isolates' PFGE profiles.** Generated by cluster analysis of the Dice similarity indices in the BioNumerics fingerprinting software (optimization 1%, band matching tolerance 1%, tolerance change 1%). Isolates marked with "cip" were obtained by cultivation on ciprofloxacin and harbored PMQR genes, isolates with "ctx" represent the CTX-M-15 producing *E. coli*. "H" isolate from human, "D" isolate from dog, "C" isolate from cat.

doi:10.1371/journal.pone.0113548.g001

**Table 4.** Isolates with PMQR or AmpC genes originating from TNP (wildlife and camps).

Territory	sample origin	bacterial species	resistance genes	resistance phenotype
North	latrine, quarantine camp 789 cip	<i>E. coli</i>	<i>oqxA</i>	AmpNalCipTetSxtSulChlSpt
	house mouse 785 cip	<i>C. freundii</i>	<i>qnrB28</i>	sensitive
	house mouse 786 fox	<i>E. asburiae</i>	<i>bla<sub>EBC</sub></i>	AmpCef
	King colobus 794 cip	<i>C. freundii</i>	<i>qnrB28, oqxA</i>	AmpAmc
	Diana monkey 792 cip	<i>C. freundii</i>	<i>qnrB9</i>	sensitive
	upper Guinea red colobus 803 cip	<i>C. freundii</i>	<i>qnrB9 (C), oqxA</i>	Amc
	soothy mangabey 796 fox	<i>C. freundii</i>	<i>bla<sub>EBC</sub></i>	AmpCef
	western chimpanzee 820 cip	<i>C. freundii</i>	<i>qnrB13, oqxA</i>	AmpAmc
	western chimpanzee 833 cip	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrB13 (C), oqxA</i>	AmcCip
	western chimpanzee 809 fox	<i>E. asburiae</i>	<i>bla<sub>CMY</sub></i>	AmpCef
	western chimpanzee 809 cip	<i>C. freundii</i>	<i>qnrB13</i>	AmpAmc
South	western chimpanzee 826 fox	<i>E. asburiae</i>	<i>bla<sub>ACT</sub>, bla<sub>DHA</sub>, bla<sub>CMY</sub></i>	AmpCef
East	western chimpanzee 846 cip	<i>C. freundii</i>	<i>qnrB28</i>	sensitive
	western chimpanzee 849 cip	<i>C. freundii</i>	<i>qnrB13</i>	sensitive

Isolates with suffix “cip” were obtained on MCA-ciprofloxacin, isolates with suffix “fox” were obtained on MCA-cefoxitin.

doi:10.1371/journal.pone.0113548.t004

its spread to other Enterobacteriaceae is associated with the increased use of fluoroquinolones [12]. The genes *qnrB* or *oqxAB* represented a minority within human-originating PMQR. Some of the PMQR isolates were sensitive to clinical levels of fluoroquinolones, as shown by the disc-diffusion method. This is a commonly observed phenomenon and does not decrease the epidemiological significance of PMQR genes in a given ecosystem [11]. As shown by PFGE-based dendrogram (Figure 1), the genes *bla<sub>CTX-M-15</sub>* and *qnrS1* were not spread across the community by one or several clones, but were present in many different clonally unrelated isolates. This fact highlights the epidemiological importance of plasmid-mediated resistance genes, which can cause fast spreading of resistance in a particular area. The PFGE analysis revealed another interesting phenomenon: although dogs and people were sampled three months apart, isolates with identical PFGE profile were revealed in dogs and people living in the same place or in neighbouring villages (Figure 1). This finding corroborates the general presumption that, once established in an ecosystem, resistant bacterial clones can persist for a long time.

All four phylogroups have been detected among the ESBL and PMQR *E. coli* isolates obtained from people and domestic carnivores. While closely related

groups A and B1 are usually regarded as non-pathogenic, more virulence factors are found in *E.coli* isolates of groups B2 and D [47]. Determination of pathogenicity of the investigated samples would undoubtedly be interesting, however it was not possible within the scope this study. The predominance of phylogroup A is in accordance with findings of Carlos et al. [48], who concluded that group A is more prevalent in omnivorous hosts, while group B1 is typical for herbivorous hosts.

### Resistance found in the forest

In TNP the overall prevalence of resistant bacteria in chimpanzees and monkeys was very low and most of it actually could have been attributed to the naturally evolving resistome, especially because the monkeys have never been treated with antibiotics. The only *E. coli* isolates with resistance to more than two antibiotics (however with no ESBL or PMQR genes) within the park were found in two chimpanzees from northern and eastern group, however, none was found in the southern group, that had been recently treated for the respiratory outbreak by benzylpenicillin. Other isolates with resistance were *Citrobacter* or *Enterobacter* isolates with AmpC or *qnr* genes. It should be pointed out that Enterobacters are considered the natural reservoir of AmpC alleles, which are typically localized on their chromosomes and make part of their intrinsic resistance [10]. As such, the AmpC-harboursing *Enterobacter* isolated from wildlife animals can be considered a part of their innate microflora. Likewise, *Citrobacter* sp. is supposed to play the role of natural reservoir and “evolutionary cradle” of *qnrB* alleles [22]. These genes occur on chromosomes (their original function is not known) from where they are often mobilized by insertion sequences to plasmids and later can disseminate to other bacterial species, including human pathogens [49]. The *qnrB*-carrying plasmids are often conjugative, facilitating such spread [22].

### No evidence of MDR-Enterobacteriace transmission from humans to NHPs

The hygiene rules employed by TCP include changing of clothes, washing of hands and boots at hygiene barriers before leaving the camps and entering the forest, prohibition of any defecation in the forest (stool is carried back to camps) and leaving any food or other remains in the forest. This study gave an opportunity to test the efficiency of the rules in place. Despite the presence of multiresistant *E. coli* with the CTX-M-15 beta-lactamase or/and *qnrS1* plasmid-mediated quinolone resistance genes in the villages around TNP, no such isolate was detected in NHPs living in the park. Considering the fact that all assistants working in the forest are residents in the sampled villages and most of the food supplies delivered to the research camps also originate in these villages, our comparison indicates that the hygienic rules employed in TNP are efficient to protect Tai NHPs against acquisition of human-originating MDR-Enterobacteriaceae. Absence of evidence however, is not evidence of absence and

more longitudinal data are necessary to test this case further. It is also worth considering that the microbiota might be host-adapted, so exposure might occur without following colonization. Similar studies were conducted in primates living in Lopé National Park, Gabon [14] and Bwindi Impenetrable National Park, Uganda [16]. Direct transmission of resistant bacteria from human to great apes has not been demonstrated in either case. However, none of these studies investigated the resistance carrying plasmids and therefore they might disregard the aspect of horizontal gene flow between microbial populations.

### Possible transfer of bacteria from wildlife to people

We found *qnrB28*-harboring *Citrobacter freundii* in a chimpanzee, a King colobus, a research camp-dwelling house mouse and also in a dog living in Pauléola, a village very close to the entry to the park. A consumption chain might exist among these animals, because dogs are often used for hunting and are in contact with remnants of meat and organs of wildlife through bushmeat hunting. Handling and consumption of bushmeat represents a risk of transmission of wildlife-originating bacteria (including isolates with naturally evolving resistance genes) also to people, similarly to what was shown before for various retroviruses [50–51].

### Conclusion and Study Limitations

In conclusion, we found no significant overlap between the resistant Enterobacteriaceae in people and animals living around the park and wildlife dwelling in the park. While multiresistant *E. coli* with ESBL genes carried on conjugative plasmids were detected among people and dogs, no such bacteria were found in wildlife within the park. PMQR genes found outside the park were different from those detected in TNP-dwelling wildlife, the only exception represented by *qnrB28* in *Citrobacter freundii*. This study was limited in time and size of the sample set; further sampling and investigation of other resistance genes groups would be necessary to determine the extent of overlap between the commensal microbiota of people and wildlife in the area.

### Acknowledgments

We thank the Ivorian authorities, especially the Ministry of the Environment and Forests as well as the Ministry of Research, the directorship of the Taï National Park, Office Ivoirien des Parcs et Réserves (OIPR) and the Swiss Research Center in Abidjan. We are indebted to all laboratory and field assistants in CI (Roger, Louis, Charlie, Gnimeon and others) as well as in the Czech Republic (Eva, Marie and others) for their excellent cooperation.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KA IP HDN MD MM JK AC FHL IL. Performed the experiments: KA HDN MP EA AM MM SM FHL. Analyzed the data: KA IP MD MM FHL IL. Contributed to the writing of the manuscript: KA IP HDN MP MD MM CHAK RMW JK AC FHL IL. Obtained permissions for sampling: ECH RMW.

## References

1. Galán JC, Gonzáles-Candelas F, Rolain JM, Canton R (2013) Antibiotics as selectors and accelerators of diversity in the mechanisms of resistance: from the resistome to genetic plasticity in the beta-lactamases world. *Front Microbiol* 4: 9.
2. Baquero F (2012) Metagenomic epidemiology: a public health need for the control of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Infect* 18: 67–73.
3. Davies J, Davies D (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 417–430.
4. Novais A, Comas I, Baquero F, Cantón R, Coque TM, et al. (2010) Evolutionary trajectories of beta-lactamase CTX-M-1 cluster enzymes: predicting antibiotic resistance. *PLoS Pathog* 6(1): e1000735.
5. Aarestrup F (Ed) (2008) Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. ASM Press, Washington DC, USA. 443 pp.
6. Bradford P (2001) Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 14: 933–951.
7. Kliebe C, Nies BA, Meyer JJF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B (1985) Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 28: 302–307.
8. Bush K (2010) Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Crit Care* 14: 224.
9. Cantón R, Gonzáles-Alba JM, Galán JC (2012) CTX-M-enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol* 3: 110.
10. Jacoby GA (2009) AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 22: 161–182.
11. Strahilewitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A (2009) Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 22: 664–689.
12. Hernandez A, Sanchez MB, Martinez JL (2011) Quinolone resistance: much more than predicted. *Front Microbiol* 2: 22.
13. Okeke IN, Laxminarayan R, Bhutta ZA, Duse AG, Jenkins P, et al. (2005) Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *Lancet Infect Dis* 5: 481–493.
14. Benavides JA, Godreuil S, Bodenham R, Ratiarison S, Devos C, et al. (2012) No evidence for transmission of antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains from humans to wild western lowland gorillas in Lopé National Park, Gabon. *Appl Environ Microbiol* 78: 4281–7.
15. Pesapane R, Ponder M, Alexander KA (2013) Tracking pathogen transmission at the human-wildlife interface: banded mongoose and *Escherichia coli*. *Ecohealth* 10: 115–28.
16. Rwego IB, Isabirye-Basuta G, Gillespie TR, Goldberg TL (2008) Gastrointestinal bacterial transmission among humans, mountain gorillas, and livestock in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Conserv Biol* 22: 1600–1607.
17. Köndgen S, Kühl H, N’Goran PK, Walsh PD, Schenk S, et al. (2008) Pandemic human viruses cause decline of endangered great apes. *Current Biol* 18: 260–264.
18. Köndgen S, Schenk S, Pauli G, Boesch C, Leendertz FH (2010) Noninvasive monitoring of respiratory viruses in wild chimpanzees. *Ecohealth* 7: 332–41.



19. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, et al. (2010) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 8: 251–259.
20. Guenther S, Ewers C, Wieler LH (2011) Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? *Front Microbiol* 2: 246.
21. Perez F, Rudin SD, Marshall SH, Coakley P, Chen L, et al. (2013) OqxAB, a quinolone and olaquinox efflux pump, is widely distributed among multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates of human origin. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 4602–4603.
22. Jacoby GA, Griffin CM, Hooper DC (2011) *Citrobacter* spp. as a source of *qnrB* alleles. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 4979.
23. Boesch C, Boesch-Achermann H (2000) *The Chimpanzees of the Tai Forest: Behavioural Ecology and Evolution*, Oxford/New York: Oxford University Press.
24. Leendertz FH, Lankester F, Guislain P, Néel C, Drori O, et al. (2006). Anthrax in Western and Central African great apes. *Am j Primatol* 68(9): 928–33.
25. Great Ape Health Monitoring Unit (GAHMU) website, Max-Planck Institute for Evolutionary Anthropology. Available: [http://www.eva.mpg.de/primat/GAHMU/pdf/hygienic\\_and\\_health\\_rules\\_tai\\_national\\_park.pdf](http://www.eva.mpg.de/primat/GAHMU/pdf/hygienic_and_health_rules_tai_national_park.pdf). Accessed 2014 November 11.
26. CLSI (2008) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
27. Literak I, Dolejska M, Radimersky T, Klimes J, Friedman M, et al. (2010) Antimicrobial resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wildboars. *J Appl Microbiol* 108: 1702–1711.
28. Ma L, Ishii Y, Ishiguro M, Matsuzawa H, Yamaguchi K (1998) Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A beta-lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother*. 42: 1181–6.
29. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND (2002) Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40: 2153–2162.
30. Literak I, Micudova M, Tausova D, Cizek A, Dolejska M, et al. (2012) Plasmid-mediated quinolone resistance genes in faecal bacteria from rooks commonly wintering throughout Europe. *Microb Drug Resist* 18: 567–573.
31. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66: 4555–58.
32. Centers for Disease Control (2004) Standardized molecular subtyping of foodborne bacterial pathogens by pulse-field gel electrophoresis. CDC, Atlanta, GA: National Molecular Network for Foodborne Disease Surveillance.
33. Olesen I, Hasman H, Aarestrup FM (2004) Prevalence of beta-lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microb. Drug Resist.* 10: 334–340.
34. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513–1523.
35. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ (1995) A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* 226: 235–240.
36. Caratolli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, et al. (2005) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 63: 219–228.
37. Johnson TJ, Bielak EM, Fortini D, Hansen LH, Hasman H, et al. (2012) Expansion of the Inc X plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant Enterobacteriaceae. *Plasmid* 68: 43–50.
38. Albrechtova K, Dolejska M, Cizek A, Tausova D, Klimes J, et al. (2012) Dogs of nomadic pastoralists in northern Kenya are reservoirs of plasmid-mediated cephalosporin- and quinolone-resistant *Escherichia coli*, including pandemic clone B2-O25-ST131. *Antimicrob Agents Chemother*. 56: 4013–7.
39. Kiiru J, Kariuki S, Goddeeris BM, Butaye P (2012) Analysis of beta-lactamase phenotypes and carriage of selected beta-lactamase genes among *Escherichia coli* strains obtained from Kenyan patients during an 18-year period. *BMC Microbiol* 12: 155.



40. **Isendahl J, Turlej-Rogacka A, Manjuba C, Rodrigues A, Giske CG, et al.** (2012). Faecal Carriage of ESBL-producing *E. coli* and *K. Pneumoniae* in children in Guinea-Bissau: a hospital-based cross-sectional study. *PlosOne* 7: 5e1981.
41. **Lonchel CM, Meex C, Gengoué-Piéboji J, Boreux R, Okomo Assoumou MC, et al.** (2012) Proportion of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in community setting in Ngaoundere, Cameroon. *BMC Infect Dis* 12: 53.
42. **Luvansharav UO, Hirai I, Nakata A, Imura K, Yamauchi K, et al.** (2012) Prevalence and risk factors associated with faecal carriage of CTX-M beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in rural Thai communities. *J Antimicrob Chemother* 67: 1769–1774.
43. **Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P** (2002) Biochemical analysis of ceftazidime-hydrolyzing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J Antimicrob Chemother* 50: 1031–1034.
44. **Kariuki S** (Ed) (2011) Situation Analysis: Antibiotic use and resistance in Kenya. The GARP-Kenya National Working Group, Kenya Medical Research Institute, Nairobi, Kenya, 84 pp.
45. **Cantón R, Ruiz-Garbajosa P** (2011) Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol* 11: 477–485.
46. **Macpherson CNL, Meslin FX, Wandeler AI** (2000) *Dogs, Zoonoses and Public Health*. Wallingford, UK: CABI Publishing.
47. **Li B, Sun JY, Han LZ, Huang XH, Fu Q, et al.** (2010) Phylogenetic groups and pathogenicity island markers in fecal *Escherichia coli* isolates from asymptomatic humans in China. *Appl Environ Microbiol* 76: 6680–700.
48. **Carlos C, Pires MM, Stoppe NC, Hachich EM, Sato MI, et al.** (2010). *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol* 10: 161.
49. **Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, et al.** (2006) *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrobial Agents Chemother* 50: 1178–82.
50. **Calvignac-Spencer S, Leendertz SA, Gillespie TR, Leendertz FH** (2012) Wild great apes as sentinels and sources of infectious disease. *Clin microbial Infect* 18: 521–527.
51. **Ayoub A, Akoua-Koffi C, Calvignac-Spencer S, Esteban A, Locatelli S, et al.** (2013) Evidence for continuing cross-species transmission of SIVsmm to humans: characterization of a new HIV-2 lineage in rural Côte d'Ivoire. *AIDS* 27: 2488–91.



## Příloha 23

JANATOVA, M., ALBRECHTOVA, K., PETRZELKOVA, K. J., DOLEJSKA, M., PAPOUSEK, I., MASARIKOVA, M., CIZEK, A., TODD, A., SHUTT, K., KALOUSOVA, B., PROFOUSOVA, I., MODRY, D., LITERAK, I., 2014, Antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae from humans and wildlife in Dzanga-Sangha Protected Area, Central African Republic: *Veterinary Microbiology*, v. 171, p. 422-431.

### Souhrn

---

Cílem této studie bylo zjistit výskyt rezistentních bakterií v chráněných územích na africkém kontinentu. V oblasti Dzangha-Sangha ve Středoafričské republice byly u lidí a různých druhů volně žijících zvířat včetně habituovaných a nehabituovaných goril izolovány enterobakterie s rezistencí k antibiotikům. V 10-31 % vzorků rektálních výtěrů z lidí byly zjištěny bakterie produkující ESBL nebo nesoucí plazmidově kódovanou rezistenci k fluorochinolonům. U volně žijících zvířat byly bakterie s těmito klinicky významnými mechanismy rezistence prokázány pouze ojediněle.





Contents lists available at ScienceDirect

## Veterinary Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)

## Antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae from humans and wildlife in Dzanga-Sangha Protected Area, Central African Republic



Martina Janatova<sup>a,b,1</sup>, Katerina Albrechtova<sup>a,1,\*</sup>, Klara Judita Petrzelkova<sup>c,d,e,f</sup>,  
 Monika Dolejska<sup>a,g</sup>, Ivo Papousek<sup>a,g</sup>, Martina Masarikova<sup>b,g</sup>, Alois Cizek<sup>b,g</sup>,  
 Anguelique Todd<sup>h</sup>, Kathryn Shutt<sup>i</sup>, Bara Kalousova<sup>f</sup>,  
 Ilona Profousova-Psenkova<sup>f</sup>, David Modry<sup>e,f,g</sup>, Ivan Literak<sup>a,g</sup>

<sup>a</sup> Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1-3, 61242 Brno, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Infectious Diseases and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1-3, 61242 Brno, Czech Republic

<sup>c</sup> Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Kvetna 8, 60365 Brno, Czech Republic

<sup>d</sup> Liberec Zoo, Masarykova 1347/31, 46001 Liberec, Czech Republic

<sup>e</sup> Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Branisovska 31, 37005 Ceske Budejovice, Czech Republic

<sup>f</sup> Department of Pathology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackeho 1-3, 61242 Brno, Czech Republic

<sup>g</sup> CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1-3, 61242 Brno, Czech Republic

<sup>h</sup> WWF, Dzanga Sangha Protected Areas, Bangui, Central African Republic

<sup>i</sup> Department of Anthropology, Durham University, Dawson Building, South Road, Durham, DH1 3LE, United Kingdom

## ARTICLE INFO

## Keywords:

ESBL  
 PMQR  
 Enterobacteriaceae  
 Resistance  
 Gorilla  
 Africa

## ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a worldwide concern of public health. Unfortunately, resistant bacteria are spreading to all ecosystems, including the strictly protected ones. We investigated antimicrobial resistance in gastrointestinal Enterobacteriaceae of wild mammals and people living within Dzanga-Sangha Protected Areas, Central African Republic, with an emphasis on extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes. We compare resistance genes found in microbiota of humans, gorillas habituated and unhabituated to humans and other wildlife. In gorillas, we additionally investigate the presence of ESBL resistant isolates after treatment by ceftiofur. We found a considerable prevalence of multiresistant Enterobacteriaceae isolates with ESBL and PMQR genes in humans (10% and 31%, respectively). Among wildlife the most significant findings were CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in a habituated gorilla and a multiresistant *Escherichia coli* isolate with gene *qepA* in an unhabituated gorilla. Other isolates from wildlife were mostly represented by *qnrB*-harboring *Citrobacter* spp. The relatedness of resistant *E. coli* was investigated in a

Abbreviations: CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute; DDST, double-disc synergy test; DSPA, Dzanga-Sangha Protected Area; ABS-P > ESBL, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase; ABS-P > MCA, MacConkey agar; MLST, multi-locus sequence typing; MIC, minimal inhibitory concentration; PHP, Primate Habituation Program; PMQR, plasmid-mediated quinolone resistance; ST, sequence type.

\* Corresponding author. Tel.: +420 776890848.

E-mail address: [albrechtovakaterina@gmail.com](mailto:albrechtovakaterina@gmail.com) (K. Albrechtova).

<sup>1</sup> First authorship shared.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.014>

0378-1135/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

PFGE-based dendrogram; isolates from gorillas showed less than 80% similarity to each other and less than 80% similarity to human isolates. No ESBL-producing isolates were found in animals treated by ceftiofur. Although we did not detect any bacterial clone common to wildlife and humans, we detected an intersection in the spectrum of resistance genes found in humans and gorillas, represented by *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and *qepA*.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Occurrence of multiresistant bacteria is no longer constrained to sites where antimicrobials are handled on a daily basis, such as hospitals, livestock breeding or pharmaceutical industries. With an increasing frequency, resistant microbiota is found colonizing wildlife or people living in remote areas (Benavides et al., 2012; Pallecchi et al., 2012). Antimicrobial resistance is of particular concern on the African continent, where occurrence of bacterial infections is relatively high. Warm and humid climate in the continent makes favorable conditions for the persistence of environmental bacterial contamination and many countries lack regulations on antimicrobial prescription and use (Okeke et al., 2005).

Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL), plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase (AmpC) and plasmid-mediated quinolone (PMQR) resistance genes rank among the most important and widespread mechanisms of antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in recent years, rendering resistance to the vast majority of cephalosporins and fluoroquinolones, respectively (Livermore, 2012). ESBL-, AmpC- and PMQR-encoding genes are found on various types of plasmids, often together in combinations and surrounded by genes of resistance to other groups of antimicrobials such as tetracyclines, aminoglycosides, and sulphonamides. Such plasmids are often conjugative to other bacteria and can therefore spread across different bacterial species, from commensals to pathogens and *vice versa* (Livermore, 2012).

Human-originating resistant microbiota can be introduced to natural ecosystems not only by people who visit them, but also indirectly by water or wild birds (Guenther et al., 2011). Several studies have documented the occurrence of resistant or multiresistant bacteria in wildlife kept in zoos or sanctuaries (Schaumburg et al., 2012; Dobiasova et al., 2013), but less is known about animals living in nature reserves and protected areas (Benavides et al., 2012; Rwego et al., 2008). Antimicrobial-resistant microbiota in wildlife in protected areas represents an intriguing topic for eco-epidemiology for at least three reasons. Firstly, certain resistant bacteria can serve as indicators of human-originating bacterial contamination of the environment and bacterial transmission from humans to wildlife and *vice versa* (Rwego et al., 2008; Benavides et al., 2012). Secondly, the knowledge of local and host-specific resistance patterns can enhance our preparedness for a population-saving veterinary intervention in case of epidemics. And lastly, wild animals could represent a reservoir of naturally evolving resistance genes, carried by bacteria which are transferable to humans.

In this study we investigate antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae found in wild mammals and people inhabiting Dzanga-Sangha Protected Areas (DSPA) in Central African Republic. Special emphasis is given to the population of western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*), which are a focus of conservation efforts in this area. We studied several groups of gorillas at different levels of habituation including a fully habituated group which is in daily contact with humans. Our aim was to compare the genetic background of resistant Enterobacteriaceae bacteria found in people living in DSPA, gorillas in different levels of habituation to people and other wild mammals. Additionally, we tested isolates obtained from gorillas 5 months after treatment by ceftiofur, to check for presence of ESBL.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study area and animals

DSPA incorporates the strictly protected Dzanga Ndoki National Park (1222 km<sup>2</sup>) and the Dzanga Sangha Dense Forest Special Reserve (3159 km<sup>2</sup>). The access of people to the National Park (NP) is limited; there are no permanent inhabitants, however there is continuous presence of researchers and their assistants, local gorilla trackers and ecoguards, especially in the surroundings of research camps (Fig. 1). Tourists can visit the NP, but they do not stay overnight. The Special Reserve is a multiple-use zone with permanent residents. Human activities such as fishing, gathering, hunting and logging are controlled in the Special Reserve. DSPA was created in 1990; the area was selectively logged (including the areas of NP) in 1970s and 1980s.

High densities of western lowland gorillas have been reported in DSPA while densities of central chimpanzees (*Pan troglodytes troglodytes*) in this area are low (Blom et al., 2001). A program of habituation of gorillas to humans has been launched in the area in 1997 and currently there are animals at three different levels of habituation; habituated, unhabituated and animals under habituation. While habituated animals are followed on a daily basis, animals under habituation are approached only several times per month and unhabituated individuals are encountered only accidentally (Sak et al., 2013).

### 2.2. Sampling

We sampled animals in Dzanga Sector of the Dzanga Ndoki NP nearby the permanent research camps Bai Hokou and Mongambe (Fig. 1) between June 2011 and September 2011. We obtained faecal samples from 63 western

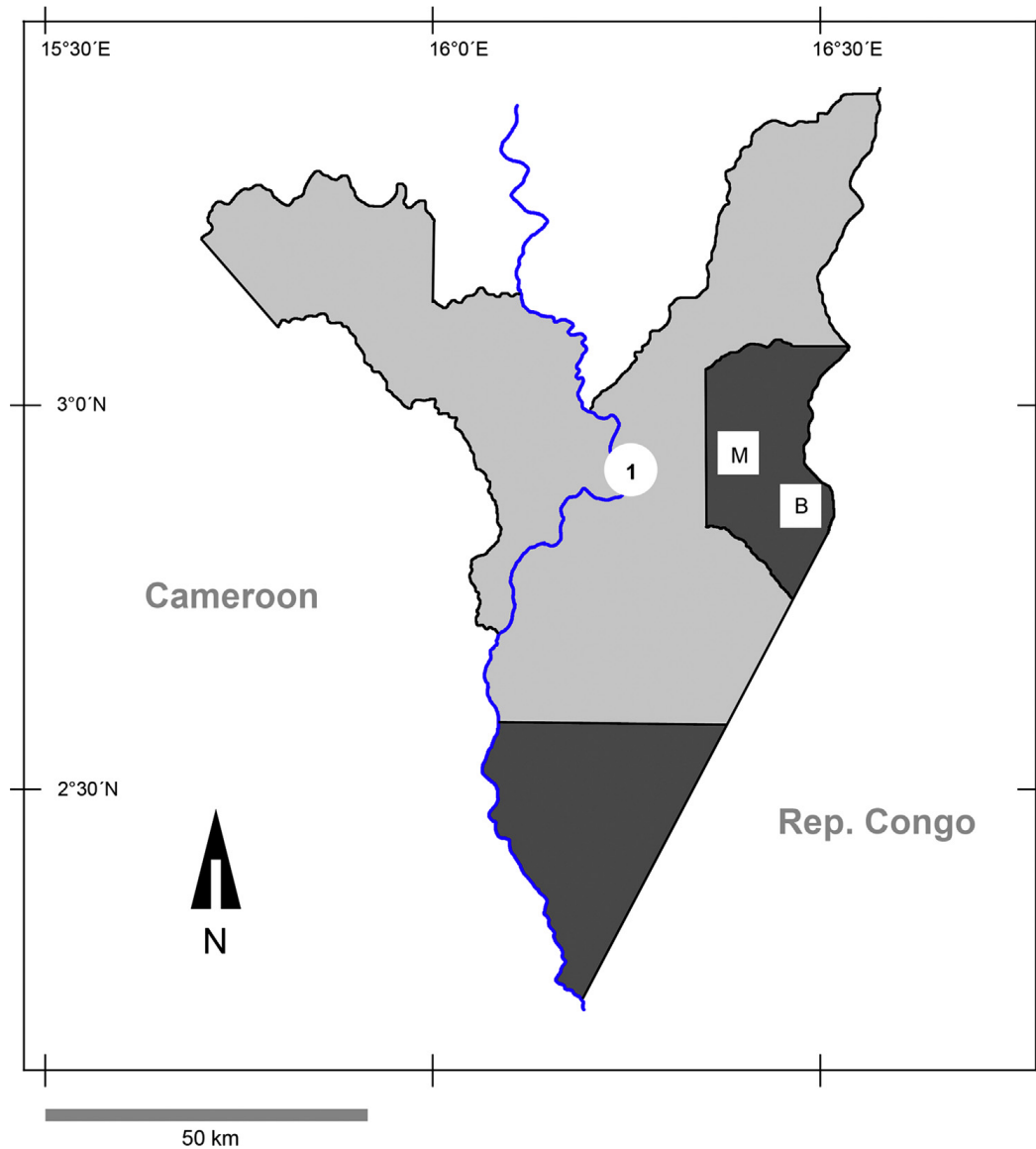


Fig. 1. Map of study site in Dzanga-Sangha Protected Areas, Central African Republic. Dark grey – Dzanga and Ndoki Sectors of the protected Dzanga Ndoki National Park; light grey – Dzanga Sangha Dense Forest Special Reserve; 1 – location of villages Bayanga, Mossapoula and Yandumbé; M – research camp Mongambe; B – research camp Bai Hokou.

lowland gorillas with different levels of human contact, namely from two fully habituated gorilla groups Makumba and Mayele (24 samples in total), two groups under habituation ( $n = 12$  individuals) and several unhabituated groups ( $n = 22$  individuals). Members of Makumba group can be individually recognized, so individual samples were taken during follows. The remaining gorilla samples were collected from night nests (one sample per nest, representing one individual). Samples from other animals were collected from faeces accidentally encountered in the forest during following gorilla groups and species identification was based on typical dung morphology, consulting experienced trackers. We also collected fecal samples from nine habituated agile mangabeys (*Cercocebus agilis*), seven unhabituated central chimpanzees, four African buffalos (*Syncerus caffer*), four forest elephants (*Loxodonta cyclotis*), two red river hogs (*Potamochoerus porcus*), two Peter's duikers (*Cephalophus callipygus*), two lowland bongos

(*Tragelaphus eurycerus eurycerus*), two sitatunga (*Tragelaphus spekeii*), and two blue duikers (*Philantomba monticola*). Swabs were made from the central part of fresh faeces to avoid potential effects of contamination from the environment. The swab was immediately stored in Amies medium (Oxoid, UK).

An additional collection of gorilla samples was made 1 year later to check for ESBL and other resistance determinants in members of habituated Makumba group, who received antibiotic treatment. In March 2012, there was an aggressive outbreak of respiratory disease in eight out of nine members of the Makumba group. All symptomatic individuals (excepting one infant) were treated by a single shot of long-acting ceftiofur formulation (Excede(R), Pfizer Inc., NY, approx. 7 mg/kg injected intramuscularly). In August 2012 individuals of Makumba group were re-sampled (two samples per animal, 2–7 days apart).

Human samples were obtained during regular health checks from local inhabitants; the PHP employees who follow the gorillas (trackers and assistants,  $n = 16$ ) and their family members residing in the Special Reserve villages Bayanga, Yandoumbé and Mossapoula ( $n = 14$ ; Fig. 1). Two European researchers working with the gorillas also provided samples. Faecal samples were taken individually with cotton swabs and put into Eppendorf tubes with Amies transport medium (Oxoid, UK) and were transported to the laboratory at the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic for analysis.

All sample collection was conducted according to the Convention on Human Rights and Biomedicine of the Council of Europe and Directive 86/609/EEC on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Prior permission to examine stool samples was obtained from all examined persons. The study was approved by local authorities and the Ethical Committee of Durham University, UK (K.S.); importation of the samples to the EU was approved by the State Veterinary Authority of the Czech Republic.

### 2.3. Microbiological techniques and molecular typing of isolates and resistance genes

To select for lactose-fermenting gram-negative bacteria (i.e. Enterobacteriaceae) each swab was plated in parallel on plain MacConkey agar (MCA) (Oxoid, UK), MCA with cefotaxime (2 mg/l) and MCA with ciprofloxacin (0.05 mg/l). ESBL genes were expected in colonies cultivated on MCA with cefotaxime and PMQR genes were expected in isolates obtained on MCA with low concentration of ciprofloxacin. One randomly selected lactose-fermenting colony was isolated from each plate, so that up to three colonies were obtained from each sample (those originating from MCA without antibiotics are assigned with “n”, from MCA with ciprofloxacin are assigned “cip” and from MCA with cefotaxime are assigned with “ctx”). Within the selected isolates, all originating from MCA with cefotaxime were tested by the double-disc synergy test (DDST) for production of ESBL (CLSI, 2008) and if positive, they were tested by PCR for ESBL-encoding genes ( $bla_{TEM}$ ,  $bla_{CTX-M}$ ,  $bla_{SHV}$ ,  $bla_{OXA}$ ) as described previously (Literak et al., 2010; Dobiasova et al., 2013). In isolates grown on MCA with cefotaxime but negative in the DDST, plasmid-mediated genes for AmpC  $\beta$ -lactamases were looked for by multiplex PCR as described elsewhere (Pérez-Pérez and Hanson, 2002). PMQR genes ( $aac(6')-Ib-cr$ ,  $qepA$ ,  $qnrA$ ,  $qnrB$ ,  $qnrC$ ,  $qnrD$ ,  $qnrS$  and  $oqxAB$ ) were searched for by PCR (Literak et al., 2012) in isolates obtained on MCA with ciprofloxacin. PMQR and ESBL genes were sequenced to specify the type of allele. Where  $qnrB$  alleles were detected, forward primer psp2 was used in combination with reverse primers sc3, ds2 and ds3 as described by Jacoby et al. (2011), to explore their genetic environment. Insertion sequences flanking the  $qnrB$  and  $oqxA$  genes, specifically ISCR1, ISEcp1 and IS26, were searched for by PCR as described previously (Jacoby et al., 2011; Norman et al., 2008; Zhao et al., 2010).

One isolate per sample grown on MCA without antibiotic and all isolates positive for ESBL, AmpC or

PMQR genes were tested by disc-diffusion method (CLSI, 2008) for susceptibility to ampicillin (10  $\mu$ g), cephalotin (30  $\mu$ g), amoxicillin-clavulanic acid (20 + 10  $\mu$ g), ceftazidime (30  $\mu$ g), trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25 + 23.75  $\mu$ g), sulphonamides compounds (300  $\mu$ g), gentamicin (10  $\mu$ g), nalidixic acid (30  $\mu$ g), ciprofloxacin (5  $\mu$ g), streptomycin (30  $\mu$ g), tetracycline (30  $\mu$ g) and chloramphenicol (30  $\mu$ g). According to their resistance phenotypes, isolates were tested for additional antimicrobial-resistance genes and integrons (Literak et al., 2010; Machado et al., 2005). Isolates with PMQR genes were tested for minimal inhibitory concentration of nalidixic acid and ciprofloxacin by agar-dilution method (CLSI, 2008). All isolates with resistance were identified to species level by Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI; Microflex LT, Bruker Daltonics, Brehmen, Germany). *Escherichia coli* isolates were tested for their phylogroup by multiplex PCR and sequence type by multi-locus sequence typing (MLST) (Wirth et al., 2006). The sequence types of *Klebsiella pneumoniae* were examined by MLST (Diancourt et al., 2005). All the ESBL-, AmpC- or PMQR- positive isolates were typed by XbaI pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (CDC, 2004). The profiles obtained were analyzed using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) in Bionumerics 6.6 software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Cluster analysis of the Dice similarity indices was conducted to generate a dendrogram describing the relationships among PFGE profiles. The profiles were considered related when having more than 85% similarity (Goering et al., 2010).

### 2.4. Transferability of resistance genes and plasmid characterization

Conjugation transfer of ESBL and PMQR genes was carried out using plasmid-free, rifampin- and azid-resistant *E. coli* MT102RN and *Salmonella* Typhimurium SL5325 (Olesen et al., 2004). Plasmid DNA was extracted by rapid alkaline method (Birnboim and Doly, 1979) and introduced into competent *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen, USA) by chemical transformation. Transformants were selected on Luria-Bertani agar (LB; Difco, USA) supplemented with 2 mg/l cefotaxime or LB with 0.05 mg/l ciprofloxacin, according to the genes of donor. Isolates in which conjugation or chemical transformation was not successful were tested by electrotransformation, using the ECM 399 electro cell manipulator according to the manufacturer's instructions (BTX Harvard Apparatus, Holliston, MA). Presence of resistance genes in transformants/transconjugants was tested by PCR as stated above. Transformants and transconjugants were tested for the number of plasmids acquired and their size using S1-PFGE (Barton et al., 1995).

## 3. Results

### 3.1. Antimicrobial resistance and plasmid-mediated resistance genes in Enterobacteriaceae in humans and wildlife

By isolation on MCA without antibiotics a total of 121 lactose-fermenting colonies were obtained. Resistance to



2–8 antimicrobials and the presence of relevant plasmid-mediated antimicrobial-resistance genes and integrons were found in 16 isolates ( $n = 9$  humans,  $n = 6$  gorillas and  $n = 1$  forest elephant). Selective isolation on media with ciprofloxacin resulted in 33 isolates with decreased susceptibility to fluoroquinolones ( $n = 19$  humans,  $n = 7$  gorillas and  $n = 7$  other wildlife); of these, 20 harbored PMQR genes. A wide spectrum of PMQR genes (*qnrS*, *qnrB*, *qepA*, *oqxA*, *oqxB*, *aac(6′)-Ib-cr*) was found in 13 humans and seven wild mammals (Table 2). The genes *qnrS1* and *oqx* (*oqxA* or *oqxB*) were predominant and identified in six isolates of *E. coli*, *K. pneumoniae* and *Enterobacter kobei*. Different variants of *qnrB* gene were identified mainly in *Citrobacter* spp. All isolates harboring gene *qnrB* were tested negative in PCR for insertion sequences *ISCR1* and *ISEcp1*. Isolates possessing *oqxA* were tested negative for *ISEcp1*. IS26 was found in only one isolate (36-cip), but subsequent PCR with IS265′ forward primer and *oqxA*-reverse primer was negative.

Five ESBL-producing isolates were obtained on plates with cefotaxime ( $n = 2$  in wildlife,  $n = 2$  in people; Table 1). Four ESBL-producing isolates, identified as *E. coli* or *K. pneumoniae*, harbored *bla*<sub>CTX-M-15</sub> along with other  $\beta$ -lactam resistance genes (*bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>SHV-2a</sub>, *bla*<sub>SHV-62</sub>; Table 2). One isolate of *Kluyvera ascorbata* was found to harbor a CTX-M-2 variant of ESBL (*bla*<sub>KLU</sub>) gene. No plasmid-mediated gene of AmpC type was detected in any of the resistant isolates.

### 3.2. Comparison of plasmid-mediated resistance genes in people and wildlife and in gorillas under different level of habituation

Plasmid-mediated ESBL gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> was detected in *E. coli* originating from humans (villager and researcher) and *K. pneumoniae* originating from one tracker and a gorilla under habituation (Table 2). Plasmid-mediated gene *qnrS1* was detected in *E. coli* originating from six

trackers, but none was detected in wildlife. Different variants of genes *qnrB* were detected in *E. coli* from one villager (*qnrB1*), in *Citrobacter freundii* from a habituated gorilla (*qnrB33*) and in *C. freundii* from a sitatunga (*qnrB17*). Another isolate of *C. freundii*, originating from a mangabey, was found to have gene *qnrB28*, but location of the gene on plasmid could not be stated since the transformation and conjugation experiments with these isolates were not successful. The gene *qepA* was detected in *E. coli* from a nonhabituated gorilla and in two *E. coli* isolates from two villagers. While the PFGE profiles of the *qepA*-harboring isolates from villagers were identical, the profile of the *qepA*-harboring *E. coli* isolate originating from gorilla was unrelated to them (less than 80% similarity). Genes *bla*<sub>TEM1</sub>, *tet(A)*, *tet(B)*, *sul1*, *sul2*, *strA*, *catA1* and integrons with variable gene contents were found in Enterobacteriaceae originating from people, habituated, non-habituated and under-habituation gorillas as well as in isolates from other wildlife (Table 2). CTX-M-15-producing *K. pneumoniae* was found in a gorilla under habituation as well as in one tracker. These isolates represented different sequence types and their PFGE profiles were unrelated.

### 3.3. Clonal relatedness of resistant *E. coli* from people and wildlife

XbaI-PFGE-derived clonal analysis was performed on 14 antimicrobial-resistant isolates of *E. coli* harbored by people and gorillas (Fig. 2). High variability in XbaI-macrorestriction profiles of the isolates was demonstrated. Ten human isolates grouped in seven different PFGE clusters. Identical or closely related isolates were found in humans. Four *E. coli* isolates from gorillas showed less than 80% similarity to each other and less than 80% similarity to the human isolates. XbaI-PFGE profiles of samples 45-cip, 51-cip, 125-cip and 109-n were not considered for clonal analysis because they resulted in fuzzy smears.

**Table 1**

Occurrence of ESBL, PMQR and other resistance genes in different hosts.

Host	Swabs examined	PMQR <sup>**</sup> -harboring isolates	ESBL-producing isolates	Samples with other genes of resistance
Unhabituated gorillas	22	1	0	3
Gorillas under habituation	12	0	1	0
Habituated gorillas	24	2	1	3
Habituated gorillas after antibiotic treatment	14 <sup>*</sup>	0	0	3
Agile mangabeys	9	1	0	0
Chimpanzees	7	0	0	0
African buffalos	4	2	0	0
Forest elephants	4	0	0	1
Red River hogs	2	0	0	0
Peter's duikers	2	1	0	0
Lowland bongos	1	0	0	0
Sitatunga	1	1	0	0
Blue duiker	1	0	0	0
PHP employees (trackers, assistants)	16	10	0	4
Villagers (Bayanga, Yandounmbé, Mossapoula)	14	2	1	3
Researchers coming from Europe	2	0	1	1

\* Repetitive sampling occurred in this subset; two samples were obtained from each individual.

\*\* Includes also isolated where PMQR genes were present, but their localization on plasmid was not determined; specifically one isolate of *C. freundii* (102-cip), where the gene *qnrB28* might be chromosomally mediated and two isolates of *E. coli* (51-cip and 125-cip) where genes *oqxA* and *oqxB*, respectively, might be chromosomally mediated.

**Table 2**

Resistance phenotypes and genotypes of characterized isolates. Amp – ampicillin, Cef – cephalotin, Amc – amoxicilin-clavulanic acid, Caz – ceftazidime, Sul – sulphonamides compounds, Str – streptomycin, Sxt – trimethoprim-sulphonamide, Tet – tetracycline, Chl – chloramphenicol, Gen – gentamicin, Cip – ciprofloxacin, Nal – nalidixic acid. MIC is in mg/l, plasmid size is in kb. "int1" means presence of integron (gene cassettes are in brackets), "int1" means presence of integrase gene only (not the presence of an integron). In the last column, plasmids assigned with asterisk were conjugative.

Isolation agar plate	Bacterial species (biotype and sequence type in <i>E. coli</i> )	Resistance phenotype (MIC for ciprofloxacin and nalidixic acid)	Resistance genes (PMQR and ESBL in bold)	Size of plasmids detected in transformation/conjugation experiments
<b>Isolates obtained on MCA with ciprofloxacin</b>				
Habituated gorilla (70-cip)	<i>C. freundii</i>	AmpCefCip(0,06)Nal(32)	<i>qnrB33</i>	100* and 20*
Sitatunga (89-cip)	<i>C. freundii</i>	AmpSulStrSxtTetChlCip(0,06)Nal(256)	<i>qnrB17, sul2, tet(B), catA1, int1</i>	120* and 90*
Agile mangabey (102-cip)	<i>C. freundii</i>	CefAmcCip(0,06)Nal(16)	<i>qnrB28</i>	–
African buffalo (91-cip)	<i>K. pneumoniae</i> (ST 1209)	AmpAmcCip(0,03)Nal(64)	<i>oqxA, int1</i>	–
Peter's duiker (115-cip)	<i>K. pneumoniae</i> (ST 1210)	Cip(0,06)Nal(16)	<i>oqxA, int1 (dfrA17-aadA5)</i>	–
African buffalo (81-cip)	<i>K. pneumoniae</i> (ST 1208)	AmpCip(0,06)Nal(256)	<i>oqxA</i>	–
Unhabituated gorilla (19-cip)	<i>E. coli</i> (B1, ST 424)	AmpCefSulStrSxtTetCip(>8)Nal(>256)	<i>qepA, strA, sul1, sul2, tet(A), int1 (dfr12-orf-aadA2)</i>	–
Tracker (123-cip)	<i>E. kobei</i>	AmpCefAmcSulStrSxtTetChlGenCip(0,06)Nal(32)	<i>qnrS1, oqxA, bla<sub>TEM-1</sub>, aadA1, sul1, tet(A), int1</i>	20* and 100*
Tracker (129-cip)	<i>Enterobacter asburiae</i>	AmpCefAmcSulStrSxtTet	<i>qnrS1, bla<sub>TEM-1</sub>, strA-B, sul2, tet(A), int1</i>	20* and 160*
Villager (36-cip)	<i>K. pneumoniae</i> (ST 1234)	AmpSulStrSxtTetChlCip(1)Nal(> 256)	<i>oqxA, strA, sul1, sul2, tet(D), int1</i>	–
Tracker (124-cip)	<i>K. pneumoniae</i> (ST 20)	AmpTetCip(>8)Nal(>256)	<i>oqxB, bla<sub>TEM-1</sub>, aadA1, sul1, sul2, tet(A), tet(B), int1, int2</i>	–
Tracker (37-cip)	<i>E. coli</i> (A, ST 3476)	AmpStrSulTetCip(0,5)Nal(>256)	<i>qnrS1, sul2, sul3, tet(A), int1</i>	90* and 100*
Tracker (47-cip)	<i>E. coli</i> (A, ST 3476)	AmpSulSxtTetCip(4)Nal(>256)	<i>qnrS1, sul3, tet(A), int1</i>	15* and 130*
Tracker (49-cip)	<i>E. coli</i> (A, ST 3476)	AmpCefSulStrSxtTetCip(0,5)Nal(>256)	<i>qnrS1, bla<sub>TEM-1</sub>, sul2, sul3, tet(A), int1</i>	15* and 130*
Tracker (56-cip)	<i>E. coli</i> (A, ST 3476)	AmpSulSxtTetCip(4)Nal(>256)	<i>qnrS1, sul2, sul3, tet(A), tet(B), int1 (dfrA7)</i>	40 and 160
Villager (44-cip)	<i>E. coli</i> (A, ST 156)	AmpCefSulSxtCip(>8)Nal(>256)	<i>qepA, bla<sub>TEM-1</sub>, sul1, sul2, int1 (dfr12-orf-aadA2)</i>	–
Villager (45-cip)	<i>E. coli</i> (A, ST 156)	AmpCefSulSxtTetCip(>8)Nal(>256)	<i>qepA, bla<sub>TEM-1</sub>, sul1, sul2, sul3, tet(A), tet(B), catA1, int1 (dfrA7)</i>	–
Villager (51-cip)	<i>E. coli</i> (B1, ST 156)	AmpSulSxtTetCamCip(>8)Nal(>256)	<i>qepA, bla<sub>TEM-1</sub>, sul1, sul2, tet(B), catA1, int1 (dfr12-orf-aadA2)</i>	–
Tracker (125-cip)	<i>E. coli</i> (B1, ST 69)	AmpSulStrSxtTetCip(0,06)Nal(128)	<i>oqxB, strA-B, aadA5, sul1, sul1, int12 (dfr1-sat-aadA1)</i>	–
<b>Isolates obtained on MCA with cefotaxime</b>				
Villager (40-ctx/cip)	<i>E. coli</i> (A, ST 218)	AmpCefAmcSulStrSxtTetChlCip(0,15)Nal(32)	<i>qnrB1, aac(6')Ib-cr, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>TEM-1</sub>, bla<sub>OXA-1</sub>, strA, sul2, sul3, tet(A), catA1, int1 (aadA1)</i>	20*, 85* and 300
Researcher (59-ctx)	<i>E. coli</i> (A, ST 148)	AmpCefSulStrTetChl	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>TEM-1</sub>, strA, sul1, sul2, sul3, tet(B), catA1, int1</i>	15*, 95* and 330*
Tracker (129-ctx)	<i>K. pneumoniae</i> (ST 1212)	AmpCefAmcCazSulStrSxtTetChl	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>SHV-2a</sub>, aadA1, sul1, tet(A), int1 (dfrA17-aadA5)</i>	80* and 140*
Habituated gorilla (64-ctx)	<i>K. ascorbata</i>	AmpCefAmcSulStr	<i>bla<sub>CTX-M</sub> variant2, sul1, sul2, strA-B</i>	–
Gorilla under habituation (95-ctx)	<i>K. pneumoniae</i> (ST1211)	AmpCefAmcCazSulTetGen	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>SHV-62</sub>, bla<sub>TEM-1</sub>, sul1, sul2, tet(A), int1 (aadA1)</i>	70, 130*, 310* and 340*
<b>Isolates obtained on MCA with no antibiotic</b>				
Unhabituated gorilla (18-n)	<i>E. coli</i> (B2, ST 538)	AmpTet	<i>tet(B)</i>	–
Habituated gorilla (66-n)	<i>E. coli</i> (B2, ST 3840)	AmpCefTet	<i>tet(B)</i>	–
Unhabituated gorilla (73-n)	<i>C. freundii</i>	AmpAmc	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	–
Forest elephant (86-n)	<i>K. pneumoniae</i>	Amp	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	–
Gorilla under habituation (95-n)	<i>E. coli</i> (B2, ST155)	AmpTet	<i>bla<sub>TEM-1</sub>, tet(A), tet(B), int1</i>	–
Unhabituated gorilla (109-n)	<i>E. coli</i> (B2, ST 3654)	AmpCefSulStrSxtTet	<i>bla<sub>TEM-1</sub>, strA, sul1, sul2, tet(A), tet(B), int1 (dfrA7)</i>	–
Tracker (38-n)	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	AmpSulSxtTet	<i>bla<sub>TEM-1</sub>, sul2, tet(A), tet(B), int1</i>	–
Villager (42-n)	<i>E. coli</i> (B2, ST 10)	TetNal	<i>tet(A), tet(B), int1</i>	–
Villager (53-n)	<i>E. coli</i> (B2, ST 101)	AmpTet	<i>bla<sub>TEM-1</sub>, tet(A), tet(B), int1 (aadA1)</i>	–
Villager (54-n)	<i>E. coli</i> (B2; ST 209)	AmpCefSulStrSxtTetChlNal	<i>bla<sub>TEM-1</sub>, strA, sul1, sul2, tet(A), tet(B), catA1, int1 (dfrA7)</i>	–
Researcher (59-n)	<i>K. pneumoniae</i>	AmpCefSulSxtTetChl	<i>sul1, tet(A), int1 (dfrA17-aadA5)</i>	–
<b>2012 re-sampling</b>				
Habituated gorilla	<i>E. coli</i>	SulSxt	–	–
Habituated gorilla	<i>E. coli</i>	Sul	–	–
Habituated gorilla	<i>E. coli</i>	AmpAmcCef	–	–

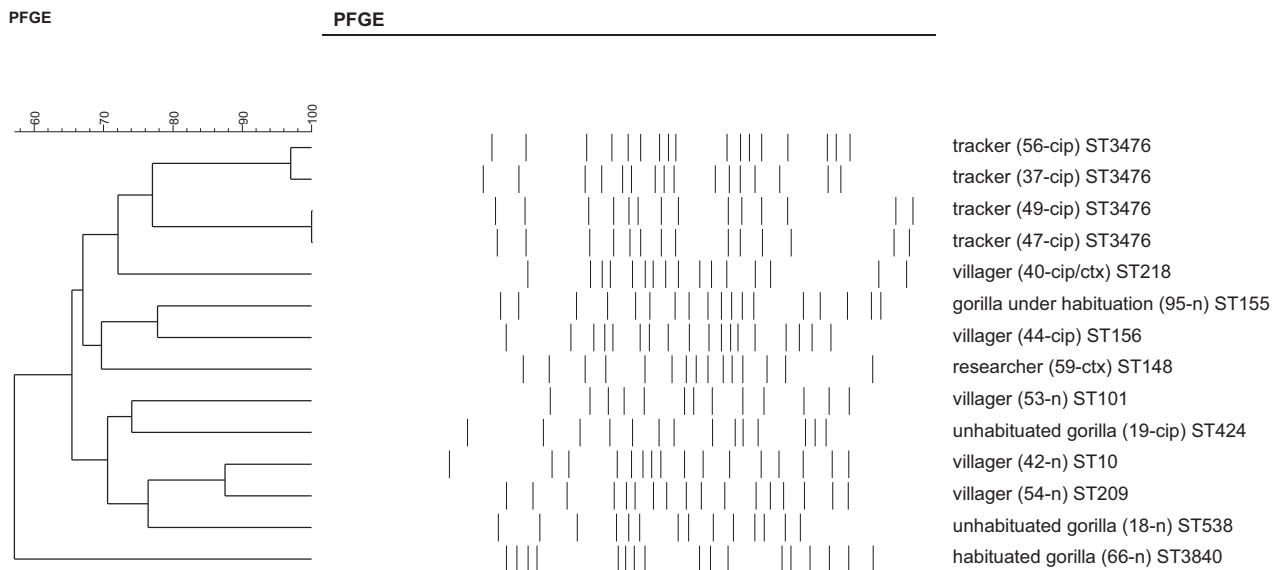


Fig. 2. Dendrogram of resistant *E. coli* isolates' Xba-I-PFGE profiles. Generated by cluster analysis of the Dice similarity indices in the BioNumerics fingerprinting software (optimization 1%, band matching tolerance 1%, tolerance change 1%). Isolates 45-cip, 51-cip, 125-cip and 109-n were not considered for the analysis because they (repeatedly) did not provide a clear macrorestriction profile when digested by XbaI.

The sequence types of *E. coli* and *K. pneumoniae* were also highly variable. ST 3654 and ST 3476 *E. coli*, detected in one gorilla and four people, respectively, were new in the MLST database at the ERI, University College Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/>) and did not belong to a known ST complex. Of seven *K. pneumoniae* isolates found in the area, one human-originating isolate was ST20 and the other six represented sequence types new to the database of Pasteur Institute, Paris (<http://pasteur.fr/mlst>). There were no ST of *E. coli* or *K. pneumoniae* shared by people and animals.

### 3.4. Plasmid characteristics and plasmid mobility

Transconjugants were obtained from isolates harboring genes *qnrB33* (*C. freundii* from a habituated gorilla), *qnrB1* (*E. coli*, human origin), *qnrS1* (*E. coli* and *K. pneumoniae* human origin) and *bla<sub>CTX-M-15</sub>* (*E. coli* and *K. pneumoniae*; human and gorilla origin). Transformants to *E. coli* MT102RN and *Salmonella* Typhimurium SL5325 were obtained from *qnrS1*- and *bla<sub>CTX-M-15</sub>*-harboring isolates of human origin. Plasmid sizes detected in transformants and transconjugants are summarized in Table 2. Neither transformation nor electrotransformation or conjugation was successful in isolates with genes *oqxA* or *oqxB*. Transformation experiments were also unsuccessful in the case of CTX-M-2 (KLU), harbored by *K. ascorbata*.

## 4. Discussion

### 4.1. Antimicrobial resistance in DSPA and relatedness of resistant isolates from animals and humans

Antimicrobial-resistance genes present in gene-transfer platforms are regarded as human-originating pollutants and nobody is certain about their complex effect on natural microbiosphere (Martinez, 2009). Multiresistant

bacteria are known to occur in African rural communities (Albrechtova et al., 2012; Bercion et al., 2009), but less is known about their expansion from community to wildlife. This study brings first data on resistance in microbiota of wildlife occurring in strictly protected in Dzanga Ndoki NP and compares them with data obtained from people residing in the adjacent Dzangha-Sangha Special Dense Forest Reserve, but temporarily entering the Park. Resistance to quinolones and  $\beta$ -lactams was detected both in people- and wildlife- originating microbiota and in some cases it had identical genetic background.

At first we analyzed genomic DNA of the resistant *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates found in people and wildlife, to check for possible presence of a clone shared by the two groups of hosts. The variability of PFGE profiles and sequence types of investigated isolates was high (Fig. 2). We found no ST of *E. coli* or *K. pneumoniae* present in both humans and animals. According to their PFGE profiles, the human- and gorilla- originating *E. coli* isolates were less than 85% similar, meaning that they are epidemiologically unrelated (Goering, 2010). The only highly similar PFGE profiles and identical sequence types were found in isolates originating from humans. We could conclude that in frame of our sample set we did not detect any multiresistant clone transmitted between people and wildlife. However, since we know that horizontal transfer of resistance genes is independent of clonal bacterial spread, it was important to thoroughly investigate the genetic background of the resistant isolates.

Epidemiological significance of the resistance genes found varies with respect to the bacterial species, to their plasmid or chromosome location and the genetic environment of the genes. All the investigated isolates belong to commensal intestinal microbiota of mammals, however all of them can also act as opportunistic pathogens in extra-intestinal locations, especially in immune-compromised hosts.

#### 4.2. PMQR genes

The finding of *qepA*-harboring *E. coli* in an unhabituated gorilla was probably the most significant among PMQR genes findings. A human or livestock origin of the gorilla isolate is very likely, since *qepA*-carrying multiresistant plasmids are known mostly to occur under selective antimicrobial pressure (Strahilewitz et al., 2009). Supportive to this assumption is the finding of two *E. coli* isolates with *qepA* in people living in investigated villages.

As for the occurrence of *qnr*- genes, there was no apparent overlap between animals and humans; whilst *qnrB* was found in *C. freundii* of wild mammal origin, *qnrS* was predominant in the human-originating isolates of *E. coli*. The finding of *C. freundii* with different variants of *qnrB* is probably an example of naturally occurring resistance, independent of antimicrobial pressure or introduction of human bacteria into the forest. *C. freundii* is presumed to be the evolutionary origin of *qnrB* alleles, most of which are actually chromosomally mediated, but can be mobilized on plasmids in the presence of specific insertion sequences (Jacoby et al., 2011). At the same time it was suggested (Ewers et al., 2011) that animals including wildlife can act as reservoirs of resistant *Citrobacter* spp. Up to date more than 70 variants of the *qnrB* gene have been described (<http://www.lahey.org/qnrStudies/>). Wildlife could actually represent one of the reservoirs of these rapidly evolving resistance genes.

Another group of PMQR genes, *oqxA* and *oqxB*, was found in wildlife and humans in our study. *OqxAB* gene cassette encodes a multidrug efflux-pump of RND family (Hansen et al., 2004). This gene complex has probably evolved in *K. pneumoniae*, where it occurs on chromosomes (Norman et al., 2008) and recently was mobilized to plasmids of pOLA52 type which contributed towards its pandemic horizontal spread across populations of *E. coli* (Hansen et al., 2004). None of our isolates had the complex of both *oqxA* and *oqxB*; we detected *oqxA* alone in isolates of *Klebsiella* and *oqxB* alone in isolates of *E. coli*. Due to the absence of any typical surrounding insertion sequences (namely IS26 or ISEcp1; Norman et al., 2008) and the failure in all attempts to gain transformants or transconjugants we concluded that *oqxA* was located on chromosomes in *Klebsiella* isolates. Chromosomal *oqxA* in *Klebsiella* probably represents an intrinsic system of resistance (Fouts et al., 2008) and as such it cannot serve as a marker of selective antimicrobial pressure or human-originating environmental contamination.

#### 4.3. ESBL genes

We detected five ESBL-producing isolates; two in human-originating *E. coli*, one in human-originating *Klebsiella* and two in *Klebsiella* and *Kluyvera* from gorillas (Table 2). *Kluyvera* sp. is one of the natural sources of CTX-M enzymes, designated KLUA in *K. ascorbata* (Bonnet, 2004). We assume that the *bla*<sub>KLUA</sub> gene in *Kluyvera* was chromosome-mediated and can be considered as part of a naturally evolving resistance. However, the occurrence of ESBL-producing *K. pneumoniae* is significant; such a finding can be regarded as an indicator of bacterial spill-overs from

human-influenced settings. The *bla*<sub>CTX-M-15</sub> is probably the most widespread type of ESBL across the globe and it is the most prevalent ESBL gene in humans (Cantón et al., 2012).

#### 4.4. Resistance rates in habituated and non-habituated gorillas and after treatment by ceftiofur

Epidemiologically significant plasmid-mediated resistance genes (specifically *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and *qepA*) and multi-resistant isolates were detected both in habituated and unhabituated gorillas. This finding suggests that frequent proximity of people (trackers, researchers) is not the only factor contributing to colonization of gorillas by resistant bacteria. It seems likely that range overlap is more important for transmission of gastrointestinal microbiota than close contact with people. One of the possible ways of resistance genes dissemination from villages in the Special Reserve to the Park is passive transport by birds. On the other hand, spreading by water is not very likely since the Sangha River, the most important water source in the Special Reserve, does not enter the Dzanga Sector of the Park where sampling took place.

When examining the samples obtained from the gorillas of Makumba group 5 months after the ceftiofur treatment, we detected no isolates with PMQR or ESBL genes. Thus we could not show any effect of the antimicrobial treatment in this limited sample set. Both issues (habituated versus unhabituated individuals and a follow up after antimicrobial treatment) are very pertinent and would require analysis of larger datasets than could have been realized in this study.

### 5. Conclusion

Based on the spectra of resistance genes, sequence types and PFGE profiles of the investigated isolates, we infer that transmissions of resistant gastrointestinal microbiota between wildlife and humans in DSPA are not frequent. Resistant microorganisms were observed both in habituated and unhabituated gorillas, as well as in other wild mammals, their genetic background was very variable, but in most cases it differed from the genetic background of resistance in people. Occurrence of certain resistance genes, such as *qnrB* in *Citrobacter*, *oqxA* in *K. pneumoniae* or KLUA-like ESBL gene in *Kluyvera* can be considered as a natural phenomenon. Other genes found in microbiota of wildlife, namely the *qepA* and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (both found in gorillas), indicate that these animals have been in contact with human-contaminated environments. It is obvious that a long-term continuation of resistance genes monitoring in the area would help us to understand the impact of human-originating microbial contamination in the forest and to estimate the risk of transmission of newly evolved resistance genes from wildlife to humans.

### Acknowledgments

This study was funded by the project 'CEITEC – Central European Institute of Technology' (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from the European Regional Development Fund



and the Operational Programme “Education for Competitiveness” (CZ.1.07/2.3.00/30.0014) from the European Social Fund. Field work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant No 475 206/09/0927) and by institutional support of Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic (grant No RVO: 68081766) and by OPVK 2.3 project Development of Scientific Team and Laboratory for Infectious Diseases Common to Humans and Great Apes (CZ.1.07/2.3.00/20.0300). K.J.P. was also supported by the Praemium Academiae award to Julius Lukes. We would like to thank the government of the Central African Republic and the World Wildlife Fund for granting permission to conduct our research in the Central African Republic; the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Alphabétisation, de l'Enseignement Supérieur, et de la Recherche and the Ministère de l'Environnement, des Eaux et Forêts, de la Chasse et de la Pêche for providing research permits; and the Primate Habituation Programme for providing logistical support in the field. We are indebted to Christopher A. Whittier for information concerning the antimicrobial treatment of the habituated gorillas. We would like also to acknowledge Eva Suchanova, Marie Slavikova and Marie Hofirkova for their laboratory work. We thank George Jacoby (Lahey Clinic, Inc., Burlington, MA), Lina Cavaco and Henrik Hasman (National Food Institute, Copenhagen, DK), Ming-Gui Wang (Huashan Hospital, Shanghai, China), Sebastian Guenther (Free University Berlin, G), and Surbhi Malhotra-Kumar (University of Antwerp, B) for positive-control strains. We thank the team of the curators of the Institut Pasteur MLST system (Paris, France) for importing novel alleles, profiles and/or isolates at <http://www.pasteur.fr/mlst>.

## References

- Albrechtova, K., Dolejska, M., Cizek, A., Tausova, D., Klimes, J., Bebora, L., Literak, I., 2012. Dogs of nomadic pastoralists in northern Kenya are reservoirs of plasmid-mediated cephalosporin- and quinolone-resistant *Escherichia coli*, including pandemic clone B2-O25-ST131. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 4013–4017.
- Barton, B.M., Harding, G.P., Zuccarelli, A.J., 1995. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal. Biochem.* 226, 235–240.
- Benavides, J.A., Godreuil, S., Bodenham, R., Ratiarison, S., Devos, C., Pétretto, M.O., Raymond, M., Escobar-Páramo, P., 2012. No evidence for transmission of antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains from humans to wild western lowland gorillas in Lopé National Park, Gabon. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4281–4287.
- Bercion, R., Mossoro-Kpinde, D., Manirakize, A., LeFaou, A., 2009. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae uropathogens in Bangui, Central African Republic. *J. Infect. Dev. Countries* 3, 187–190.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.
- Blom, A., Almasi, A., Heitkonig, I.M.A., Kpanou, J.B., Prins, H.H.T., 2001. A survey of the apes in the Dzanga-Ndoki National Park, Central African Republic: a comparison between the census and survey methods of estimating the gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) and chimpanzee (*Pan troglodytes*) nest group density. *Afr. J. Ecol.* 39, 98–105.
- Bonnet, R., 2004. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1–14.
- Cantón, R., González-Alba, J.M., Galán, J.C., 2012. CTX-M-enzymes: origin and diffusion. *Front. Microbiol.* 3, 110.
- CDC, 2004. Standardized molecular subtyping of foodborne bacterial pathogens by pulse-field gel electrophoresis. In: National Molecular Network for Foodborne Disease Surveillance. Centre for Disease Control, Atlanta, GA.
- CLSI, 2008. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P.A., Brisse, S., 2005. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5811–5813.
- Dobiasova, H., Dolejska, M., Jamborova, I., Brhelova, E., Blazkova, L., Papousek, I., Kozlova, M., Klimes, J., Cizek, A., Literak, I., 2013. Extended spektrum  $\beta$ -lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85, 604–611.
- Ewers, C., Bethe, A., Wieler, L.H., Guenther, S., 2011. Companion animals: a relevant source of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase fluoroquinolone-resistant *Citrobacter freundii*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 37, 86–87.
- Fouts, D.E., Tyler, H.L., DeBoy, R.T., Daugherty, S., Ren, Q., Badger, J.H., Durkin, A.S., Huot, H., Shrivastava, S., Kothari, S., Dodson, R.J., Mohamoud, Y., Khouri, H., Roesch, L.F., Krogfelt, K.A., Struve, C., Triplett, E.W., Methé, B.A., 2008. Complete genome sequence of the 2-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS Genet.* 4, e1000141.
- Goering, R.V., 2010. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect. Genet. Evol.* 10, 866–875.
- Guenther, S., Ewers, C., Wieler, L.H., 2011. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producing *Escherichia coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? *Front. Microbiol.* 2, 246.
- Hansen, L.H., Johannesen, E., Burmolle, M., Sorensen, A.H., Sorensen, S.J., 2004. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3332–3337.
- Jacoby, G.A., Griffin, C., Hooper, D.C., 2011. *Citrobacter* spp. As a source of qnrB alleles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4979–4984.
- Literak, I., Dolejska, M., Radimersky, T., Klimes, J., Friedman, M., Aarestrup, F.M., Hasman, H., Cizek, A., 2010. Antimicrobial resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in wildboars. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1702–1711.
- Literak, I., Micudova, M., Tausova, D., Cizek, A., Dolejska, M., Papousek, I., Prochazka, J., Vojtech, J., Borleis, F., Guardone, L., Guenther, S., Hordowski, J., Lejas, C., Meissner, W., Marcos, B.F., Tucakov, M., 2012. Plasmid-mediated quinolone resistance genes in fecal bacteria from rooks commonly wintering throughout Europe. *Microb. Drug Resist.* 18, 567–573.
- Livermore, D.M., 2012. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J. Intern. Med.* 27, 123–142.
- Machado, E., Cantón, R., Baquero, F., Galán, J.C., Rollán, A., Peixe, L., Coque, T.M., 2005. Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1823–1829.
- Martinez, J.L., 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* 157, 2893–2902.
- Norman, A., Hansen, L.H., She, Q., Sørensen, S.J., 2008. Nucleotide sequence of pOLA52: A conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid* 60, 59–74.
- Okeke, I.N., Laxminarayan, R., Bhutta, Z.A., Duse, A.G., Jenkins, P., O'Brien, T.F., Pablos-Mendez, A., Klugman, K.P., 2005. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *Lancet Infect. Dis.* 5, 481–493.
- Olesen, I., Hasman, H., Aarestrup, F.M., 2004. Prevalence of  $\beta$ -lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microb. Drug Resist.* 10, 334–340.
- Pallecchi, L., Bartoloni, A., Riccobono, E., Fernandez, C., Mantila, A., Mgnelli, D., Mannini, D., Strohmeier, M., Bartalesi, F., Rodriguez, H., Gotuzzo, E., Rossolini, G.M., 2012. Quinolone resistance in absence of selective pressure: the experience of a very remote community in the Amazon forest. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1790.
- Pérez-Pérez, F.J., Hanson, N.D., 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2153–2162.
- Rwego, I.B., Isabirye-Basuta, G., Gillespie, T.R., Goldberg, T.L., 2008. Gastrointestinal bacterial transmission among humans, mountain gorillas, and livestock in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Conserv. Biol.* 22, 1600–1607.
- Sak, B., Petrzalkova, K.J., Kvetonova, D., Mynarova, A., Shutt, K.A., Pomajbikova, K., Kalousova, B., Modry, D., Benavides, J., Todd, A., Kvac, M., 2013. Long-term monitoring of microsporidia, *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in western Lowland Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*)

- at different stages of habituation in Dzanga Sangha Protected Areas, Central African Republic. *PLoS One* 8, e71840.
- Schaumburg, F., Mugisha, L., Peck, B., Becker, K., Gillespie, T.R., Peters, G., Leendertz, F.H., 2012. Drug-resistant human *Staphylococcus aureus* in sanctuary apes pose a threat to endangered wild ape populations. *Am. J. Primatol.* 74, 1071–1075.
- Strahilewitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., Robicsek, A., 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 664–689.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C., Ochman, H., Achtman, M., 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* 60, 1136–1151.
- Zhao, J., Chen, Z., Chen, S., Deng, Y., Liu, Y., Tian, W., Huang, X., Wu, C., Sun, Y., Sun, Y., Zeng, Z., Liu, J.H., 2010. Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4219–4224.

## Příloha 24

DOLEJSKA, M., VILLA, L., MINOIA, M., GUARDABASSI, L., CARATTOLI, A., 2014, Complete sequences of IncHI1 plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnrS1* in equine *Escherichia coli* provide new insights into plasmid evolution: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, p. 2388-2393.

### Souhrn

---

Práce popisuje primární nukleotidovou sekvenci dvou multirezistentních IncHI1 plazmidů z izolátů *E. coli* s beta-laktamázu CTX-M-1 rozšířených u koní a v prostředí Kliniky chorob koní VFU Brno. Kromě multirezistentní oblasti nesoucí geny rezistence k několika antibiotickým skupinám byl do primární kostry plazmidů včleněn úsek o velikosti 24 kb nesoucí geny pro metabolismus krátkých fruktooligosacharidů. Studie ukazuje na možný význam genů pro metabolismus cukrů v šíření a perzistenci rezistentních plazmidů ve střevní mikroflóře koní.





## Complete sequences of IncHI1 plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnrS1* in equine *Escherichia coli* provide new insights into plasmid evolution

Monika Dolejska<sup>1,2\*</sup>, Laura Villa<sup>3</sup>, Marco Minoia<sup>4</sup>, Luca Guardabassi<sup>4</sup> and Alessandra Carattoli<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic; <sup>2</sup>CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic; <sup>3</sup>Department of Infectious, Parasitic and Immune-Mediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Rome, Italy; <sup>4</sup>Department of Veterinary Disease Biology, University of Copenhagen, Stigbøjlen 4, 1870 Frederiksberg C, Denmark

\*Corresponding author. Tel: +420-541-562-643; Fax: +420-541-562-631; E-mail: m.dolejska@centrum.cz

Received 22 January 2014; returned 16 February 2014; revised 15 April 2014; accepted 21 April 2014

**Objectives:** To determine the structure of two multidrug-resistant IncHI1 plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> in *Escherichia coli* isolates disseminated in an equine clinic in the Czech Republic.

**Methods:** A complete nucleotide sequencing of 239 kb IncHI1 (pEQ1) and 287 kb IncHI1/X1 (pEQ2) plasmids was performed using the 454-Genome Sequencer FLX system. The sequences were compared using bioinformatic tools with other sequenced IncHI1 plasmids.

**Results:** A comparative analysis of pEQ1 and pEQ2 identified high nucleotide identity with the IncHI1 type 2 plasmids. A novel 24 kb module containing an operon involved in short-chain fructooligosaccharide uptake and metabolism was found in the pEQ backbones. The role of the pEQ plasmids in the metabolism of short-chain fructooligosaccharides was demonstrated by studying the growth of *E. coli* cells in the presence of these sugars. The module containing the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene was formed by a truncated macrolide resistance cluster and flanked by IS26 as previously observed in IncI1 and IncN plasmids. The IncHI1 plasmid changed size and gained the quinolone resistance gene *qnrS1* as a result of IS26-mediated fusion with an IncX1 plasmid.

**Conclusions:** Our data highlight the structure and evolution of IncHI1 from equine *E. coli*. A plasmid-mediated sugar metabolic element could play a key role in strain fitness, contributing to the successful dissemination and maintenance of these plasmids in the intestinal microflora of horses.

**Keywords:** CTX-M-1, IncHI1, IncX1, horses, fructooligosaccharides

### Introduction

Plasmids of incompatibility group HI1 are important vectors of antibiotic resistance in *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Paratyphi A, the major causal agents of enteric fever.<sup>1–3</sup> They pose a major threat to the effective treatment of enteric fever in many countries. The complete nucleotide sequences of six IncHI1 plasmids [R27 (GenBank accession no. AF250878), pHCM1 (AL513383), pMAK1 (AB366440), pAKU1 (AM412236), pO111\_1 (AP010961) and pP-stx-12 (CP003279)] have been determined. They share a common backbone of 164.4 kb,<sup>3</sup> however, a number of specific DNA segments that have been lost or gained in these plasmids reveal two distinct evolutionary lineages within the IncHI1 family.<sup>3–5</sup>

IncHI1 plasmids have been shown to carry a set of resistance genes inserted in a complex multiple antibiotic resistance region (MARR). Several transposons carrying antibiotic resistance genes are shared by most IncHI1 plasmids, such as Tn10 with the tetracycline resistance gene *tetA*(B), Tn6029 carrying the  $\beta$ -lactamase resistance gene *bla*<sub>TEM-1</sub>, sulphonamide and streptomycin resistance genes (*sul2*, *strA-strB*) or the Tn9 transposon with the chloramphenicol resistance gene *catA1* that carries the Tn21-associated mercury resistance cluster within it.<sup>3</sup> Differences in the structure of the MARR have been identified, highlighting the ongoing evolution of IncHI1 plasmids as a result of various genetic events reshaping the MARR *in situ*.<sup>3–6</sup>

We previously described IncHI1 plasmids carrying the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene in *Escherichia coli* disseminated in an equine clinic

in the Czech Republic, giving the first evidence of the carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) genes on InCHI1 plasmids.<sup>7</sup> InCHI1 plasmids associated with ESBL genes have so far been documented only in *E. coli* isolates of animal origin. Recently, InCHI1 plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-2</sub> have also been observed in *E. coli* from horses in Belgium and cattle in Germany.<sup>8,9</sup> The aim of this study was to elucidate the structure and evolution of *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-positive InCHI1 plasmids of equine origin by sequencing and bioinformatic analysis.

## Materials and methods

### Plasmids

Multiresistant *E. coli* strains were isolated at the Clinic of Equine Diseases at the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic, between 2007 and 2010;<sup>7</sup> these contained conjugative InCHI1 plasmids ranging from 220 to 285 kb in size and carrying the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene. Two plasmids, pEQ1 and pEQ2, from *E. coli* transconjugants were chosen for plasmid multilocus sequence typing (pMLST)<sup>3</sup> ([www.pubmlst.org/plasmid/](http://www.pubmlst.org/plasmid/)) and complete sequence analysis. pEQ1 was an InCHI1 plasmid harbouring *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and originating from *E. coli* strain T23 from the faeces of a healthy horse, while pEQ2 was positive for both HI1 and X1 replicons, carried *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> and the plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrS1* and was identified in *E. coli* strain 63743 from an infected wound on a horse.

### Plasmid sequencing and sequence assembly

A procedure using the 454 Genome Sequencer FLX system (Roche Diagnostic, Monza, Milan) was applied on libraries obtained using plasmid DNA from *E. coli* transconjugants purified by the Invitrogen PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen, Milan, Italy), according to the manufacturer's instructions. Plasmid libraries were sequenced using the GS FLX standard sequencing kit. Twenty-eight and 29 contigs for the pEQ1 and pEQ2 plasmids, respectively, ranging from 97 308 to 63 bp in size, with at least a 35-fold coverage, were obtained using GS De Novo Assembler v2.6 software. Contigs were first assembled *in silico* using the 454 ReadStatus output file generated by GS De Novo Assembler software, identifying reads overlapping adjacent contigs. Contig assembly and predicted gaps were then confirmed and filled by PCR-based gap closure followed by Sanger DNA sequencing of the amplicons (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### Bioinformatic analysis

Open reading frames (ORFs) were predicted and annotated using Artemis software (Wellcome Trust Sanger Institute, UK). Each predicted protein was compared against an all-protein database using BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) with a minimum cut-off of 30% identity over an 80% length coverage. Gene sequences were further compared and aligned with GenBank data using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). InCHI1 plasmids pHCM1 (AL513383) and R27 (AF250878) were used as reference plasmids for annotating the pEQ1 and pEQ2 plasmids.

### Nucleotide sequence accession numbers

The complete nucleotide sequences of plasmids pEQ1 and pEQ2 have been submitted to the GenBank database under accession numbers KF362121 and KF362122.

### Growth curves

Growth experiments were performed using oCelloScope (Unisensor Ltd, Denmark) to prove the function of a sugar metabolic cluster detected in the plasmids under study. Growth in the presence of short-chain fructooligosaccharides (scFOSs) as the only source of carbon was compared between *E. coli* TOP10 (Invitrogen™ Life Technologies, USA) carrying plasmid pEQ1 introduced by electroporation (*E. coli* TOP10/pEQ1) and plasmid-free *E. coli* TOP10. Overnight cultures of both strains were washed twice in AB minimal medium<sup>10</sup> and bacterial concentrations were determined by OD<sub>600</sub> measurements performed on a UV-3100 PC Spectrophotometer (VWR, Herlev, Denmark). A final concentration of  $\sim 10^5$  bacteria/mL of either *E. coli* TOP10 or *E. coli* TOP10/pEQ1 was then inoculated in 100  $\mu$ L of AB minimal medium supplemented with 5 mM kestose (Wako Chemicals GmbH, Germany), 5 mM nystose (Wako Chemicals GmbH) or 0.2% scFOSs (Digest Plus prebiotic supplement for horses; Bailey's, UK) and loaded into an F-base 96 microtitre plate (TPP; Sigma Aldrich). AB medium with 0.2% D-glucose (Sigma Aldrich) and without a carbon source was used as a positive and a negative control, respectively. Growth values are expressed as TA =  $\log_{10}(\text{Full light} - I)$ , where 'TA' is total absorption, 'Full light' is the intensity of an entirely white image and 'I' is the mean of the light intensity of an acquired image. Values were recorded for 45 h at 20 min intervals. All experiments were done in triplicate, and data were expressed as means  $\pm$  SD.

## Results and discussion

### pEQ1 and pEQ2 are InCHI1 type 2 plasmids

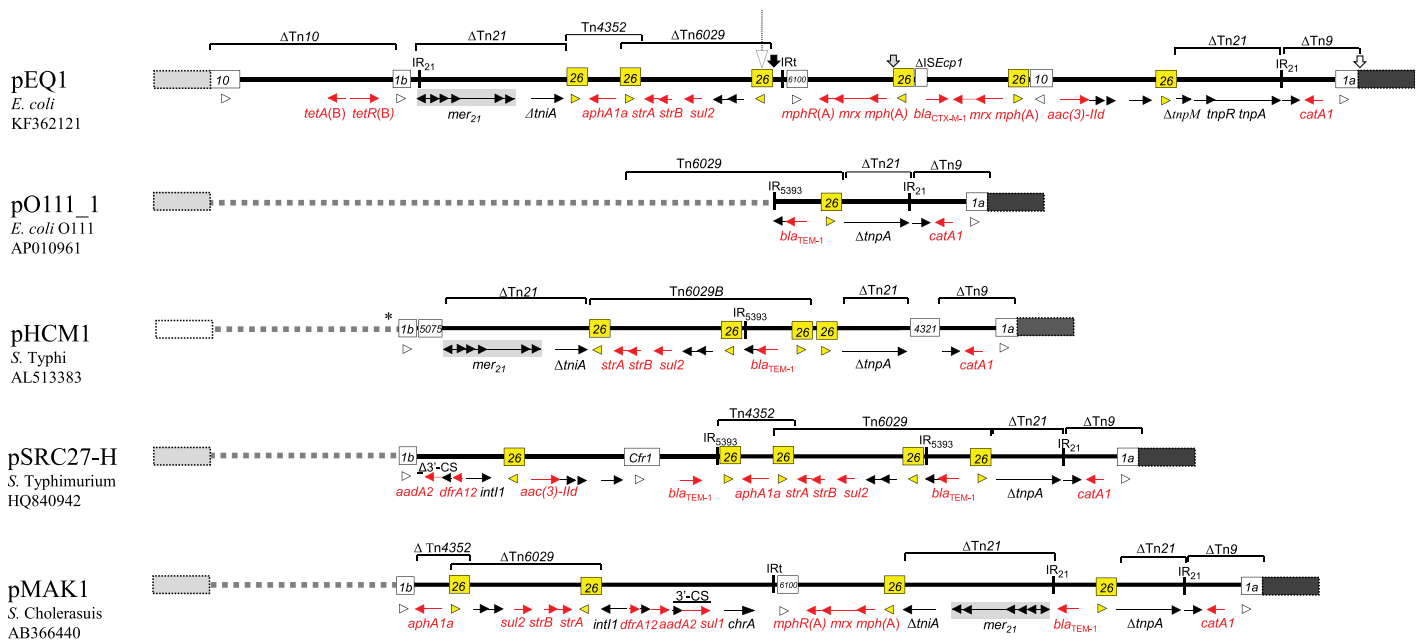
Both pEQ1 (239 151 bp) and pEQ2 (287 616 bp) showed the new ST9 pMLST profile, contained the typical InCHI1 backbone ( $\geq 99.9\%$  identity with ST1 pMAK1, pO111\_1 pHCM1 plasmids) encoding replication, maintenance and conjugative transfer, and showed all the features of InCHI1 type 2 plasmids (regions A–E).<sup>4,5</sup> Limited to pEQ2, a 48.5 kb fragment was inserted into the MARR.

### MARR of pEQ1 and pEQ2

The 42.9 kb MARR of the pEQ1 and pEQ2 plasmids was inserted in the same position of the InCHI1 backbone as seen in pHCM1-like plasmids (Figure 1), and bracketed between IS10 on the left and IS1a on the right. With respect to the pO111\_1 plasmid identified in *E. coli* in Japan, an IS26-flanked module containing the *mph(A)*, *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *aac(3)-IId* genes was acquired in the region flanking the Tn6029 right boundary.

The macrolide resistance operon [*mph(A)*-*mrx*-*mphR(A)*] was flanked by IS6100, which was followed by a 123 bp sequence identical to the end of Tn402/Tn1696<sup>11</sup> and a 58 bp duplicated fragment of IS26 (the solid black vertical arrow in Figure 1). A similar macrolide resistance segment was found in the InCHI1 plasmid pMAK1 (Figure 1) and also other plasmid families (e.g. JX101693, JN233704). However, in these latter plasmids, a region with the chromate resistance gene *chrA* and class 1 integron was present adjacent to the Tn402/Tn1696, but was not found in pEQ plasmids.

A gentamicin resistance module was formed by IS10 followed by *aac(3)-IId* and three hypothetical proteins, and showed 100% identity to a region found in the IncF plasmid pK245 recovered from a human *Klebsiella pneumoniae* isolate in Taiwan (DQ449578) and the chromosome of *Klebsiella oxytoca* E718 producing metallo- $\beta$ -lactamase NDM-1 (CP003683). A similar structure has been recently identified in the MARR of pSRC27-H, the



**Figure 1.** Structure of pEQ1 MARR and its comparison with other IncHI1 type 2 plasmids. The diagrams are drawn to scale and were drawn from the IncHI1 plasmid sequences in the GenBank database (plasmid names, their origin and their accession numbers are given). The grey dotted lines in the MARR of pO111\_1, pHCM1, pSRC27-H and pMAK1 indicate regions with >99% identity to pEQ1. The white, light grey and dark grey boxes flanking the MARR on both sides show the location inside the IncHI1 backbone; the colour of the box represents the same integration site shared by the IncHI1 plasmids. The reading frames are shown as horizontal arrows with the arrowhead indicating the direction of transcription and the names of the genes shown below. Antibiotic resistance genes are shown in red. The arrows without a mark indicate a hypothetical protein with unknown function. The boxes represent insertion sequences (ISs) with the number of the IS inside and an arrow below the box indicating the direction of transcription; IS26 is shown in yellow. The black boxes indicate inverted repeats at the end of transposons. The mercury resistance region is a part of Tn21 formed by six *mer* genes highlighted by grey shading. Brackets with names above the regions show the extent of the transposons. The asterisk in pHCM1 on the left of IS1b shows an extra 356 bp segment of Tn10 that has been removed from the other IncHI1 plasmids. The vertical arrows in pEQ1 show the following: the big white arrow pointing to the third IS26 in pEQ1 indicates the integration site of the IncX1 plasmid resulting in formation of pEQ2; the small black arrow pointing to the end of the third IS26 indicates the 58 bp duplicated fragment of IS26; the small grey arrow after the first *mph*(A) gene shows the 24 bp deletion; and the small white arrow adjacent to IS1a indicates the 187 bp deletion of the pHCM1.203 gene. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

IncHI1type 2 plasmid from equine *Salmonella* Typhimurium from Australia (Figure 1).<sup>6</sup>

The region carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> contained a second partial copy of the macrolide cluster [*mrx*-*mph*(A)] and was flanked by two IS26 sequences. This segment has not yet been observed in other IncHI1 plasmids but has been recently identified in IncN and IncI1 plasmids from both animal and human *E. coli*, including the epidemic ST131 clone from humans and pigs in Germany and Denmark.<sup>12–14</sup>

As in other IncHI1 plasmids, a Tn21 partial sequence was inserted inside Tn9 carrying the *catA1* gene.<sup>3</sup>

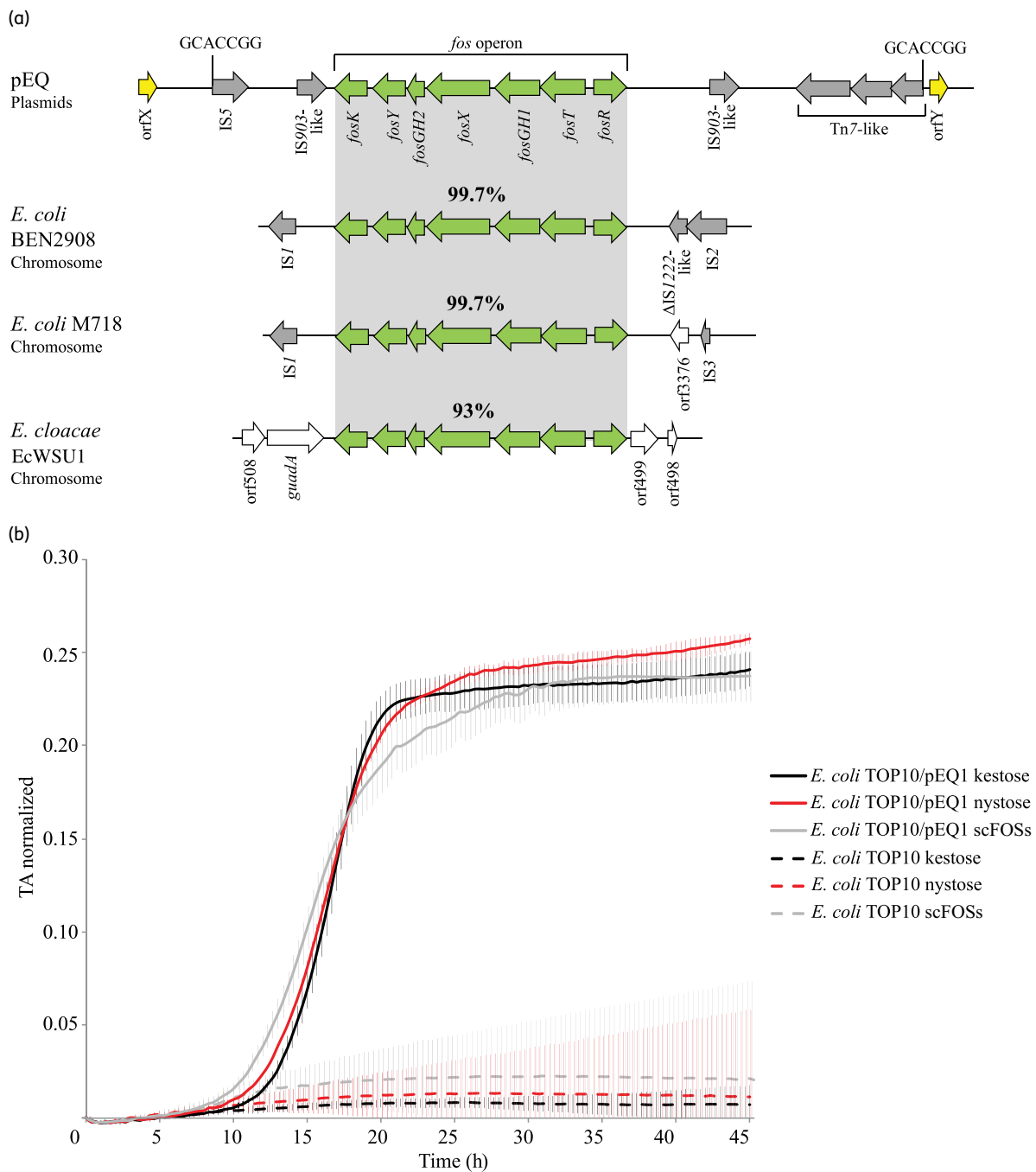
### **pEQ2 was generated by plasmid fusion between pEQ1 and a *qnrS1*-harbouring IncX1**

pEQ2 contained an IncX1 plasmid harbouring the *qnrS1* and *bla*<sub>TEM-1</sub> genes integrated between positions 119866 and 168370. The inserted plasmid had the typical IncX1 backbone<sup>15</sup> and showed high nucleotide identity to pRPEC180\_47 (JN935898) and pE001 (JF776874; Figure S1a, available as Supplementary data at JAC Online). The *qnrS1* and Tn2-*bla*<sub>TEM-1</sub> regions in pEQ2 showed a high similarity to those previously described for pAH3076 from *Shigella flexneri* 2b<sup>16</sup> and pINF5 from *Salmonella*

Infantis plasmids<sup>17</sup> (Figure S1b, available as Supplementary data at JAC Online). The model of formation of pEQ2 is shown in Figure S1c (available as Supplementary data at JAC Online). The pEQ2 has arisen via IS26-mediated homologous recombination between the IncX1 replicon and the IncH1 pEQ1 plasmid, resulting in separation of the *tnpA* and *tnpR* of Tn2.

### **pEQ plasmids carry an operon for *scFOS* metabolism**

Both pEQ1 and pEQ2 contained a 24 kb element flanked by 7 bp direct repeats, providing evidence of acquisition via transposition (Figure 2a). The inner 9253 bp part of this element showed 93–99% nucleotide identity with the genomes of the fully sequenced avian extraintestinal pathogenic *E. coli* BEN2908 (AY857617),<sup>18</sup> *E. coli* M718 (NZ\_GL884131) and *Enterobacter cloacae* EcWSU1 (CP002886) strains (Figure 2a). In the *E. coli* genomes this element contained seven *fos* genes organized as an operon, which was flanked by various insertion sequences that were likely to play a role in mobilization of this element (Figure 2a). In the pEQ1 and pEQ2 plasmids, this cluster was flanked by two directly repeated putative IS903-like elements. The first IS903-like element was preceded by an IS5 element,



**Figure 2.** Structure and function of the *fos* operon in the pEQ plasmids. (a) Comparative analysis of the genetic element for scFOS metabolism in pEQ1 and pEQ2 and its genetic environment with the related elements found in the genomic region AGI-3 of avian pathogenic *E. coli* strain BEN2908 (AY857617) and chromosomes of *E. coli* strain M718 (NZ\_GL884131) and onion-pathogenic *E. cloacae* EcWSU1 (CP002886). The reading frames are shown as arrows with the arrowhead indicating the direction of transcription. Grey-shaded areas indicate the nucleotide identity of the pEQ plasmids to the related sequences, with percentages representing the nucleotide identity of each sequence with respect to the pEQ plasmids given above. The genes of the *fos* operon in the pEQ plasmids and the reference sequence of avian pathogenic *E. coli* strain BEN2908 are indicated by green arrows as follows: *fosK*, encoding fructokinase; *fosY*, encoding a conserved hypothetical protein; *fosGH2*, encoding glycosyl hydrolase; *fosX*, encoding a conserved hypothetical protein; *fosGH1*, encoding glycosyl hydrolase; *fosT*, encoding the sugar transporter FruP/phosphotransferase system; and *fosR*, encoding specific transcriptional regulator of the LacI family. Transposon-related genes and insertion sequences (ISs) are indicated by grey arrows. Other genes and ORFs are indicated by white arrows. The genes *orfX* and *orfY*, indicated by yellow arrows, encode hypothetical proteins of the InChI1 backbone. Vertical bars indicate 7 bp direct repeats of the insertion site inside the pEQ backbone with the sequence shown above. (b) Growth curves of *E. coli* TOP10 transformants carrying the pEQ1 plasmid (*E. coli* TOP10/pEQ1; continuous lines) and the *E. coli* recipient TOP10 (broken lines) in AB minimal medium with kestose (5 mM), nystose (5 mM) and scFOSs (0.2%). This figure appears in colour in the online version of JAC and in black and white in the print version of JAC.



while a Tn7-like transposon was located downstream of the second IS903 (Figure 2a).

The *fos* operon has been previously described as being involved in the metabolism of scFOSs and the increased colonization abilities of avian pathogenic *E. coli* strains in the chicken intestine.<sup>19,20</sup> However, these elements were associated with pathogenicity islands within the chromosome and were not plasmid mediated. The role of the pEQ1 plasmid in the metabolism of scFOSs was demonstrated by a growth experiment involving *E. coli* cells in the presence of scFOSs (Figure 2b). *E. coli* transformants carrying the pEQ1 plasmid (*E. coli* TOP10/pEQ1) were able to grow in minimal medium supplemented with various types of scFOS as the sole carbon source while no growth was observed for the plasmid-free *E. coli* TOP10 recipients. To the best of our knowledge, this is the first evidence of a functional sugar metabolic cluster associated with a multidrug resistance conjugative plasmid. This plasmid-mediated metabolic function could play a key role in the adaptation of IncHI1 plasmids among equine *E. coli* since horses eat a diet rich in carbohydrates.<sup>21</sup> As such, the *fos* operon may contribute to strain fitness in the intestinal tract of these animals. Moreover, it may also contribute to co-selection and persistence of the array of antimicrobial resistance genes harboured by IncHI1 plasmids in the absence of antimicrobial selective pressure.

## Conclusions

In conclusion, the observed differences in organization of the MARR in the pEQ plasmids in comparison with other IncHI1 plasmids were attributed to independent insertions of transposable elements from other genomes and their further rearrangements within this plasmid lineage. The IncHI1 plasmid-mediated genetic element involved in scFOS metabolism could play a role in strain fitness in the equine intestinal tract, contributing to the successful dissemination and maintenance of these plasmids and their antimicrobial gene content in the intestinal microflora of horses.

## Acknowledgements

We thank Alois Cizek (University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno) for providing *E. coli* strains harbouring IncHI1 plasmids analysed in this study and Ivana Jamborova, Hana Dobiasova, Marie Slavikova (University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno) and Claudia Feudi (Istituto Superiore di Sanità) for excellent laboratory assistance.

## Funding

The project was supported by the Czech Science Foundation (GPP502/10/P083) and CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) (to M. D.) and by the Italian FLAGSHIP 'InterOmics' project (PB.P05) funded by MIUR and coordinated by the Italian Council of National Research (CNR) (to A. C.). M. D. was supported by a 'FEMS Advanced Fellowship 2011' Award from the Federation of European Microbiological Societies and by The Operational Programme 'Education for Competitiveness' (CZ.1.07/2.3.00/30.0014) from the European Social Fund. The work performed at the University of Copenhagen was supported by the EU grant HEALTH-F3-2011-282004 (EvoTAR).

## Transparency declarations

None to declare.

## Supplementary data

Figure S1 is available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

## References

- Taylor DE, Chumpitaz JC, Goldstein F. Variability of IncHI1 plasmids from *Salmonella typhi* with special reference to Peruvian plasmids encoding resistance to trimethoprim and other antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; **28**: 452–5.
- Hasan R, Cooke FJ, Nair S et al. Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet* 2005; **366**: 1603–4.
- Holt KE, Thomson NR, Wain J et al. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A harbors IncHI1 plasmids similar to those found in serovar Typhi. *J Bacteriol* 2007; **189**: 4257–64.
- Phan MD, Kidgell C, Nair S et al. Variation in *Salmonella enterica* serovar Typhi IncHI1 plasmids during the global spread of resistant typhoid fever. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 716–27.
- Cain AK, Hall RM. Evolution of IncHI1 plasmids: two distinct lineages. *Plasmid* 2013; **70**: 201–8.
- Cain AK, Hall RM. Evolution of a multiple antibiotic resistance region in IncHI1 plasmids: reshaping resistance regions *in situ*. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 2848–53.
- Dolejska M, Duskova E, Rybarikova J et al. Plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 757–64.
- Smet A, Boyen F, Flahou B et al. Emergence of CTX-M-2-producing *Escherichia coli* in diseased horses: evidence of genetic exchanges of *bla*<sub>CTX-M-2</sub> linked to ISCR1. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 1289–91.
- Schink AK, Kadlec K, Kaspar H et al. Analysis of extended-spectrum-β-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates collected in the GERM-Vet monitoring programme. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 1741–9.
- Clark DJ, Maaløe O. DNA replication and the division cycle in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 1967; **23**: 99–112.
- Partridge SR, Brown HJ, Stokes HW et al. Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 1263–70.
- Cullik A, Pfeifer Y, Prager R et al. A novel IS26 structure surrounds *bla*<sub>CTX-M</sub> genes in different plasmids from German clinical *Escherichia coli* isolates. *J Med Microbiol* 2010; **59**: 580–7.
- Schink AK, Kadlec K, Schwarz S. Analysis of *bla*<sub>CTX-M</sub>-carrying plasmids from *Escherichia coli* isolates collected in the BfT-GermVet study. *Appl Environ Microbiol* 2011; **77**: 7142–6.
- Dolejska M, Villa L, Hasman H et al. IncN plasmids disseminating *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnr* genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, environment and humans. *J Antimicrob Chemother* 2012; **68**: 333–9.
- Norman A, Hansen LH, She Q et al. Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid* 2008; **60**: 59–74.
- Hata M, Suzuki M, Matsumoto M et al. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 801–3.
- Kehrenberg C, Friederichs S, de Jong A et al. Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *J Antimicrob Chemother* 2006; **58**: 18–22.
- Chouikha I, Germon P, Brée A et al. A *selC*-associated genomic island of the extraintestinal avian pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908 is

involved in carbohydrate uptake and virulence. *J Bacteriol* 2006; **188**: 977–87.

**19** Schouler C, Taki A, Chouikha I *et al.* A genomic island of an extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain enables the metabolism of fructooligosaccharides, which improves intestinal colonization. *J Bacteriol* 2009; **191**: 388–93.

**20** Porcheron G, Chanteloup NK, Trotereau A *et al.* Effect of fructooligosaccharide metabolism on chicken colonization by an extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* strain. *PLoS One* 2012; **7**: e35475.

**21** Pagan JD. ed. *Advances in Equine Nutrition III*. Nottingham, UK: Nottingham University Press, 2005.

## Příloha 25

ALBRECHTOVA, K., KUBELOVA, M., MAZANCOVA, J., DOLEJSKA, M., LITERAK, I., CIZEK, A., 2014, High prevalence and variability of CTX-M-15-producing and fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* observed in stray dogs in rural Angola: Microbial Drug Resistance, v. 20, p. 372-375.

### Souhrn

---

Tato studie dokumentuje vysokou prevalenci bakterií s klinicky významnou rezistencí u pouličních psů v Angole. Izoláty *E. coli* s ESBL nebo plazmidy determinovanou rezistencí k fluorochinolonům byly zjištěny v 56-75 % rektálních výtěrů. ESBL fenotyp byl u všech izolátů spojen s beta-laktamázou CTX-M-15.





# High Prevalence and Variability of CTX-M-15-Producing and Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* Observed in Stray Dogs in Rural Angola

Katerina Albrechtova,<sup>1</sup> Michaela Kubelova,<sup>1</sup> Jana Mazancova,<sup>2</sup> Monika Dolejska,<sup>1,3</sup>  
Ivan Literak,<sup>1,3</sup> and Alois Cizek<sup>3,4</sup>

Antimicrobial resistance (AMR) represents a serious problem globally, but it is especially pronounced in the tropics, where pressure of infectious diseases is high. We examined resistance in *Escherichia coli* colonizing gastrointestinal tracts of 17 dogs which have never received antimicrobial treatment, living in central rural Angola. Emphasis was placed on extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR). Resistance-carrying plasmids were characterized in size, group of incompatibility and ability to conjugate. Isolates were compared by their pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles. Detailed description of 19 *E. coli* isolates with either ESBL or PMQR genes carried on multiresistant plasmids of different groups of incompatibility indicates that dogs, despite never being treated by antibiotics, are important reservoirs and transmitters of AMR in the study area.

## Introduction

MULTIDRUG-RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE have invaded diverse ecosystems world over, causing serious problems in human and veterinary medicine. Resistance genes can easily spread from people to animals and *vice versa*, taking advantage of several means of horizontal and vertical gene transfer.<sup>1</sup> Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and genes resistant to fluoroquinolones (PMQR) are epidemiologically significant, since they are easily spread in microbial populations and confer resistance to vital antimicrobials, such as third generation cephalosporins and fluoroquinolones.

Surveillance is the cornerstone of our understanding to the epidemiology of antimicrobial resistance and a starting point for intervention design.<sup>15</sup> Dogs living in tropical developing countries have repeatedly been recognized as relevant indicator organisms for microbial pathogens, since they share environment and water sources with human communities whilst at the same time often scavenging for food in human waste areas, including free defecation zones.<sup>12</sup> In a warm and humid tropical climate, which is conducive for the survival and spread of bacteria, such behavior can lead to an accumulation of resistance genes

within the normal gastrointestinal microflora of these domestic animals. High rates of resistance, including the ESBL and PMQR determinants, have previously been reported in *Escherichia coli* obtained from dogs of nomadic pastoralists in Northern Kenya.<sup>2</sup> This short communication aims to describe phenotypic and genotypic characteristics of gastrointestinal *E. coli* with ESBL and/or PMQR genes found in dogs in rural central Angola.

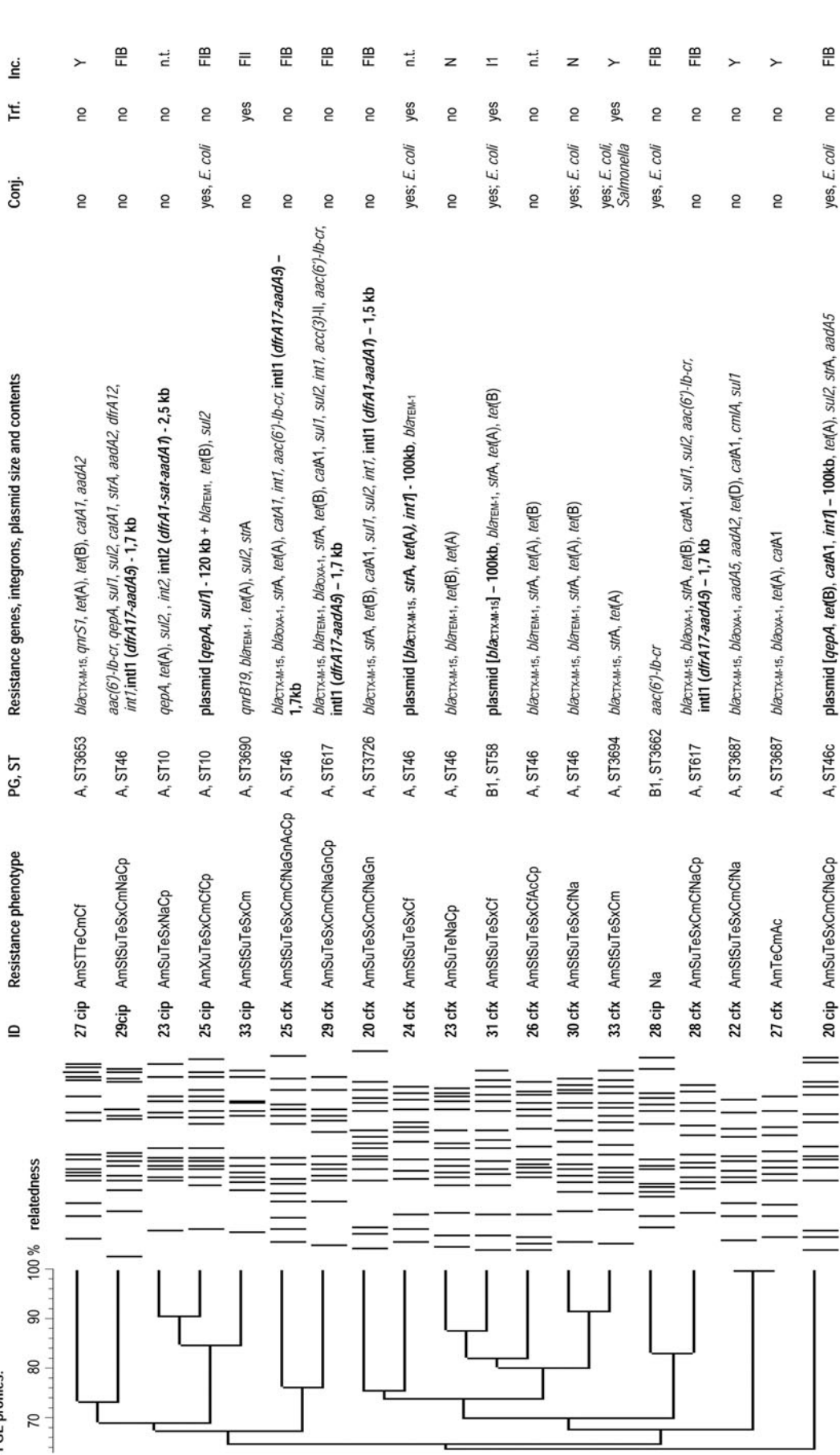
## Material and Methods

Rectal swabs from 17 stray dogs (assigned IDs 20 to 36) were obtained in and around the town of Catabola (Bié, Central Angola; 18,000 inhabitants). Animals were handled by an instructed assistant, according to the Directive 86/609/EEC on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Dogs were chosen randomly in the town center. The overall population of stray dogs in the town is not known, but is estimated to be several hundred. Previous antibiotic therapy in these dogs is highly unlikely. All samples were preserved in Amies medium until delivered to the laboratory. Swabs were cultivated on MacConkey agar with cefotaxime (2 mg/L) and in parallel on MacConkey agar with ciprofloxacin (0.05 mg/L) to detect

<sup>1</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology; <sup>3</sup>CEITEC VFU Brno; <sup>4</sup>Department of Infectious Diseases and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic.

<sup>2</sup>Department of Sustainable Technologies, Faculty of Tropical AgriSciences, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic.

PFGE profiles:



**FIG. 1.** Phenotypic and genotypic characteristics of analyzed *E. coli* strains. Dogs were assigned IDs 20–36. Isolates with the suffix “cfx” were obtained on MCA-cefotaxime; isolates with the suffix “cip” were grown on MCA-ciprofloxacin. Isolates with an identical Arabic number originate from the same animal. *Left* column: dendrogram of analyzed *E. coli* isolates’ PFGE profiles generated by cluster analysis of the Dice similarity indices in the BioNumerics fingerprinting software. Am, ampicillin; St, streptomycin; Su, sulfonamides compounds; Na, nalidixic acid; Te, tetracycline; Sx, trimethoprim-sulfamethoxazole; Cm, chloramphenicol; Cf, cefalotin; Cp, ciprofloxacin; Ac, amoxicillin-clavulanate; Gn, gentamicin; Cz, ceftazidime; ID, identification number; PG, phylogenetic group; ST, sequence type; Conj., conjugation to *E. coli* or *Salmonella* Braenderup; Trf., transformation to DH5a cells; Inc., plasmid incompatibility group. Plasmids (in bold) were characterized (as for the size and Inc. group) in single-plasmid harboring transformants or transconjugants; resistance genes found on one plasmid are in square brackets, plasmid size follows the hyphen. Int11, class 1 integron; Int12, class 2 integron. Gene cassettes detected on one integron are within parentheses, with integron size following the hyphen.

ESBL-producing *E. coli* and *E. coli* possessing PMQR genes respectively. Biochemical identification of *E. coli* colonies was performed by API20S (Biomérieux). A single colony was isolated from each plate. Obtained isolates were characterized as described previously.<sup>2</sup> In brief, the isolates were tested for susceptibility to 12 antibiotics by disc-diffusion method: ampicillin (10 µg), cephalotin (30 µg), amoxicillin-clavulanate (20 + 10 µg), ceftazidime (30 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25 + 23.75 µg), sulphonamides compounds (300 µg), gentamicin (10 µg), nalidixic acid (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), streptomycin (30 µg), tetracycline (30 µg), and chloramphenicol (30 µg).<sup>8</sup> Production of ESBL was tested by a double-disc synergy test.<sup>8</sup> Phylogroups, resistance genes, and integrons were searched by PCR as summarized elsewhere.<sup>11</sup> Clonal relatedness of the isolates with ESBL or PMQR genes was assessed by XbaI pulse-field gel electrophoresis (PFGE)-generated dendrogram.<sup>7</sup> Sequence types were determined by multilocus sequence typing.<sup>16</sup> Conjugation transfer of ESBL and PMQR genes was made to plasmid-free, rifampin- and azid-resistant *E. coli* MT102RN, and *Salmonella* Typhimurium SL5325.<sup>13</sup> Plasmid DNA from ESBL-producing and PMQR-harboring isolates was extracted by rapid alkaline method<sup>4</sup> and introduced into competent *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen) by heat-shock transformation (42°C for 45 sec). Transformants were selected on Luria-Bertani agar with 0.05 mg ciprofloxacin or 2 mg cefotaxime, according to the genes expected. Plasmids carrying the ESBL/PMQR genes were characterized in size by S1 nuclease PFGE and replicon typed.<sup>5,10</sup>

## Results

Coliform colonies were obtained from 16 out of 17 swabs cultivated. One coliform colony obtained on MCA-ciprofloxacin (34cip) was identified as *Citrobacter freundii*, and one grown on MCA-cefotaxime (35cfx) turned out to be *Enterobacter cloacae*. These non-*E. coli* isolates were not characterized further. ESBL-producing *E. coli* was detected in 12 (75%) samples, and *E. coli* with PMQR genes was obtained from nine (56%) samples. Cultivation of 7 out of 17 samples (numbers 20, 23, 25, 27, 28, 29, and 33) resulted in two *E. coli* isolates, of which one had an ESBL gene and the other had PMQR gene (discriminated as 20cfx/20cip). By means of sequencing, all ESBLs were characterized as type CTX-M-15, while PMQR genes were represented by *qepA*, *qnrS1*, *qnrB19*, or *aac(6')-Ib-cr*. All except one of the examined strains were multiresistant, with 2–10 resistance genes detected. Resistance-carrying plasmids (characterized where single plasmid-harboring transformants or tranconjugants were obtained) varied in size, incompatibility group, and combinations of resistance genes carried (Fig. 1). The CTX-M-15 beta-lactamase was detected on large plasmids of the FIB, Y, N, II incompatibility groups. Four samples had the gene *qepA* carried on plasmids of the FIB incompatibility group. Some of the investigated plasmids were not typable by primers described previously.<sup>5,10</sup> Plasmids of seven isolates carrying the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene or the *qepA* gene were conjugative to recipient cells. The variability of PFGE patterns was high, showing more than 95% relatedness only in one pair of all examined strains (Fig. 1). The 19 investigated isolates represented 12 different sequence types with six of them (ST 3653, ST 3687, ST 3690, ST 3694, and

ST 3726) new in the MLST database at the ERI, University College Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/>). The majority of the isolates belonged to phylogenetic group A, with two exceptions in group B1.

## Discussion

Although the size of the sample set examined was limited, the prevalence of highly resistant isolates found in the stray dogs is worrisome. The high diversity of phenotypic and genotypic profiles of the investigated isolates indicates that high resistance rates in the study area do not represent the success of a single multiresistant bacterial clone, but have evolved by dissemination of various bacterial strains. The genetic diversity of plasmids also implies that resistance in the studied isolates has been acquired in multiple ways. The majority of plasmids carrying the CTX-M-15 beta-lactamase belonged to the FIB group of incompatibility. However, even less common plasmids with Y replicon were detected. Six ESBL- or PMQR-carrying plasmids showed the ability to conjugate to recipient *E. coli* and *S. typhimurium*. Considering their putative ability to conjugate to pathogenic bacterial species, these plasmids are of high epidemiological importance.

Several studies have described occurrence of community- or hospital-associated multiresistant bacterial isolates (mainly of *Vibrio* sp.) in people in Angola.<sup>6,9,14</sup> However, to our knowledge, this is the first report about ESBL in the country. Since administration of antibiotics, especially costly ones such as fluoroquinolones or third-generation cephalosporins, to dogs in rural Angola is unlikely, colonization of them by ESBL- and PMQR-harboring bacteria could be indirect evidence of their occurrence in humans. Quantitative data on the consumption of antimicrobial agents by humans in Angola are not available, but fluoroquinolone ciprofloxacin and third-generation cephalosporin ceftriaxone are available in the country.<sup>3,14</sup> Although these two antibiotics are costly and might not be accessible to the public, their use in hospitals can lead to the selection of bacteria with ESBL- and/or PMQR-carrying plasmids. Plasmids described in this study carried genes coding for resistance to widely available drugs such as sulfonamides, tetracyclines, or gentamicin. It is likely that, once introduced to an area, the spread of such plasmids is also perpetuated by antibiotics less costly than fluoroquinolones or third-generation cephalosporins. Poor hygienic conditions, lack of sanitary facilities, and dogs scavenging for food in waste are the major factors contributing to bacterial exchange between humans and dogs. As stray dogs move around freely and travel relatively long distances, they can play an important role in resistance epidemiology as reservoirs and vectors of multiresistant bacteria acquired from and transferable to humans. A similar situation was observed in Northern Kenya<sup>2</sup> and could be applied to other African rural regions.

## Acknowledgments

We thank the team of the Czech University of Life Sciences Prague in Angola, implementing the project Support of Agricultural Vocational Training School in Catabola, Angola, financed within Czech Development Cooperation, for assistance with sample collection, and to the project management for allowing this study to happen. The study



was supported by project CEITEC—Central European Institute of Technology (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from the European Regional Development Fund. M.D. was supported by the Operational Program Education for Competitiveness (CZ.1.07/2.3.00/30.0014) from the European Social Fund.

#### Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

#### References

1. **Aarestrup, F.M.** 2006. Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. ASM Press, Washington, DC.
2. **Albrechtova, K., M. Dolejska, A. Cizek, D. Tausova, J. Klimes, L. Bebor, and I. Literak.** 2012. Dogs of nomadic pastoralists in northern Kenya are reservoirs of plasmid-mediated cephalosporin- and quinolone-resistant *Escherichia coli*, including pandemic clone B2-O25-ST131. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**:4013–4017.
3. **Bar, W., S. Rusch-Gerdes, E. Richter, G. Marquez de Bar, C. Dittmer, H. Papsdorf, P. Stosiek, P.B. de Rijk, W.M. Meyers, and F. Portaels.** 1998. *Mycobacterium ulcerans* infection in a child from Angola: diagnosis by direct detection and culture. *Trop. Med. Int. Health* **3**:189–196.
4. **Birnboim, H.C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513–1523.
5. **Caratolli, A., A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K.L. Hopkins, and E.J. Threlfall.** 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* **63**:219–228.
6. **Ceccarelli, D., A.M. Salvia, J. Sami, P. Cappuccinelli, and M.M. Colombo.** 2006. New cluster of plasmid-located class 1 integrons in *Vibrio cholerae* O1 and a *dfrA15* cassette-containing integron in *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Angola. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2493–2499.
7. **Centers for Disease Control.** 2004. Standardized Molecular Subtyping of Foodborne Bacterial Pathogens by Pulse-Field Gel Electrophoresis. National Molecular Network for Foodborne Disease Surveillance, Atlanta, GA.
8. **CLSI.** 2008. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
9. **Eggert, W., S. Eggert, L. Ferreira, and L. Bernardino.** 1992. The pathogen spectrum and its resistance behavior in children with urinary tract infections in Angola. *Kinderartztl. Prax.* **60**:46–48.
10. **Johnson, T.J., E.M. Bielak, D. Fortini, L.H. Hansen, H. Hasman, C. Debroy, L.K. Nolan, and A. Carattoli.** 2012. Expansion of the Inc X plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant Enterobacteriaceae. *Plasmid* **68**:43–50.
11. **Literak, I., M. Dolejska, T. Radimersky, J. Klimes, M. Friedman, F.M. Aarestrup, H. Hasman, A. Cizek.** 2010. Antimicrobial resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *J. Appl. Microbiol.* **108**:1702–1711.
12. **MacPherson, C.L.M., F.X. Meslin, and A.L. Wandeler.** 2000. Dogs, Zoonoses, and Public Health. CABI, Wallingford, UK.
13. **Olesen, I., H. Hasman, and F.M. Aarestrup.** 2004. Prevalence of beta-lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microb. Drug Resist.* **10**:334–340.
14. **Pelkonen, T., I. Roine, L. Monteiro, M. Correia, A. Pitkaranta, L. Bernardino, and H. Peltola.** 2009. Risk factors for death and severe neurological sequelae in childhood bacterial meningitis in sub-Saharan Africa. *Clin. Infect. Dis.* **48**:1107–1110.
15. **WHO.** 2012. The Evolving Threat of Antimicrobial Resistance: Options for Action. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
16. **Wirth, T., D. Falush, R. Lan, F. Colles, P. Mensa, L.H. Wieler, H. Karch, P.R. Reeves, M.C. Maiden, H. Ochman, and M. Achtman.** 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* **60**:1136–1151.

Address correspondence to:  
**Katerina Albrechtova, DVM, PhD**  
*University of Veterinary  
 and Pharmaceutical Sciences Brno  
 Palackeho 1–3  
 61242 Brno  
 Czech Republic*  
 E-mail: albkat@seznam.cz

## Příloha 26

JAMBOROVA, I., DOLEJSKA, M., VOJTECH, J., GUENTHER, S., URICARIU, R., DROZDOWSKA, J., PAPOUSEK, I., PASEKOVA, K., MEISSNER, W., HORDOWSKI, J., CIZEK, A., LITERAK, I., 2015, Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and fluoroquinolones in various *Escherichia coli* sequence types isolated from rooks wintering in Europe: Applied and Environmental Microbiology, v. 81, p. 648-657.

### Souhrn

---

V této studii bylo sledováno rozšíření ESBL, AmpC a plazmidově determinované rezistence k fluorochinolonům u *E. coli* z havranů polních v devíti zimovištích v Evropě. Selektivní izolací na půdách s antibiotiky byly získány izoláty s ESBL nebo AmpC ve 12 % vzorků trusu, zatímco PMQR geny byly identifikovány v 6 % vzorků. Rezistence byla spojena převážně s obecně rozšířenými geny *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub> a *qnrS1*. V trusu havranů byly prokázány významné multirezistentní sekvenční linie s patogenním potenciálem.



# Plasmid-Mediated Resistance to Cephalosporins and Fluoroquinolones in Various *Escherichia coli* Sequence Types Isolated from Rooks Wintering in Europe

Ivana Jamborova,<sup>a</sup> Monika Dolejska,<sup>a,b</sup> Jiri Vojtech,<sup>a,b</sup> Sebastian Guenther,<sup>c</sup> Raluca Uricariu,<sup>a</sup> Joanna Drozdowska,<sup>a,d</sup> Ivo Papousek,<sup>a</sup> Katerina Pasekova,<sup>a</sup> Wlodzimierz Meissner,<sup>d</sup> Jozef Hordowski,<sup>e</sup> Alois Cizek,<sup>b,f</sup> Ivan Literak<sup>a,b</sup>

Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic<sup>a</sup>; CEITEC, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic<sup>b</sup>; Institute of Microbiology and Epizootics, Veterinary Faculty, Free University Berlin, Berlin, Germany<sup>c</sup>; Avian Ecophysiology Unit, Department of Vertebrate Ecology and Zoology, University of Gdańsk, Gdańsk, Poland<sup>d</sup>; Arboretum i Zakład Fizjografii w Bolestraszczykach, Przemysl, Poland<sup>e</sup>; Department of Infectious Diseases and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic<sup>f</sup>

**Extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL)-producing, AmpC beta-lactamase-producing, and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) gene-positive strains of *Escherichia coli* were investigated in wintering rooks (*Corvus frugilegus*) from eight European countries. Fecal samples ( $n = 1,073$ ) from rooks wintering in the Czech Republic, France, Germany, Italy, Poland, Serbia, Spain, and Switzerland were examined. Resistant isolates obtained from selective cultivation were screened for ESBL, AmpC, and PMQR genes by PCR and sequencing. Pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing were performed to reveal their clonal relatedness. In total, from the 1,073 samples, 152 (14%) cefotaxime-resistant *E. coli* isolates and 355 (33%) *E. coli* isolates with reduced susceptibility to ciprofloxacin were found. Eighty-two (54%) of these cefotaxime-resistant *E. coli* isolates carried the following ESBL genes:  $bla_{CTX-M-1}$  ( $n = 39$  isolates),  $bla_{CTX-M-15}$  ( $n = 25$ ),  $bla_{CTX-M-24}$  ( $n = 4$ ),  $bla_{TEM-52}$  ( $n = 4$ ),  $bla_{CTX-M-14}$  ( $n = 2$ ),  $bla_{CTX-M-55}$  ( $n = 2$ ),  $bla_{SHV-12}$  ( $n = 2$ ),  $bla_{CTX-M-8}$  ( $n = 1$ ),  $bla_{CTX-M-25}$  ( $n = 1$ ),  $bla_{CTX-M-28}$  ( $n = 1$ ), and an unspecified gene ( $n = 1$ ). Forty-seven (31%) cefotaxime-resistant *E. coli* isolates carried the  $bla_{CMY-2}$  AmpC beta-lactamase gene. Sixty-two (17%) of the *E. coli* isolates with reduced susceptibility to ciprofloxacin were positive for the PMQR genes  $qnrS1$  ( $n = 54$ ),  $qnrB19$  ( $n = 4$ ),  $qnrS1$  and  $qnrB19$  ( $n = 2$ ),  $qnrS2$  ( $n = 1$ ), and  $aac(6')-Ib-cr$  ( $n = 1$ ). Eleven isolates from the Czech Republic ( $n = 8$ ) and Serbia ( $n = 3$ ) were identified to be CTX-M-15-producing *E. coli* clone B2-O25b-ST131 isolates. Ninety-one different sequence types (STs) among 191 ESBL-producing, AmpC-producing, and PMQR gene-positive *E. coli* isolates were determined, with ST58 ( $n = 15$ ), ST10 ( $n = 14$ ), and ST131 ( $n = 12$ ) predominating. The widespread occurrence of highly diverse ESBL- and AmpC-producing and PMQR gene-positive *E. coli* isolates, including the clinically important multiresistant ST69, ST95, ST117, ST131, and ST405 clones, was demonstrated in rooks wintering in various European countries.**

The incidence of bacteria resistant to cephalosporins and fluoroquinolones is growing steadily and constitutes a serious risk for human and animal health. The major mechanism conferring resistance to cephalosporins is mediated by extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and AmpC beta-lactamases (1). Although plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes confer only a low level of resistance to fluoroquinolones and resistance is mainly caused by point mutations of the quinolone resistance-determining region (QRDR), coding for gyrase and topoisomerase (2), the interaction between mutations in the QRDR and PMQR genes leads to higher levels of resistance to fluoroquinolones (3).

Wild animals that do not come directly into contact with antibiotics are affected by their use in human and veterinary medicine. The close proximity of wild animals with humans and domestic animals plays an important role in the transmission of pathogens to wildlife, thus potentially creating an additional environmental reservoir of antibiotic-resistant bacteria (4). Wild birds, especially corvids, feeding on garbage dumps near urban agglomerations are at high risk of being colonized by multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates. They have been identified to be significant carriers and vectors of commensal and pathogenic bacteria with various mechanisms of resistance (4, 5). The probable origin of the majority of wintering rooks in both the central and western parts of

continental Europe is mainly in Eastern Europe, including Russia, Belarus, and Ukraine. However, wintering rooks are rare in Italy and Spain nowadays (6).

With the implementation of multilocus sequence typing (MLST) to characterize *E. coli* strains and our deeper understanding of microevolution in the core bacterial genome, certain genetic lineages with special features supporting their pandemicity have been described (7, 8). The most studied phylogenetic lineage today in terms of antibiotic resistance is *E. coli* sequence type (ST)

Received 29 July 2014 Accepted 5 November 2014

Accepted manuscript posted online 7 November 2014

Citation Jamborova I, Dolejska M, Vojtech J, Guenther S, Uricariu R, Drozdowska J, Papousek I, Pasekova K, Meissner W, Hordowski J, Cizek A, Literak I. 2015. Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and fluoroquinolones in various *Escherichia coli* sequence types isolated from rooks wintering in Europe. *Appl Environ Microbiol* 81:648–657. doi:10.1128/AEM.02459-14.

Editor: H. Nohji

Address correspondence to Ivana Jamborova, jamborovai@vfu.cz.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02459-14>.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. doi:10.1128/AEM.02459-14

131 (ST131). This lineage harbors a wide range of virulence genes and various plasmid-mediated resistance genes, and it is involved in the global spread of the CTX-M-15 beta-lactamase. Its high level of virulence combined with carriage of transferable elements encoding multidrug resistance is likely responsible for the pandemic success of ST131 strains (9). Even as the ST131 clone is known to cause community-onset infections in humans, including urinary tract infections, bacteremia, and neonatal sepsis, it has also been identified in companion animals, poultry, livestock, wild animals, and food (10–12). Other lineages with high proportions of multidrug-resistant strains responsible for community-onset and hospital-acquired infections, such as ST69, ST95, ST117, and ST405 (phylogenetic group D), ST10 (phylogenetic group A), and ST23 (phylogenetic group B1), have been described (13, 14).

The finding of particular *E. coli* lineages in food, water, environmental, and nonhuman sources indicates the entirely unexplored complexity of transmission routes (13), whereby migrating birds may play an important role in the circulation of epidemiologically important *E. coli* clones and may pose a risk of environmental contamination. In the study described in this paper, rooks (*Corvus frugilegus*; which are medium-sized corvids) commonly wintering in central and western parts of continental Europe were examined for the presence of ESBL- and AmpC-producing *E. coli* isolates and/or isolates carrying PMQR genes. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and MLST, including eBURST analysis, were used to reveal the clonal relatedness of these *E. coli* isolates. This study follows a recent study in European rooks by Literak et al. (6), where PMQR genes in pooled samples of members of the *Enterobacteriaceae* family were investigated, regardless of bacterial species.

## MATERIALS AND METHODS

**Collection of rook feces.** Feces of rooks was collected in nine roosting places in eight European countries during the winter (December to February) of 2010–2011. An exception was France, where the samples were collected in April 2011. Fresh feces were picked up individually from plastic film exposed overnight on the ground beneath the roosting place using a sterile cotton swab, dipped in Amies transport medium (Dispolab, Czech Republic), and then transported to the laboratory at room temperature (6). All fecal samples were obtained from one sampling site per country except for Germany and Poland. A total of 1,073 fecal samples from the Czech Republic ( $n = 150$  fecal samples), France ( $n = 31$ ), three sampling sites in Germany (Schortens-Heidmühle [53°23'N, 7°58'E;  $n = 54$  samples], Wilhelmshaven [53°32'N, 8°04'E;  $n = 33$  samples], Schortens-Heidmühle, Huntesteert [53°32'N, 7°55'E;  $n = 13$  samples]), Italy ( $n = 145$ ), two locations in Poland (Gdynia,  $n = 150$  samples; Jaroslaw,  $n = 148$  samples), Serbia ( $n = 150$ ), Spain ( $n = 150$ ), and Switzerland ( $n = 49$ ) were collected. Descriptions of the location and exact time of sampling have been described in our previous study (6).

**Isolation and determination of *E. coli* strains producing ESBLs or AmpC or carrying PMQR genes.** Fecal samples were transferred from Amies transport medium to buffered peptone water (Oxoid, United Kingdom) and cultivated overnight. Subsequently, samples were subcultivated on MacConkey agar (MCA) containing cefotaxime (2 mg/liter) and in parallel on MCA with ciprofloxacin (0.05 mg/liter). Isolated coliform colonies were identified by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)–time of flight (TOF) mass spectrometry (MALDI biotyper; Bruker Daltonics, USA). The colonies grown on MCA supplemented with cefotaxime were tested for the production of ESBLs using a double-disk synergy (DDS) test (15). Simultaneously, the isolates were screened for AmpC using a cefoxitin (30- $\mu$ g) disk; those showing a cutoff value of  $\leq 18$

mm were confirmed to be AmpC producers by the cefoxitin-cloxacillin (CC)-DDS method (16), where cloxacillin was adequately replaced by oxacillin (128 mg/liter) (17). The AmpC production phenotype of isolates positive by the CC-DDS method but negative for all AmpC genes tested was confirmed using a MASTDISCS ID AmpC and ESBL test (Mast Diagnostics, Merseyside, United Kingdom). Each ESBL-producing isolate was screened by PCR for the following resistance genes responsible for the ESBL-producing phenotype: *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, and *bla*<sub>SHV</sub> (18). Specific primers for determination of CTX-M subgroups were used (19, 20). AmpC genes *bla*<sub>DHA</sub>, *bla*<sub>ACC-1</sub>, *bla*<sub>ACC-2</sub>, *bla*<sub>MOX</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>, and *bla*<sub>FOX</sub> were identified by PCR (21). The sequence type of the *bla*<sub>CMY</sub> gene was determined using forward primer CMY 2/F (5'-AACACACTGATTGCG TCT-3') and reverse primer CMY 2/R (5'-CTGGGCCTCATCGTCAGT-3'), based on the reference sequence with GenBank accession number HQ680723. The colonies grown on MCA with ciprofloxacin were investigated for PMQR genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* (18). All PCR products of the ESBL, AmpC, and PMQR genes were analyzed by sequencing.

**Antibiotic susceptibility testing.** ESBL-producing and PMQR gene-positive *E. coli* isolates were tested, using the disk diffusion method, for susceptibility to the following 13 antimicrobial agents according to CLSI guidelines (15, 22): amoxicillin-clavulanic acid (30  $\mu$ g), ampicillin (10  $\mu$ g), cephalothin (30  $\mu$ g), ceftazidime (30  $\mu$ g), chloramphenicol (30  $\mu$ g), ciprofloxacin (5  $\mu$ g), gentamicin (10  $\mu$ g), nalidixic acid (30  $\mu$ g), streptomycin (10  $\mu$ g), sulfamethoxazole-trimethoprim (25  $\mu$ g), sulfonamide compounds (300  $\mu$ g), tetracycline (30  $\mu$ g), and imipenem (10  $\mu$ g).

**Molecular typing methods.** The epidemiological relatedness of the *E. coli* isolates was detected by XbaI PFGE and MLST with an MSTree (23). Macrorestriction patterns and sequence type complexes in the MSTree were calculated using BioNumerics (version 6.6) software (Applied Maths, Ghent, Belgium). Cluster analysis of the Dice similarity indices was done to generate a dendrogram describing the relationships among the PFGE profiles. The minimum level for similarity between patterns was defined to be 85% (24).

PCR for MLST was based on seven housekeeping genes (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, and *recA*). Different sequences of a given locus were assigned allele numbers on the basis of the entries in the *E. coli* MLST database (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/>), and each unique combination of alleles (the allelic profile) was determined to be a sequence type (ST) (7). The eBURST (<http://eburst.mlst.net/>) algorithm was used for determining clonal complexes of STs (STCs), whereby STs sharing six or more loci were assigned to defined STCs (25). The phylogenetic type affiliation was determined using Structure software analysis based on seven housekeeping genes (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure>) and for six isolates was determined by a multiplex PCR assay (26).

## RESULTS

**ESBL, AmpC, and PMQR genes in *E. coli* isolates.** A total of 152 (14%) cefotaxime-resistant *E. coli* isolates were found in the 1,073 samples tested. Eighty-two (54%) of these 152 cefotaxime-resistant *E. coli* isolates carried an ESBL gene, and none of them harbored an AmpC gene. The *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene was predominant ( $n = 39$ ), followed by *bla*<sub>CTX-M-15</sub> ( $n = 25$ ). The other ESBL genes were rare and more locally distributed (Tables 1 and 2). The 82 ESBL-producing isolates belonged to phylogenetic groups A ( $n = 32$  isolates, 39%), B1 ( $n = 2$ , 2%), B2 ( $n = 12$ , 15%), A  $\times$  B1 ( $n = 20$ , 24%), and ABD ( $n = 16$ , 20%). The genetic background of hybrid group A  $\times$  B1 is more likely from ancestor groups A and B1, while ABD is a more diverse group with multiple sources of ancestry. Due to extensive recombination within these two hybrid groups, higher proportions of pathogens were assigned to these groups (7). Twenty-two isolates (27% of 82 ESBL-producing isolates) with the ESBL phenotype also carried the *aac(6')-Ib-cr* gene, re-



TABLE 1 Distribution and percentage of ESBL, AmpC, and PMQR genes

Gene	No. (%) of isolates									
	Czech Republic	France	Germany	Italy	Gdynia, Poland	Jaroslaw, Poland	Serbia	Spain	Switzerland	Total
ESBL genes										82 (100)
CTX-M-1	17		8		13	1				39 (48)
CTX-M-8	1									1 (1)
CTX-M-14					1			1		2 (2)
CTX-M-15	13		6		2		4			25 (30)
CTX-M-24	3				1					4 (5)
CTX-M-25						1				1 (1)
CTX-M-28			1							1 (1)
CTX-M-55			2							2 (2)
TEM-52	3					1				4 (5)
SHV-12			2							2 (2)
ND <sup>a</sup>	1									1 (1)
AmpC CMY-2	27				18	2				47 (100)
PMQR genes										62 (100)
<i>qnrS1</i>	25				11	12	1	5		54 (87)
<i>qnrS2</i>	1									1 (2)
<i>qnrB19</i>					4					4 (6)
<i>aac(6')-Ib-cr</i>							1			1 (2)
<i>qnrS1</i> and <i>qnrB19</i>	1				1					2 (3)

<sup>a</sup> ND, not detected.

responsible for resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides. Thirty-one (38%) and 17 isolates (21%) also carried *bla*<sub>TEM-1</sub> and *bla*<sub>OXA-1</sub>, respectively. In Germany, two SHV-12-producing isolates also carried the *qnrS1* gene (see Table S1 in the supplemental material).

Fifty-six (37%) of 152 cefotaxime-resistant *E. coli* isolates displayed the AmpC phenotype. The *bla*<sub>CMY-2</sub> gene was the only AmpC gene identified in 47 (31%) of the 152 cefotaxime-resistant *E. coli* isolates (Tables 1 and 3). The 47 CMY-2-producing *E. coli* isolates were members of phylogenetic groups A (*n* = 9 isolates, 19%), B1 (*n* = 3, 6%), B2 (*n* = 5, 11%), D (*n* = 6, 13%), A × B1 (*n* = 8, 17%), and ABD (*n* = 15, 32%); and the phylogenetic group of 1 isolate was not specified. Ten isolates (21%, *n* = 47) also carried *bla*<sub>TEM-1</sub>, and the *qnrB19*-like gene was found in one isolate. One isolate from Gdynia, Poland, carried the *qnrS1* and *bla*<sub>TEM-135</sub> genes (see Table S2 in the supplemental material).

A total of 355 (33%) of the 1,073 *E. coli* isolates evaluated were obtained by selective cultivation on medium with ciprofloxacin. Sixty-two (17%) of these 355 isolates carried PMQR genes, with the *qnrS1* gene being the most frequently detected (being found in 54 isolates from 5 countries). Other isolates carried the *qnrB19* or *aac(6')-Ib-cr* gene (Tables 1 and 4). Isolates with PMQR genes (total *n* = 62) belonged to phylogenetic groups A (*n* = 25 isolates, 40%), B1 (*n* = 9, 15%), A × B1 (*n* = 18, 29%) and ABD (*n* = 10, 16%). Forty-six isolates (74%) also carried *bla*<sub>TEM-1</sub>, and 7 isolates (11%) from a Polish locality contained *bla*<sub>TEM-32</sub> (see Table S3 in the supplemental material).

**Antibiotic resistance phenotypes.** Almost all (66 of 82) ESBL-producing isolates (80%) were multiresistant (resistant to three or more antibiotic groups) (see Table S1 in the supplemental material). ESBL-positive *E. coli* isolates showed resistance to sulfonamides (76%), tetracycline (61%), trimethoprim-sulfamethoxazole (57%), nalidixic acid (52%), ciprofloxacin (44%), streptomycin (27%),

gentamicin (23%), amoxicillin-clavulanic acid (16%), ceftazidime (16%), and chloramphenicol (7%). High levels of resistance to 7 to 11 antimicrobial agents were observed in the isolates from Czech and Serbian localities due to the presence of multidrug-resistant ESBL-producing *E. coli* clones and clonal complexes ST131 (*n* = 11), STC10 (*n* = 7), ST3014 (*n* = 2), and ST405 (*n* = 1). In the other localities, isolates with high rates of resistance to 7 to 10 antimicrobial agents were distributed among the predominant clonal complexes found in this study, i.e., STC10 (*n* = 5), STC155 (*n* = 2), and STC23 (*n* = 1); and isolates with high rates of resistance to 7 to 10 antimicrobial agents were found only sporadically among other minor complexes or STs (the number of multidrug-resistant isolates in each complex or ST does not exceed 1).

All AmpC-positive isolates were multiresistant (see Table S2 in the supplemental material) and showed resistance to ceftazidime (79%), nalidixic acid (51%), sulfonamides (36%), tetracycline (34%), streptomycin (30%), trimethoprim-sulfamethoxazole (28%), ciprofloxacin (23%), chloramphenicol (15%), and gentamicin (6%). Eleven of 18 AmpC-producing *E. coli* isolates in Gdynia, Poland, showed high levels of resistance to 7 to 11 antimicrobial agents and mainly belonged to complexes STC86 (*n* = 3), STC10 (*n* = 2), and STC155 (*n* = 2). In the Czech Republic, only 5 of 27 AmpC-producing isolates were highly multiresistant (7 to 11 antimicrobial agents) and showed various STs.

A total of 27 (44%) PMQR gene-positive isolates were multiresistant (see Table S3 in the supplemental material). PMQR gene-positive *E. coli* isolates showed resistance to ampicillin (85%), tetracycline (52%), nalidixic acid (35%), streptomycin (32%), sulfonamides (24%), trimethoprim-sulfamethoxazole (21%), amoxicillin-clavulanic acid (13%), ciprofloxacin (8%), chloramphenicol (6%), and gentamicin (2%). The isolates showing resistance to up to 7 to 9 antimicrobial agents belonged to three dominant clonal complexes found in this study: STC10 (*n* = 2), STC23 (*n* = 2), and

TABLE 2 Distribution of STs related to ESBL types in eight European countries

ESBL gene	ST	STC	Phylogenetic group <sup>c</sup>	No. (%) of isolates						
				Czech Republic	Germany	Gdynia, Poland	Jaroslaw, Poland	Serbia	Spain	Total
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	ST10 <sup>a</sup>	STC10	A	1	2	1				4
	ST48 <sup>a</sup>	STC10	A	2		1				3
	ST58 <sup>a</sup>	STC155	A × B1	7						7
	ST101	STC101	B1			1				1
	ST106	STC69	ABD		1					1
	ST115	STC38	ABD			4				4
	ST154	STC155	A × B1		1					1
	ST206 <sup>a</sup>	STC10	A × B1		1					1
	ST351 <sup>a</sup>	STC351	ABD				1			1
	ST394	STC69	ABD			1				1
	ST398 <sup>a</sup>	STC10	A × B1	1						1
	ST542 <sup>a</sup>	STC542	ABD	1						1
	ST609	STC10	A × B1			1				1
	ST617 <sup>a</sup>	STC10	A	1						1
	ST641 <sup>a</sup>	STC86	ABD			1				1
	ST669	STC10	A	1						1
	ST746 <sup>a</sup>	STC10	A	1		1				2
	ST1011	STC1011	ABD			1				1
	ST1141	STC10	A		1					1
	ST1725	STC23	A × B1		1					1
ST1832	STC1832	ABD	2						2	
ST2226	STC10	A		1					1	
ST3017 <sup>b</sup>	STC155	A × B1			1				1	
<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>	ST58 <sup>a</sup>	STC155	A × B1	1						1
<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	ST1642	STC155	A × B1						1	1
	ST3056 <sup>b</sup>	None	ABD			1				1
<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	ST10 <sup>a</sup>	STC10	A					1		1
	ST131 <sup>a</sup>	STC131	B2	8				3		11
	ST167 <sup>a</sup>	STC10	A		1	1				2
	ST361 <sup>a</sup>	STC361	A × B1		1					1
	ST398 <sup>a</sup>	STC10	A × B1		1					1
	ST405	STC405	ABD	1						1
	ST448 <sup>a</sup>	STC155	A × B1		1					1
	ST617 <sup>a</sup>	STC10	A	4						4
	ST1249	None	A × B1			1				1
	ST3015 <sup>a,b</sup>	STC10	A		1					1
ST3018 <sup>b</sup>	None	ABD		1					1	
<i>bla</i> <sub>CTX-M-24</sub>	ST3014 <sup>b</sup>	None	A	2		1				3
	ST3020 <sup>b</sup>	STC10	A	1						1
<i>bla</i> <sub>CTX-M-25</sub>	ST155 <sup>a</sup>	STC155	A × B1				1			1
<i>bla</i> <sub>CTX-M-28</sub>	ST167 <sup>a</sup>	STC10	A		1					1
<i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>	ST10 <sup>a</sup>	STC10	A		2					2
<i>bla</i> <sub>TEM-52</sub>	ST88	STC23	B1				1			1
	ST1638	STC10	A	2						2
	ST3019 <sup>b</sup>	None	ABD	1						1
<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	ST746 <sup>a</sup>	STC10	A		2					2
ND <sup>d</sup>	ST3223 <sup>b</sup>	STC131	B2	1						1
Total prevalence				38 (25.3)	19 (19)	17 (11.3)	3 (2)	4 (2.7)	1 (0.7)	82 (7.6)

<sup>a</sup> STs capable of carrying different plasmid-mediated resistance genes (ESBL, AmpC, PMQR genes) in our study.

<sup>b</sup> A novel ST.

<sup>c</sup> Phylogenetic groups were calculated using the Structure program. A × B1 and ABD are hybrid groups that were likely derived from ancestor groups A and B1 (A × B1) or multiple sources of ancestry (ABD) (7).

<sup>d</sup> ND, not detected.

TABLE 3 Distribution of STs related to the *bla*<sub>CMY-2</sub> AmpC gene in eight European countries

ST	STC	Phylogenetic group <sup>c</sup>	No. (%) of isolates			
			Czech Republic	Gdynia, Poland	Jaroslav, Poland	Total
ST10 <sup>a</sup>	STC10	A	3			3
ST23 <sup>a</sup>	STC23	B1		1		1
ST57	STC57	ABD		1		1
ST58 <sup>a</sup>	STC155	A × B1	2	2		4
ST69 <sup>a</sup>	STC69	ABD	2			2
ST93 <sup>a</sup>	STC10	A	2			2
ST95	STC95	B2			1	1
ST117	STC117	ABD	1	2		3
ST131 <sup>a</sup>	STC131	B2			1	1
ST351 <sup>a</sup>	STC351	ABD	4			4
ST354	STC354	ABD	1			1
ST429	STC429	B2	3			3
ST453	STC86	ABD		3		3
ST615	STC10	A × B1		2		2
ST665	None	ABD	1			1
ST770	STC770	D	1			1
ST963	STC38	D	3			3
ST1056	STC155	B1		1		1
ST1167	STC155	A × B1	2			2
ST1431	STC1431	B1		1		1
ST3274	STC10	A <sup>d</sup>		1		1
ST3568	None	A <sup>d</sup>		1		1
ST3778	STC117	D <sup>d</sup>	1			1
ST4274 <sup>b</sup>	STC57	D <sup>d</sup>	1			1
ST4275 <sup>b</sup>	STC10	A <sup>d</sup>		1		1
ST4276 <sup>b</sup>	STC10	A <sup>d</sup>		1		1
NT <sup>e</sup>				1		1
Total prevalence			27 (18)	18 (12)	2 (1.4)	47 (4.4)

<sup>a</sup> STs capable of carrying different plasmid-mediated resistance genes (ESBL, AmpC, PMQR genes) in our study.

<sup>b</sup> A novel ST.

<sup>c</sup> Phylogenetic groups were calculated using the Structure program. A × B1 and ABD are hybrid groups that were likely derived from ancestor groups A and B1 (A × B1) or multiple sources of ancestry (ABD) (7).

<sup>d</sup> Tested by multiplex PCR assay (26).

<sup>e</sup> NT, nontypeable.

STC155 ( $n = 2$ ). None of the PMQR gene-positive *E. coli* isolates selected on medium with ciprofloxacin were ESBL or AmpC producers.

**Clonal similarity and MLST of *E. coli* isolates carrying ESBL, AmpC, or PMQR genes.** Overall, all isolates tested by PFGE, except ESBL-producing strains in the Czech Republic, showed very high variability in all localities (see Fig. S1 to S3 in the supplemental material). Significant clonal similarity was demonstrated in the Czech Republic, where 3 of 16 clusters of 38 ESBL-producing strains represented by STs ST131 ( $n = 8$ , 21%), ST58 ( $n = 7$ , 18%), and ST617 ( $n = 5$ , 13%) were the most frequently identified. ST131 isolates were assigned to one cluster on the basis of a less stringent criterion (a Dice similarity index of their macrorestriction profiles of  $\geq 79.6\%$ ). The multilocus sequence types in Germany and Gdynia, Poland, were more variable. ST10 in Germany and ST115 forming one cluster in Gdynia, Poland, were predominant (see Fig. S1 in the supplemental material). Eight novel *E. coli* STs (Table 2) producing an ESBL were identified in our study. No significant clonal similarity between isolates carrying AmpC or PMQR genes was found in any location (see Fig. S2 and S3 in the supplemental material). In the Czech Republic, a cluster represented by ST351 ( $n = 4$ ) isolates carrying

*bla*<sub>CMY-2</sub> and ST48 ( $n = 4$ ) isolates harboring the *qnrS1* gene was predominant. Identical pulsotypes were found in each locality, but only in minimal amounts (not exceeding four). Three and six novel *E. coli* STs (Tables 3 and 4) with AmpC and PMQR genes, respectively, were identified. Six *E. coli* isolates were nontypeable by XbaI PFGE (see Fig. S1 and S3 in the supplemental material).

Overall, 91 different STs were determined among 191 ESBL- and AmpC-producing and PMQR gene-positive *E. coli* strains from 9 rook roosting places in 8 European countries, with ST58 ( $n = 15$ ), ST10 ( $n = 14$ ), and ST131 ( $n = 12$ ) being the predominant types (Tables 2 to 4). Thirty-seven percent (71 of 191) of the ESBL- and AmpC-producing and PMQR gene-positive *E. coli* strains belonged to clonal complex STC10. STC155 was the second-largest complex detected and included 33 isolates (17%). STC23 consisted of 8 isolates (4%). Genetic relatedness within each clonal complex can be seen in Fig. 1 (based on data from the MLST database [<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/>], accessed 23 July 2014).

Twelve isolates from the Czech Republic ( $n = 8$ ), Serbia ( $n = 3$ ), and Jaroslav, Poland ( $n = 1$ ), were identified to be pandemic multiresistant *E. coli* clone B2-O25b-ST131. Eleven ST131 isolates were positive for the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene and showed closely related

TABLE 4 Distribution of STs related to PMQR gene type in eight European countries

PMQR gene	ST	STC	Phylogenetic group <sup>c</sup>	No. (%) of isolates					Total	
				Czech Republic	Gdynia, Poland	Jaroslaw, Poland	Serbia	Spain		
<i>qnrS1</i>	ST10 <sup>a</sup>	STC10	A	1	1	1			3	
	ST23 <sup>a</sup>	STC23	B1			2			2	
	ST34	STC10	A	1					1	
	ST46	STC10	A		1				1	
	ST48 <sup>a</sup>	STC10	A	4					4	
	ST58 <sup>a</sup>	STC155	A × B1	2	1				3	
	ST69 <sup>a</sup>	STC69	ABD	1		1			2	
	ST93 <sup>a</sup>	STC10	A	1					1	
	ST155 <sup>a</sup>	STC155	A × B1	1	1				2	
	ST162	STC155	A × B1	1					1	
	ST206 <sup>a</sup>	STC10	A × B1			1			1	
	ST224	STC155	A × B1			1			1	
	ST345	STC23	B1			1			1	
	ST351 <sup>a</sup>	STC351	ABD	1					1	
	ST398 <sup>a</sup>	STC10	A × B1	1	1				2	
	ST399	STC399	A × B1	1					1	
	ST442	STC155	B1	1					1	
	ST450	STC4358	A	1					1	
	ST542 <sup>a</sup>	STC542	ABD		2				1	3
	ST762	STC10	A					1	1	
	ST767	STC155	A × B1			1			1	
	ST1137	STC10	A	2					2	
	ST1251	STC10	A	1					1	
	ST1433	None	A × B1		1				1	
	ST1582	STC155	A × B1		1				1	
	ST1720	ST86	ABD		1				1	
	ST1882	None	ABD			1			1	
	ST2179	None	A × B1	1					1	
	ST2526	None	B1					1	1	
	ST2705	STC10	A				1		1	
	ST2722	STC155	B1			3			3	
	ST3270 <sup>b</sup>	STC10	A	3					3	
	ST3271 <sup>b</sup>	STC542	ABD					1	1	
ST3273 <sup>b</sup>	STC10	A × B1		1				1		
ST3309 <sup>b</sup>	STC4358	A	1					1		
ST3310 <sup>b</sup>	STC23	B1					1	1		
<i>qnrS2</i>	ST10 <sup>a</sup>	STC10	A	1					1	
<i>qnrB19</i>	ST2491	STC10	A		2				2	
	ST3107	STC10	A × B1		1				1	
	ST3272 <sup>b</sup>	STC10	A		1				1	
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	ST90	STC23	A × B1				1		1	
<i>qnrS1-qnrB19</i>	ST641 <sup>a</sup>	STC86	ABD	1					1	
	ST3272 <sup>b</sup>	STC10	A		1				1	
Total prevalence				27 (18)	16 (10.7)	12 (8.1)	2 (1.3)	5 (3.3)	62 (5.8)	

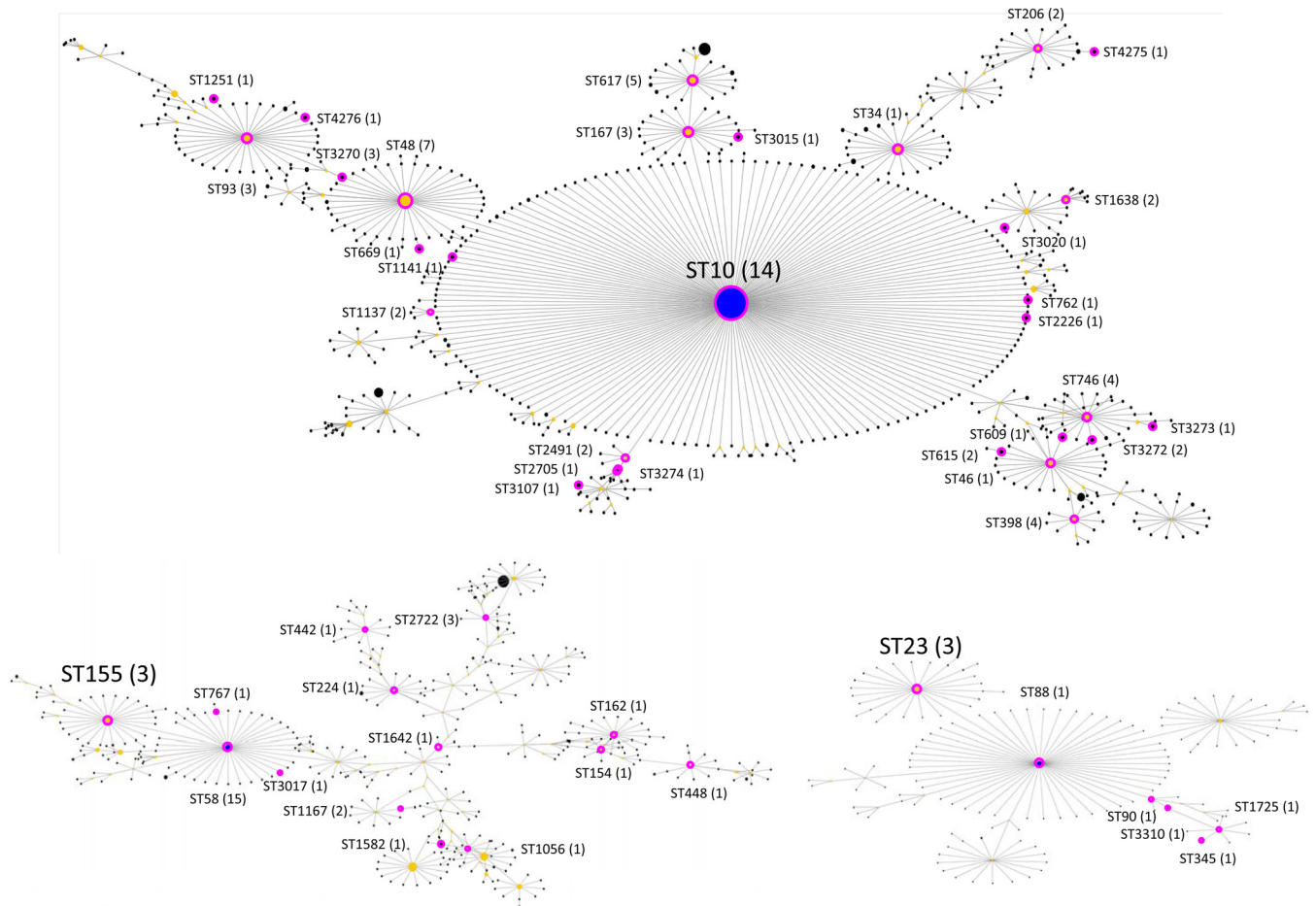
<sup>a</sup> STs capable of carrying different plasmid-mediated resistance genes (ESBL, AmpC, PMQR genes) in our study.

<sup>b</sup> A novel ST.

<sup>c</sup> Phylogenetic groups were calculated using the Structure program. A × B1 and ABD are hybrid groups that were likely derived from ancestor groups A and B1 (A × B1) or multiple sources of ancestry (ABD) (7).

PFGE profiles (defined by a 79.6% band similarity). Six isolates carried all three resistance genes (*bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *aac(6')-Ib-cr*) typical for this pandemic clone; moreover, the plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrB1* was detected in two isolates. The remaining six ST131 isolates carried the *bla*<sub>OXA-1</sub> and *aac(6')-Ib-cr* genes. One ST131 isolate from Jaroslaw, Poland, carried the *bla*<sub>CMY-2</sub> gene.

According to MLST, other important sequence types were found in our study. Four ST69 isolates from the Czech Republic ( $n = 3$ ) and Jaroslaw, Poland ( $n = 1$ ), carried *bla*<sub>CMY-2</sub> ( $n = 2$ ) and *qnrS1* ( $n = 2$ ) genes (Tables 3 and 4). An ST95 strain ( $n = 1$ ) from Jaroslaw, Poland, and ST117 strains ( $n = 3$ ) from the Czech Republic ( $n = 1$ ) and Gdynia, Poland ( $n = 2$ ), carried AmpC beta-lactamase CMY-2 (Table 3). One *bla*<sub>CTX-M-15-pro-</sub>



**FIG 1** eBURST diagram showing the clustering of *E. coli* STs belonging to the three main complexes (STC10, STC23, and STC155) that were isolated from the feces of European rooks. Each ST is represented as a node. Single-locus variants are connected with a line. The STs found in our study are displayed as numbered STs in a pink circle. Blue, predicted founders; yellow, subgroup founders. Clonal complex designations are based on the STs which originally constituted the respective clonal complexes. Designations of complexes constituted by merging of two or more former complexes are based on the designation of the oldest such (sub)complex (25).

ducing isolate from the Czech Republic belonged to ST405 (Table 2).

**DISCUSSION**

The most predominant ESBL gene in our study was *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (*n* = 39; 48%), followed by *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (*n* = 25; 30%). The distribution of the other ESBLs was rare and local. We assume that both humans and domestic animals are the likely sources of the ESBL genes found in the rook *E. coli* isolates. CTX-M-14 and CTX-M-15 are the major ESBL types in human strains worldwide (11, 13). On the other hand, the most frequently reported ESBL in European animal isolates is CTX-M-1, followed by CTX-M-14, TEM-52, and SHV-12 (1). CTX-M-1 is the most predominant ESBL type in isolates from companion and food-producing animals and occurs to a lesser extent in humans (11). The presence of CTX-M-24 in rook isolates from the Czech Republic and Poland constitutes an interesting finding, since this ESBL type is generally restricted to Asia (27) and reported only sporadically in other parts of the world (28). The highest prevalence of rooks colonized by ESBL producers (*n* = 38, 25.3%) was in the Czech Republic. The sampling site in the Czech Republic was located in the Na-

tional Nature Reserve, which is surrounded by fields, agricultural production areas, and urban agglomerations and which has a wastewater treatment plant and garbage dumps nearby. The distribution of ESBL genes closely corresponded to that previously described in hospital facilities (29, 30), domestic animals (31), and the environment, including wild birds and wastewater treatment plant effluent (5, 32, 33), within that country. In Germany, the highest distribution of ESBL-producing *E. coli* strains was found at two sampling sites. In a rural area with high level of agriculture, the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene was predominant (60%), while the second location, an urban area near a hospital clinic, showed high proportions of isolates carrying *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (50%) and *bla*<sub>SHV-12</sub> (25%). On the other hand, *E. coli* strains from rooks in localities in Spain, Italy, and France with known high percentages of ESBL-producing strains in humans (34) showed a very low (0.0 to 0.3%) prevalence of ESBLs. Our results likely reflect the lower levels of environmental contamination by ESBL-producing bacteria in the specific localities near the roosting places examined.

The only AmpC beta-lactamase detected in our study was CMY-2, found in *E. coli* isolates from the Czech Republic and Poland. CMY-2 is the most common type of AmpC enzymes



among *Enterobacteriaceae* in farm and companion animals, food products, as well as humans. Other types of AmpC beta-lactamases are scarcely reported (1, 11). It has been suggested that poultry can be an important reservoir of CMY-2 AmpC beta-lactamases (1).

The most predominant PMQR gene found among *E. coli* isolates in our study was *qnrS1*. Other PMQR genes, *qnrS2*, *qnrB19*, and *aac(6′)-Ib-cr*, were less frequently detected and showed a local distribution. The locations most affected by a noticeable colonization of rooks by PMQR gene-harboring *E. coli* isolates were the roosting places in the Czech Republic and Poland. The occurrence of *qnrS* genes in *E. coli* isolates from wild water birds has been previously described in the Czech Republic and on the Baltic Sea coast of Poland (5). A high prevalence of the *qnrS1* gene among *Salmonella* spp. and *E. coli* isolates from domestic animals, food, and the environment has been reported in Germany, Italy, Poland, and Spain (35). On the basis of the findings of a recent study from the Czech Republic, broilers could be considered a source of *qnrS1*- and *qnrB19*-harboring *E. coli* isolates (36). The roosting place examined in the Czech Republic is surrounded by poultry farms that spread the bedding material onto the fields as fertilizer, and this material likely serves as a source of PMQR gene-positive bacteria in the environment where the rooks seek food. Rooks from night roosts in Gdynia, Poland, use both urbanized areas and the municipal rubbish dump as foraging sites. Hence, these birds may have been in contact with different sources of these genes from the human environment.

PFGE analysis and MLST demonstrated a significant clonal similarity among the ESBL-producing isolates only in the Czech location. Notably, more than one-third of all ESBL- and AmpC-producing isolates belonged to extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC)-linked phylogenetic groups B2 and ABD, a hybrid group which contains, among others, internationally successful STs, such as ST69, ST95, ST117, and ST405 (7, 8, 14). It seems that these two hybrid groups, A × B1 and ABD, comprise isolates with a high frequency of recombination and therefore more frequently contain pathogens (7). Antibiotic-resistant ST69 is a lineage highly associated with urinary tract infections (UTIs) that is disseminated worldwide (13, 14). Isolates of ST95 are prominent, highly invasive, and virulent pathogens responsible for human and avian infections (12, 14). ST405 has been described to be a producer of various CTX-M types worldwide and is also associated with New Delhi metallo-β-lactamases (NDM-β-lactamases) and OXA-48 (8). The main representative of phylogroup B2 in our collection was an internationally disseminated uropathogenic clone (clone O25:H4-ST131) producing CTX-M-15. In the Czech Republic and Serbia, high proportions of the rook isolates belonged to ST131. In the Czech Republic, the ST131 clone has been recorded in hospital-onset infections and wastewaters (29, 30, 32). On the other hand, PMQR gene-positive strains belonged almost exclusively to phylogenetic groups A, B1, and A × B1 (84%) and only sporadically to other groups.

Although the STs identified in our study were diverse, with 91 different STs being found among 191 ESBL- and AmpC-producing and PMQR gene-positive *E. coli* strains, 37% of the *E. coli* strains belonged to or were closely related to STC10, followed by STC155 and STC23. STC10 includes pathogenic heterogeneous enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), ExPEC, as well as commensal *E. coli* strains found in humans and food-producing animals (14, 37, 38). STC10 members contribut-

ing to the spread of various ESBL and AmpC genes are widely described in relation to hospital-onset infections (39, 40), but they have also been reported in food animals in the Netherlands, the United Kingdom, and France (41–43). The two main representatives of STC155 in our study were ST58 and ST155. CTX-M-producing STC155 is closely linked to UTIs (44), and it has recently been reported from Italy, Spain, and Israel (40). Moreover, the STC155 members were associated with various infections in livestock in Europe (42, 43). ESBL-producing STC23 is commonly isolated in hospitals in Spain and France (45, 46), but this clonal complex has also been detected in samples obtained from food-producing animals and chicken meat (38, 41, 42).

Our study demonstrates the high rate of occurrence of common STs or their single- and double-locus variants known to be EAEC, ExPEC, and ETEC isolates or isolates previously associated with UTIs. Identical ESBL and/or PMQR genes and *E. coli* clonal lineages such as those found in rooks have been previously reported in humans and domestic animals, thus indicating the plausible sources of the antibiotic-resistant bacteria for rooks. The finding of these bacteria in wildlife likely reflects the presence of such isolates in the birds' food and water sources as a result of inadequate decontamination procedures for wastes of various origins. On the basis of the data in the MLST database (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/>), most STs found in rooks are important human and animal pathogens; their common presence in the environment, including wildlife, is alarming and should be taken as a serious environmental health risk. Wintering rooks inhabiting urban, suburban, and agricultural areas may contribute to the further dissemination of clinically important multiresistant *E. coli* clones.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant no. NT/14398 from the Ministry of Health of the Czech Republic and a project of CEITEC (Central European Institute of Technology) (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from the European Regional Development Fund. M.D. and I.P. were supported by the operational programme Education for Competitiveness (CZ.1.07/2.3.00/30.0014) from the European Social Fund.

We thank Frank Borleis, Francisco de la Calzada, Lisa Guardone, Dragan Fabijan, Sebastian Franco, Susanne Homma, Ruben Gonzales Janez, Jiri Klimes, Adam Konecny, Cyrille Lejas, Benito Fuertes Marcos, Veronika Oravcova, Jakub Prochazka, Tomas Lang, Simona Krepelova, Zuzana Markova, Hana Dobiasova, Radim Petro, Marko Sciban, Marie Slavikova, Eva Suchanova, and Marko Tucakov for excellent cooperation in the field or in the laboratory. Our special thanks go to Lars Hansen (University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark), Lina Cavaco and Henrik Hasman (National Food Institute, Copenhagen, Denmark), and Lothar H. Wieler and Torsten Semmler (Free University Berlin, Berlin, Germany) for control strains and for advice on methodologies.

## REFERENCES

1. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2011. Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum beta-lactamases and/or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals. EFSA J 9:2322. <http://www.efsa.europa.eu/en/publications/efsajournal.htm>. Accessed 1 January 2014. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2322>.
2. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. Int J Antimicrob Agents 25:358–373. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.02.006>.
3. Luo YP, Li JY, Meng Y, Ma Y, Hu CQ, Jin SH, Zhang QS, Ding H, Cui SH. 2011. Joint effects of topoisomerase alterations and plasmid-

- mediated quinolone-resistant determinants in *Salmonella enterica* Typhimurium. *Microb Drug Resist* 17:1–5. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2010.0074>.
4. Guenther S, Ewers C, Wieler LH. 2011. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? *Front Microbiol* 2:246. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00246>.
  5. Literak I, Dolejska M, Janoszowska D, Hrusakova J, Meissner W, Rzycka H, Bzoma S, Cizek A. 2010. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. *Appl Environ Microbiol* 76:8126–8134. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01446-10>.
  6. Literak I, Micudova M, Tausova D, Cizek A, Dolejska M, Papousek I, Prochazka J, Vojtech J, Borleis F, Guardone L, Guenther S, Hordowski J, Lejas C, Meissner W, Marcos BF, Tucakov M. 2012. Plasmid-mediated quinolone resistance genes in fecal bacteria from rooks commonly wintering throughout Europe. *Microb Drug Resist* 18:567–573. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2012.0075>.
  7. Wirth T, Falush D, Lan RT, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MCJ, Ochman H, Achtman M. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 60:1136–1151. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>.
  8. Pitout JD. 2012. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Front Microbiol* 3:9. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00009>.
  9. Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Castanheira M. 2010. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clin Infect Dis* 51:286–294. <http://dx.doi.org/10.1086/653932>.
  10. Platell JL, Johnson JR, Cobbold RN, Trott DJ. 2011. Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. *Vet Microbiol* 153:99–108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.007>.
  11. Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. 2012. Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect* 18:646–655. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03850.x>.
  12. Guenther S, Grobbel M, Beutlich J, Guerra B, Ulrich RG, Wieler LH, Ewers C. 2010. Detection of pandemic B2-O25-ST131 *Escherichia coli* harbouring the CTX-M-9 extended-spectrum beta-lactamase type in a feral urban brown rat (*Rattus norvegicus*). *J Antimicrob Chemother* 65:582–584. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp496>.
  13. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35:736–755. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>.
  14. Manges AR, Johnson JR. 2012. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clin Infect Dis* 55:712–719. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis502>.
  15. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 3rd ed. Approved standard. Document M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
  16. Polsfuss S, Bloemberg GV, Giger J, Meyer V, Boettger EC, Hombach M. 2011. Practical approach for reliable detection of AmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 49:2798–2803. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00404-11>.
  17. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 14:90–103. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01846.x>.
  18. Dobiasova H, Dolejska M, Jamborova I, Brhelova E, Blazkova L, Papousek I, Kozlova M, Klimes J, Cizek A, Literak I. 2013. Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic. *FEMS Microbiol Ecol* 85:604–611. <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6941.12149>.
  19. Galas M, Decousser J-W, Breton N, Godard T, Allouch PY, Pina P, Collège de Bactériologie Virologie Hygiène (ColBVH) Study Group. 2008. Nationwide study of the prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in France. *Antimicrob Agents Chemother* 52:786–789. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00906-07>.
  20. Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee JH, Song JS, Jung HI, Sung KH, Jang SJ, Lee SH. 2005. Dissemination of transferable CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Korea. *J Appl Microbiol* 98:921–927. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02526.x>.
  21. Perez-Perez FJ, Hanson ND. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40:2153–2162. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002>.
  22. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21st informational supplement. M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
  23. Centers for Disease Control and Prevention. 2004. Standardized molecular subtyping of foodborne bacterial pathogens by pulse-field gel electrophoresis. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.
  24. Carrico JA, Pinto FR, Simas C, Nunes S, Sousa NG, Frazao N, de Lencastre H, Almeida JS. 2005. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 43:5483–5490. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.11.5483-5490.2005>.
  25. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 186:1518–1530. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.186.5.1518-1530.2004>.
  26. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66:4555–4558. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>.
  27. Nguyen TKN, Ha V, Tran VTN, Stabler R, Pham TD, Le TMV, van Doorn HR, Cerdeno-Tarraga A, Thomson N, Campbell J, Nguyen VMH, Tran TTN, Pham VM, Cao TT, Wren B, Farrar J, Baker S. 2010. The sudden dominance of *bla*<sub>CTX-M</sub> harbouring plasmids in *Shigella* spp. circulating in Southern Vietnam. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e702. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000702>.
  28. Pitout JDD, Gregson DB, Campbell L, Laupland KB. 2009. Molecular characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates causing bacteremia in the Calgary Health Region from 2000 to 2007: emergence of clone ST131 as a cause of community-acquired infections. *Antimicrob Agents Chemother* 53:2846–2851. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00247-09>.
  29. Dolejska M, Brhelova E, Dobiasova H, Krivdova J, Jurankova J, Sevcikova A, Dubska L, Literak I, Cizek A, Vavrina M, Kutnikova L, Sterba J. 2012. Dissemination of IncFII(K)-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing *Enterobacteriaceae* isolates from children in hospital paediatric oncology wards. *Int J Antimicrob Agents* 40:510–515. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.07.016>.
  30. Hrabak J, Empel J, Bergerova T, Fajfrlik K, Urbaskova P, Kern-Zdanowicz I, Hryniewicz W, Gniadkowski M. 2009. International clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases in a Czech hospital. *J Clin Microbiol* 47:3353–3357. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00901-09>.
  31. Dolejska M, Matulova M, Kohoutova L, Literak I, Bardon J, Cizek A. 2011. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in turkey meat production farms in the Czech Republic: national survey reveals widespread isolates with *bla*<sub>SHV-12</sub> genes on IncFII plasmids. *Lett Appl Microbiol* 53:271–277. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03099.x>.
  32. Dolejska M, Frolkova P, Florek M, Jamborova I, Purgertova M, Kutikova I, Cizek A, Guenther S, Literak I. 2011. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *J Antimicrob Chemother* 66:2784–2790. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr363>.
  33. Tausova D, Dolejska M, Cizek A, Hanusova L, Hrusakova J, Svoboda O, Camlik G, Literak I. 2012. *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe. *J Antimicrob Chemother* 67:1103–1107. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks017>.
  34. European Centre for Disease Prevention and Control. 2013. Annual epidemiological report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Sweden. [http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/\\_layouts/forms/Publication\\_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=989](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=989). <http://dx.doi.org/10.2900/13174>.

35. Veldman K, Cavaco LM, Mevius D, Battisti A, Franco A, Botteldoorn N, Bruneau M, Perrin-Guyomard A, Cerny T, Escobar CD, Guerra B, Schroeter A, Gutierrez M, Hopkins K, Myllyniemi AL, Sunde M, Wasyl D, Aarestrup FM. 2011. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *J Antimicrob Chemother* 66:1278–1286. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr084>.
36. Literak I, Reitschmied T, Bujnakova D, Dolejska M, Cizek A, Bardon J, Pokludova L, Alexa P, Halova D, Jamborova I. 2013. Broilers as a source of quinolone-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in the Czech Republic. *Microb Drug Resist* 19:57–63. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2012.0124>.
37. Olesen B, Scheutz F, Andersen RL, Menard M, Boisen N, Johnston B, Hansen DS, Krogfelt KA, Nataro JP, Johnson JR. 2012. Enteroaggregative *Escherichia coli* O78: H10, the cause of an outbreak of urinary tract infection. *J Clin Microbiol* 50:3703–3711. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01909-12>.
38. Shepard SM, Danzeisen JL, Isaacson RE, Seemann T, Achtman M, Johnson TJ. 2012. Genome sequences and phylogenetic analysis of K88- and F18-positive porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 194:395–405. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.06225-11>.
39. Peirano G, van der Bij AK, Gregson DB, Pitout JDD. 2012. Molecular epidemiology over an 11-year period (2000 to 2010) of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in a centralized Canadian region. *J Clin Microbiol* 50:294–299. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.06025-11>.
40. Izdebski R, Baraniak A, Fiett J, Adler A, Kazma M, Salomon J, Lawrence C, Rossini A, Salvia A, Samso JV, Fierro J, Paul M, Lerman Y, Malhotra-Kumar S, Lammens C, Goossens H, Hryniewicz W, Brun-Buisson C, Carmeli Y, Gniadkowski M, MOSAR WP2 and WP5 Study Groups. 2013. Clonal structure, extended-spectrum beta-lactamases, and acquired AmpC-type cephalosporinases of *Escherichia coli* populations colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. *Antimicrob Agents Chemother* 57:309–316. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01656-12>.
41. Cohen Stuart J, van den Munckhof T, Voets G, Scharringa J, Fluit A, Leverstein-Van Hall M. 2012. Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. *Int J Food Microbiol* 154:212–214. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.034>.
42. Wu GH, Ehrlich R, Mafura M, Stokes M, Smith N, Pritchard GC, Woodward MJ. 2012. *Escherichia coli* isolates from extraintestinal organs of livestock animals harbour diverse virulence genes and belong to multiple genetic lineages. *Vet Microbiol* 160:197–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.029>.
43. Dahmen S, Metayer V, Gay E, Madec JY, Haenni M. 2013. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of *Enterobacteriaceae* causing cattle mastitis in France. *Vet Microbiol* 162:793–799. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.015>.
44. Valverde A, Canton R, Garcillan-Barcia MP, Novais A, Galan JC, Alvarado A, de la Cruz F, Baquero F, Coque TM. 2009. Spread of *bla*<sub>CTX-M-14</sub> is driven mainly by IncK plasmids disseminated among *Escherichia coli* phylogroups A, B1, and D in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 53:5204–5212. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01706-08>.
45. Oteo J, Cercenado E, Fernandez-Romero S, Saez D, Padilla B, Zamora E, Cuevas O, Bautista V, Campos J. 2012. Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of pediatric infections: report of a neonatal intensive care unit outbreak due to a CTX-M-14-producing strain. *Antimicrob Agents Chemother* 56:54–58. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.05103-11>.
46. Cremet L, Caroff N, Giraudeau C, Dauvergne S, Lepelletier D, Reynaud A, Corvec S. 2010. Occurrence of ST23 complex phylogroup A *Escherichia coli* isolates producing extended-spectrum AmpC beta-lactamase in a French hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2216–2218. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01580-09>.



## Příloha 27

STUDENTOVA, V., DOBIASOVA, H., HEDLOVA, D., DOLEJSKA, M., PAPAGIANNITSIS, C.C., HRABAK, J., 2015, Complete nucleotide sequence of two NDM-1-encoding plasmids characterized from the same Sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae*: *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 59, p. 1325-1358.

### Souhrn

---

U kmene *K. pneumoniae* náležící k epidemickému klonu ST11 byly nalezeny dva plazmidy nesoucí gen pro karbapenemázu NDM-1. Jednalo se o první případ izolace této karbapenemázy v ČR. Cílem této studie bylo metodou nové generace sekvenování stanovit primární nukleotidovou sekvenci obou plazmidů. Kmen obsahoval dva (73 a 97 kb) plazmidy s primární sekvencí odvozenou od pKPX-1. Oba plazmidy sdílely oblast o velikosti 40 kb nesoucí mimo jiné platformu s *bla*<sub>NDM-1</sub>. Studie ukazuje na výměnu dlouhých multirezistentních úseků mezi různými plazmidy jako nástroj podporující šíření determinant rezistence k antibiotikům.



# Complete Nucleotide Sequences of Two NDM-1-Encoding Plasmids from the Same Sequence Type 11 *Klebsiella pneumoniae* Strain

V. Studentova,<sup>a</sup> H. Dobiasova,<sup>b,c</sup> D. Hedlova,<sup>d</sup> M. Dolejska,<sup>b,c</sup> C. C. Papagiannitsis,<sup>a,e</sup> J. Hrabak<sup>a,e</sup>

Department of Microbiology, Faculty of Medicine and University Hospital in Plzen, Charles University in Prague, Plzen, Czech Republic<sup>a</sup>; Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic<sup>b</sup>; CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic<sup>c</sup>; Department of Hospital Epidemiology, Central Military Hospital, Prague, Czech Republic<sup>d</sup>; Biomedical Center, Faculty of Medicine in Plzen, Charles University in Prague, Plzen, Czech Republic<sup>e</sup>

The sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* strain Kpn-3002cz was confirmed to harbor two NDM-1-encoding plasmids, pB-3002cz and pS-3002cz. pB-3002cz (97,649 bp) displayed extensive sequence similarity with the *bla*<sub>NDM-1</sub>-carrying plasmid pKPX-1. pS-3002cz (73,581 bp) was found to consist of an IncR-related sequence (13,535 bp) and a mosaic region (60,046 bp). A 40,233-bp sequence of pS-3002cz was identical to the mosaic region of pB-3002cz, indicating the *en bloc* acquisition of the NDM-1-encoding region from one plasmid by the other.

The emergence and spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) have caused a public health crisis of global dimensions (1). One of the carbapenemase groups observed in CPE is metallo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ Ls), mainly of the VIM, IMP, and NDM types. An NDM-1 enzyme was first described in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolated in Sweden in 2008 from an Indian patient transferred from a New Delhi hospital (2). Since then, NDM-1-producing bacteria, including clinical isolates of *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*, have been reported from the Indian subcontinent but also worldwide (1). The aim of the present study was to describe the first case of an NDM-1-producing *K. pneumoniae* isolate (Kpn-3002cz) identified in the Czech Republic. We also describe the sequences of two *bla*<sub>NDM-1</sub>-carrying plasmids harbored by Kpn-3002cz.

In March 2013, a 61-year-old female was admitted to the Central Military Hospital in Prague, Czech Republic. Since the patient was previously hospitalized (November to December 2012) in Kosice's hospital (Slovak Republic), routine screening for CPE was performed according to the recommendation published by the Ministry of Health of the Czech Republic. *K. pneumoniae* Kpn-3002cz, which was nonsusceptible to carbapenems, as determined by the broth dilution method (3) and interpreted according to the EUCAST criteria (<http://www.eucast.org/>), was isolated from a urine sample. Of all the drugs tested, Kpn-3002cz was susceptible to gentamicin only (Table 1).

Carbapenemase production was hypothesized to exist because of a positive result in the matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) meropenem hydrolysis assay (4). Kpn-3002cz was M $\beta$ L positive with the meropenem-EDTA combined-disk test (5). PCR screening for various M $\beta$ L genes (2, 6) and sequencing revealed the presence of *bla*<sub>NDM-1</sub>. Isoelectric focusing of  $\beta$ -lactamase extracts showed that Kpn-3002cz also produces  $\beta$ -lactamases, with pIs of 7.6 (most likely the species-specific penicillinase) and 9.0 (a highly basic  $\beta$ -lactamase, as is common among AmpC enzymes). PCR screening for various *ampC* genes (7) and sequencing revealed the presence of *bla*<sub>CMY-4</sub> that was in accordance with production of the  $\beta$ -lactamase, with a pI of 9.0. Multilocus sequence typing (MLST) (8) assigned Kpn-3002cz to sequence type 11 (ST11), which belongs to clonal complex 258 (CC258) (9).

Attempts to transfer  $\beta$ -lactam resistance to the *E. coli* A15 laboratory strain by conjugation in mixed broth cultures were unsuccessful. Next, plasmid DNA of Kpn-3002cz was extracted using a Nucleobond AX midi kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and used to transform *E. coli* strain DH5 $\alpha$  cells.  $\beta$ -Lactam-resistant transformants were obtained on Luria-Bertani agar plates with ampicillin (50 mg/liter) (Table 1) and confirmed to be NDM producers by PCR (2) and MALDI-TOF MS hydrolysis assay (4). Plasmid content analysis was carried out by pulsed-field gel electrophoresis of the total DNA digested with S1 nuclease (10). Then, the DNA was transferred to Hybond-N<sup>+</sup> nylon membrane (Amersham Biosciences, Buckingham, United Kingdom) and hybridized with a digoxigenin-labeled *bla*<sub>NDM</sub>-specific probe. The results revealed the presence of multiple plasmids in Kpn-3002cz, including molecules of ~80 kb, ~100 kb, ~160 kb, and ~200 kb. Moreover, plasmid analysis showed two types of transformants carrying either the ~80-kb plasmid pS-3002cz or the ~100-kb plasmid pB-3002cz. Both plasmids hybridized with the *bla*<sub>NDM</sub> probe (not shown).

Plasmid DNAs extracted from *E. coli* DH5 $\alpha$  transformants were sequenced using the 454 Genome Sequencer Junior system (Roche, Prague, Czech Republic) on a standard DNA fragment library. The reads were assembled using the GS *de novo* Assembler software. The sequence gaps on the plasmids were filled by sequencing of the PCR-produced fragments. The BLAST algorithm ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)), IS Finder ([www-is.biotoul.fr/](http://www-is.biotoul.fr/)),

Received 15 August 2014 Returned for modification 21 September 2014

Accepted 12 November 2014

Accepted manuscript posted online 24 November 2014

Citation Studentova V, Dobiasova H, Hedlova D, Dolejska M, Papagiannitsis CC, Hrabak J. 2015. Complete nucleotide sequences of two NDM-1-encoding plasmids from the same sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* strain.

Antimicrob Agents Chemother 59:1325–1328. doi:10.1128/AAC.04095-14.

Address correspondence to C. C. Papagiannitsis, c.papagiannitsis@gmail.com.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.04095-14

**TABLE 1** Antibiotic susceptibilities of the *K. pneumoniae* Kpn-3002cz isolate producing NDM-1 and CMY-4 and its *E. coli* DH5α transformants producing NDM-1

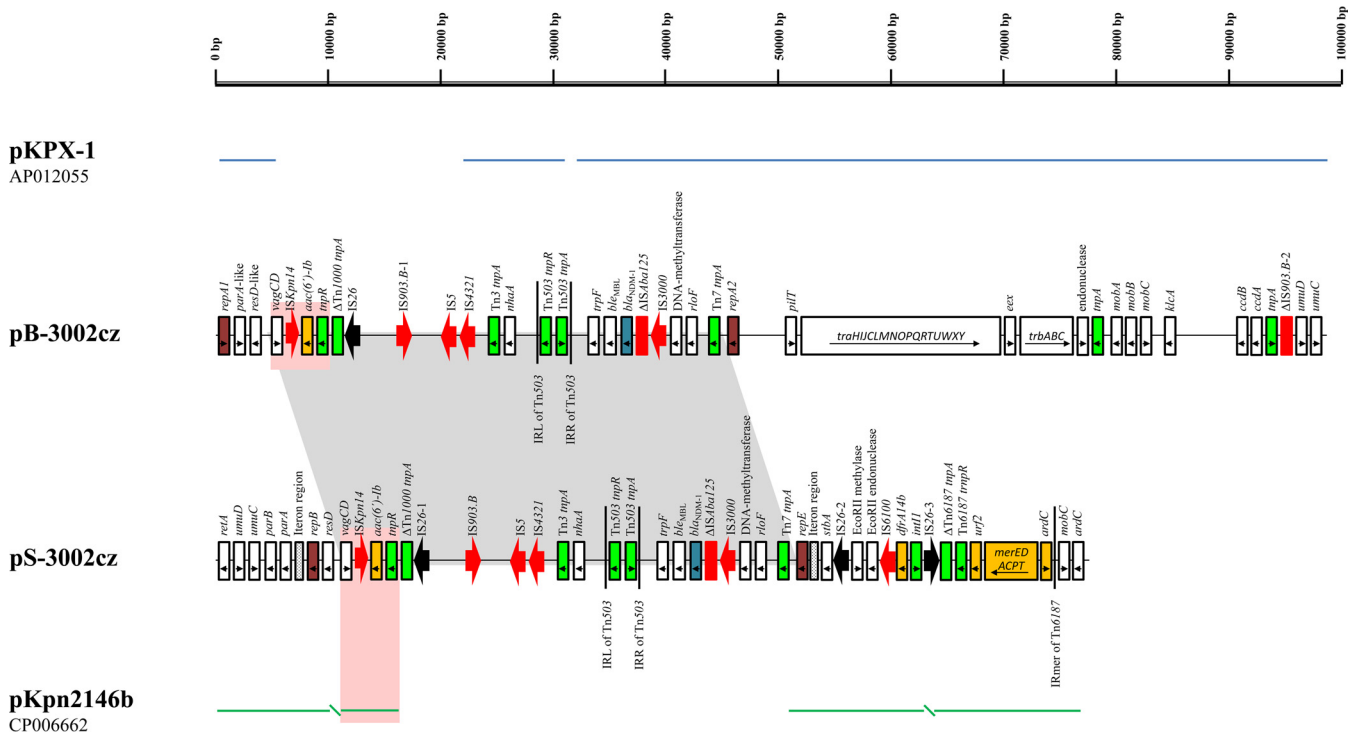
Isolate (plasmid)	MIC (mg/liter) for <sup>a</sup> :														
	Pip	Tzp	Ctx	Caz	Fep	Atm	Imp	Mem	Ert	Gen	An	Cml	Sxt	Col	Cip
<i>K. pneumoniae</i> Kpn-3002cz	>64	>64	>8	>32	>16	8	32	8	32	1	32	32	>32	4	>8
<i>E. coli</i> DH5α (pB-3002cz)	64	64	>8	>32	>16	0.094	2	0.75	1	0.5	8	2	1	0.25	≤0.06
<i>E. coli</i> DH5α (pS-3002cz)	64	64	>8	>32	8	0.032	1.5	0.19	1	≤0.12	4	2	1	0.25	≤0.06
<i>E. coli</i> DH5α (recipient)	≤0.5	1	≤0.06	≤0.25	≤0.125	0.047	0.19	0.032	0.008	≤0.12	≤0.5	≤1	1	≤0.5	≤0.06

<sup>a</sup> Pip, piperacillin; Tzp, piperacillin-tazobactam (inhibitor fixed at 4 μg/ml); Ctx, cefotaxime; Caz, ceftazidime; Fep, cefepime; Atm, aztreonam; Imp, imipenem; Mem, meropenem; Ert, ertapenem; Gen, gentamicin; An, amikacin; Cml, chloramphenicol; Sxt, trimethoprim-sulfamethoxazole; Col, colistin; Cip, ciprofloxacin.

and ORF Finder ([www.bioinformatics.org/sms/](http://www.bioinformatics.org/sms/)) were used for data analysis.

Plasmid pB-3002cz was found to be 97,649 bp in size, with an average G+C content of 53.2%. The sequencing data indicate that pB-3002cz is a derivative of the NDM-1-encoding plasmid pKPX-1 (90% coverage, 99% identity). pKPX-1 was characterized from an ST11 *K. pneumoniae* strain isolated in Taiwan from a patient previously hospitalized in a New Delhi (India) medical center (11). The similarities between pB-3002cz and pKPX-1 were localized in two main segments (Fig. 1). The first segment is composed of a contiguous 70,412-bp sequence (nucleotides [nt] 1 to 6065 and 33303 to 97649) containing a part of the plasmidic backbone and the NDM-1-encoding region. The plasmidic scaffold of pB-3002cz possesses a conjugative transfer region (*tra-trb*), the

*mobABC*, *ccdAB*, *vagCD*, and *umuDC* operons, and two *repA* genes. Similarly to pKPX-1, none of the *repA* genes were assigned to any of the known incompatibility (Inc) groups by the PCR-based replicon typing (PBRT) method (12). The NDM-1-encoding region is composed of *ble*<sub>MBL</sub>, *trpF*, *bla*<sub>NDM-1</sub>, and a 259-bp fragment of *ISAbal25* ( $\Delta$ *ISAbal25*). *ISAbal25* is disrupted by an *IS3000* element, as has also been found in the IncH plasmid pNDM-MAR (13). The remaining sequence of pB-3002cz, including the second pKPX-1-like segment (nt 21402 to 31550), comprises a mosaic structure containing intact insertion sequences ( $n = 5$ ) and fragments of various transposons ( $n = 4$ ). Furthermore, pB-3002cz showed a deletion of two big fragments of pKPX-1 being responsible for resistance to several antibiotics and for plasmid maintenance.



**FIG 1** Linear maps of two NDM-encoding plasmids, pB-3002cz and pS-3002cz. Open reading frames (ORFs) are shown as rectangles (arrows within the rectangles indicate the direction of transcription). Intact insertion sequences (ISs) are represented by arrows, while truncated ISs appear as rectangles. The replicons of the plasmids are indicated by purple rectangles. *bla*<sub>NDM-1</sub> genes, resistance genes, and transposases are shown in blue, orange, and green, respectively. The black arrows indicate IS26 elements; the other IS elements are shown in red. The remaining genes, including plasmidic scaffold regions, are indicated by white rectangles. The blue lines above the map of pB-3002cz correspond to highly similar sequences from plasmid pKPX-1, while the green line below the map of pS-3002cz corresponds to highly similar sequences from plasmid pKpn2146b. The gray shading shows the presence of the same NDM-1-encoding mosaic region on both pB-3002cz and pS-3002cz. Homologous regions, which might have been involved in a recombination event leading to the shaping of pS-3002cz, are indicated by pink shading. IRL, left inverted repeat; IRR, right inverted repeat.

The second plasmid, pS-3002cz, is 73,581 bp in size, with an average G+C content of 53.9%. Sequence analysis showed that pS-3002cz is a fusion derivative of pB-3002cz and pKpn2146b. pKpn2146b is one of the four plasmids harbored by *K. pneumoniae* strain ATCC BAA-2146 (Kpn2146), the first NDM-1-producing isolate from the United States (14). Kpn2146, which also belongs to ST11, was recovered from a patient who had received medical care in India. Of note is that pKpn2146b was not found to harbor *bla*<sub>NDM-1</sub>, which was carried by the IncA/C plasmid pNDM-US (14). pS-3002cz contains a 40,233-bp sequence (nt 10402 to 50634) encoding the NDM-1, which was identical to the entire mosaic region of pB-3002cz (100% coverage, 99% identity) (Fig. 1). The remaining 33,348-bp sequence of pS-3002cz consists of two segments sharing extensive similarities with sequences carried by pKpn2146b (100% coverage, 99% identity). The first segment, a contiguous 20,721-bp sequence (nt 1 to 10401 and 63262 to 73581), is composed of an IncR-derived fragment, which includes a *repB* gene (nt 6909 to 7775) being 100% identical to that found in the IncR plasmid pKP1780 (15), and a truncated Tn6187 transposon ( $\Delta$ Tn6187) (14). The second segment is an 11,807-bp sequence (nt 50635 to 62441) containing the *repE* gene (nt 51498 to 52253). *repE* showed limited nucleotide similarity (86%) with the replication region of the IncFIA plasmid pmk115 (12), which explains the failure of the PBRT method to classify pS-3002cz. However, pS-3002cz was found to be positive in an IncR-specific PCR assay (16).

In conclusion, this study presents the first NDM-1-producing *K. pneumoniae* strain in the Czech Republic. However, the clinical data of the patient indicate that the isolate was probably imported from Slovakia, a country with a currently unknown epidemiological situation regarding CPE (17). The production of NDM-1 occurs in ST11, which has been associated with NDM-1-producing isolates having an epidemiological link to the Indian subcontinent (18) and which has recently caused outbreaks in Greece (19).

Of note is that in Kpn-3002cz, *bla*<sub>NDM-1</sub> is carried on two plasmids, pB-3002cz and pS-3002cz, sharing the same NDM-1-encoding mosaic region (Fig. 1). Sequencing data suggest that the progenitor of pB-3002cz is a pKPX-1-like plasmid. Considering that pKPX-1-like plasmids are not common, the presence of pB-3002cz and pKPX-1 in two *K. pneumoniae* strains of the same ST underlines the importance of pKPX-1-like plasmids in the dissemination of the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene in different parts of the world. Furthermore, sequencing data indicate that *en bloc* acquisition of the NDM-1-encoding mosaic region from pB-3002cz by an IncR-type plasmid is a plausible hypothesis regarding the formation of pS-3002cz. At a certain step of the evolution of pS-3002cz, pKPX-1 and an IncR pKpn2146b-like plasmid may have formed a fusion structure via a recombination event between a homologous region (nt 6033 to 10111 in pB-3002cz; Fig. 1) upstream of the *resD* gene. After the resolution of the fusion structure, pS-3002cz evolved further through rearrangements facilitated by ISs. These findings underscore the spreading potential of large segments carrying resistance determinants, such as *bla*<sub>NDM-1</sub>, through the reshuffling of enterobacterial plasmids.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The nucleotide sequences of the plasmids pB-3002cz and pS-3002cz have been assigned the GenBank accession numbers KJ958926 and KJ958927, respectively.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by research project grant NT11032-6/2010 from the Ministry of Health of the Czech Republic and by the Charles University Research Fund (project no. P36) and CEITEC (grant CZ.1.05/1.1.00/02.0068). C. C. Papagiannitsis was supported by the project "Support of establishment, development, and mobility of quality research teams at the Charles University" (registration no. CZ.1.07/2.3.00/30.0022), and M. Dolejska was supported by the project "Molecular biology as a tool for integrating biomedical disciplines at VFU Brno" (registration no. CZ.1.07/2.3.00/30.0014), financed by The Education for Competitiveness Operational Programme (ECOP), funded by the European Social Fund (ESF) and the government budget of the Czech Republic.

## REFERENCES

- Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. 2011. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol* 19:588–595. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2011.09.005>.
- Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. 2009. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>NDM-1</sub>, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 53:5046–5054. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00774-09>.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2003. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clin Microbiol Infect* 9:1–7. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x>.
- Hrabák J, Studentová V, Walková R, Zemlicková H, Jakubu V, Chudáčková E, Gniadkowski M, Pfeifer Y, Perry JD, Wilkinson K, Bergerová T. 2012. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 50:2441–2443. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01002-12>.
- Hrabák J, Chudáčková E, Papagiannitsis CC. 2014. Detection of carbapenems in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect*, 20:839–853. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12678>.
- Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. 2007. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 59:321–322. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl481>.
- Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40:2153–2162. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002>.
- Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. 2005. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolate. *J Clin Microbiol* 43:4178–4182. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005>.
- Woodford N, Turton JF, Livermore DM. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35:736–755. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>.
- Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. 1995. A general method for the detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* 226:235–240. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1995.1220>.
- Huang TW, Chen TL, Chen YT, Lauderdale TL, Liao TL, Lee YT, Chen CP, Liu YM, Lin AC, Chang YH, Wu KM, Kirby R, Lai JF, Tan MC, Siu LK, Chang CM, Fung CP, Tsai SF. 2013. Copy number change of the NDM-1 sequence in a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate. *PLoS One* 8:e62774. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0062774>.
- Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 63:219–228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.018>.
- Hudson CM, Bent ZW, Meagher RJ, Williams KP. 2014. Resistance determinants and mobile genetic elements of an NDM-1-encoding *Klebsiella pneumoniae* strain. *PLoS One* 9:e99209. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0099209>.
- Villa L, Poirel L, Nordmann P, Carta C, Carattoli A. 2012. Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, and *qnrB1* genes. *J Antimicrob Chemother* 67:1645–1650. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks114>.
- Papagiannitsis CC, Miriagou V, Giakkoupi P, Tzouveleki LS, Vato-poulos AC. 2013. Characterization of pKP1780, a novel IncR plasmid

- from the emerging *Klebsiella pneumoniae* ST147, encoding the VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamsase. *J Antimicrob Chemother* 68:2259–2262. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt196>.
16. García-Fernández A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A. 2009. Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother* 63:274–281. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn470>.
  17. Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambić Andrašević A, Canton R, Carmeli Y, Friedrich AW, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Nordmann P, Poirel L, Rossolini GM, Seifert H, Vatopoulos AC, Walsh T, Woodford N, Donker T, Monnet DL, Grundmann H, European Survey on Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) Working Group. 2013. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveill* 18:pii=20525. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20525>.
  18. Giske CG, Fröding I, Hasan CM, Turlej-Rogacka A, Toleman M, Livermore D, Woodford N, Walsh TR. 2012. Diverse sequence types of *Klebsiella pneumoniae* contribute to the dissemination of *bla*<sub>NDM-1</sub> in India, Sweden, and the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2735–2738. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.06142-11>.
  19. Voulgari E, Gartzonika C, Vrioni G, Politi L, Priavali E, Levidiotou-Stefanou S, Tsakris A. 2014. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. *J Antimicrob Chemother* 69:2091–2099. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dku105>.

## Příloha 28

PAPAGIANNITSIS C.C., DOLEJSKA, M., IZDEBSKI, R., DOBIASOVA H., STUDENTOVA, V., ESTEVES, F.J., DERDE, L.P.G., BONTEN, M.J.M., HRABAK, J., GNIADKOWSKI, M., 2015, Characterization of pKP-M1144, a Novel ColE1-Like , Characterization of pKP-M1144, a novel ColE1-like plasmid encoding IMP-8, GES-5, and BEL-1  $\beta$ -lactamases, from a *Klebsiella pneumoniae* sequence type 252 isolate: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 59, p. 5065-5068.

### Souhrn

---

Byla stanovena primární nukleotidová sekvence ColE plazmidu z nosokomiálního izolátu *K. pneumoniae* ST252 s metalo-beta-laktamázou IMP-8 z Portugalska. Gen *bla*<sub>IMP-8</sub> byl součástí integronu třídy 3. V práci je diskutován možný původ a scénář evoluce tohoto plazmidu.





# Characterization of pKP-M1144, a Novel ColE1-Like Plasmid Encoding IMP-8, GES-5, and BEL-1 $\beta$ -Lactamases, from a *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 252 Isolate

Costas C. Papagiannitsis,<sup>a,b</sup> Monika Dolejska,<sup>c,d</sup> Radoslaw Izdebski,<sup>b</sup> Hana Dobiasova,<sup>c,d</sup> Vendula Studentova,<sup>a</sup> Francisco J. Esteves,<sup>e</sup> Lennie P. G. Derde,<sup>f</sup> Marc J. M. Bonten,<sup>f</sup> Jaroslav Hrabák,<sup>a,g</sup> Marek Gniadkowski<sup>b</sup>

Faculty of Medicine and University Hospital in Plzen, Charles University in Prague, Plzen, Czech Republic<sup>a</sup>; National Medicines Institute, Warsaw, Poland<sup>b</sup>; Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic<sup>c</sup>; CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic<sup>d</sup>; Centro Hospitalar, Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal<sup>e</sup>; University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands<sup>f</sup>; Biomedical Center, Faculty of Medicine in Plzen, Charles University in Prague, Plzen, Czech Republic<sup>g</sup>

**IMP-8 metallo- $\beta$ -lactamase was identified in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 252 (ST252), isolated in a Portuguese hospital in 2009. *bla*<sub>IMP-8</sub> was the first gene cassette of a novel class 3 integron, In1144, also carrying the *bla*<sub>GES-5</sub>, *bla*<sub>BEL-1</sub>, and *aacA4* cassettes. In1144 was located on a ColE1-like plasmid, pKP-M1144 (12,029 bp), with a replication region of limited nucleotide similarity to those of other RNA-priming plasmids, such as pJHCMW1. In1144 and pKP-M1144 represent an interesting case of evolution of resistance determinants in Gram-negative bacteria.**

Acquired carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs) are resistance determinants of increasing clinical importance in Gram-negative pathogens. Of these, enzymes mainly of the VIM, IMP, and NDM types have been encountered in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*. In contrast to *bla*<sub>NDM</sub> genes, *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>IMP</sub> occur as gene cassettes in class 1 integrons or, more rarely, integrons of class 2 or 3 (1–3). Here, we report on a novel class 3 integron, In1144, identified in a *K. pneumoniae* sequence type 252 (ST252) isolate from Portugal. In1144 codes for IMP-8 (4) and two other  $\beta$ -lactamases, GES-5 and BEL-1 (5, 6). It is located on a new ColE1-like plasmid, pKP-M1144, which was entirely sequenced in the study.

In 2009, *K. pneumoniae* strain Kpn-1144 was recovered from a patient in a Portuguese intensive care unit (ICU) of a hospital participating in the European Union (EU)-funded project MOSAR (7). During MOSAR, 17,945 patients in 18 clinical sites in Europe and Israel were screened for rectal carriage of expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* and were tested also for carbapenem susceptibility (7, 8). Kpn-1144 was extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) positive by the double-disk synergy test (9) and showed reduced susceptibility to carbapenems, according to the EUCAST screening cutoffs (10). The isolate was positive in the MBL EDTA double-disk synergy test (11), and carbapenemase production was confirmed by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (12). Table 1 presents the antimicrobial susceptibility data for Kpn-1144 determined by broth microdilution (13) and interpreted using the EUCAST criteria (<http://www.eucast.org/>). Of note, the MICs of carbapenems were relatively low (0.75 to 1  $\mu$ g/ml).

PCR screening for various MBL genes (14, 15) followed by sequencing revealed the presence of the *bla*<sub>IMP-8</sub> gene (4) in Kpn-1144. The multilocus sequence typing (MLST) analysis (16) classified the isolate into ST252. *K. pneumoniae* ST252 was originally identified in the United States in 2007 (<http://bigsdweb.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>), but recently, it was also found among VIM-1-producing isolates from different health care institutions in Barcelona, Spain (8, 17).

Attempts to transfer  $\beta$ -lactam resistance from Kpn-1144 to rifampin-resistant (Rif<sup>r</sup>) *Escherichia coli* strain A15 by conjugation were unsuccessful, in contrast to electroporation of *E. coli* strain DH5 $\alpha$  with purified plasmid DNA of Kpn-1144 (Qiagen maxi kit; Qiagen, Hilden, Germany). Transformants were selected on Luria-Bertani agar plates with ampicillin (50  $\mu$ g/ml), confirmed to be IMP producers by PCR (14), and tested for antimicrobial susceptibility (Table 1). The plasmid location of the *bla*<sub>IMP-8</sub> gene was demonstrated by the S1 nuclease analysis of Kpn-1144 and its transformant (18), followed by hybridization with a digoxigenin-labeled *bla*<sub>IMP</sub> probe. S1 profiling revealed multiple plasmids in Kpn-1144 comprising molecules of ~15 kb, ~100 kb, ~170 kb, ~230 kb, and ~340 kb, of which only the ~15-kb plasmid was also in the transformant and hybridized with the *bla*<sub>IMP</sub> probe (results not shown). This plasmid, designated pKP-M1144, was nontypeable by PCR-based replicon typing (PBRT) (19), and its whole nucleotide sequence was determined. Sequencing, assembly of the reads, filling of sequence gaps, and analysis and annotation of the plasmid sequence were performed as described previously (20).

Plasmid pKP-M1144 is 12,029 bp in size, with an average G+C content of 51.5%. Analysis of the sequence revealed that *bla*<sub>IMP-8</sub> is the first gene cassette of a unique class 3 integron structure, In1144 (Fig. 1), composed of 4,679 bp (nucleotides [nt] 1 to 4679). Upstream of *bla*<sub>IMP-8</sub>, the *intI3* gene encoding the class 3 integrase was

Received 20 April 2015 Returned for modification 13 May 2015

Accepted 29 May 2015

Accepted manuscript posted online 1 June 2015

Citation Papagiannitsis CC, Dolejska M, Izdebski R, Dobiasova H, Studentova V, Esteves FJ, Derde LPG, Bonten MJM, Hrabák J, Gniadkowski M. 2015. Characterization of pKP-M1144, a novel ColE1-like plasmid encoding IMP-8, GES-5, and BEL-1  $\beta$ -lactamases, from a *Klebsiella pneumoniae* sequence type 252 isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 59:5065–5068. doi:10.1128/AAC.00937-15.

Address correspondence to Costas C. Papagiannitsis, [c.papagiannitsis@gmail.com](mailto:c.papagiannitsis@gmail.com).

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.00937-15

TABLE 1 Antimicrobial susceptibility of *K. pneumoniae* Kp-1144 and the *E. coli* DH5 $\alpha$  transformant harboring the IMP-8-encoding plasmid pKP-M1144

Strain	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) of <sup>a</sup> :																
	AMX	AMC	PIP	TZP	CTX	CAZ	FEP	ATM	IPM	MEM	ETP	GEN	AMK	CHL	CST	SXT	CIP
<i>K. pneumoniae</i> Kpn-1144	>256	24	>64	32	>8	>32	16	48	0.75	1	0.5	4	8	>32	0.25	8	0.5
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pKP-M1144)	>256	24	64	8	>8	>32	16	2	0.5	0.5	0.25	0.5	1	2	0.25	1	$\leq 0.12$
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	4	2	2	0.5	$\leq 0.12$	$\leq 0.25$	$\leq 0.12$	$\leq 0.12$	$\leq 0.12$	$\leq 0.12$	$\leq 0.12$	0.12	0.5	$\leq 1$	$\leq 0.12$	1	$\leq 0.12$

<sup>a</sup> AMX, amoxicillin; AMC, amoxicillin-clavulanate (inhibitor fixed at 2  $\mu\text{g/ml}$ ); PIP, piperacillin; TZP, piperacillin-tazobactam (inhibitor fixed at 4  $\mu\text{g/ml}$ ); CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; IPM, imipenem; MEM, meropenem; ETP, ertapenem; GEN, gentamicin; AMK, amikacin; CHL, chloramphenicol; CST, colistin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; CIP, ciprofloxacin.

identified (21). The pKP-M1144 *intI3* exhibited 100% sequence identity to the *intI3* associated with *bla*<sub>GES-1</sub> in the IncQ-type plasmid pQ7 from *E. coli* strain TB7 from Switzerland (22) and 99% identity to that with *bla*<sub>IMP-1</sub> from *Serratia marcescens* strain AK9373 from Japan (23). Downstream of *bla*<sub>IMP-8</sub>, three other cassettes were found. The second one was *bla*<sub>GES-5</sub>, encoding the ESBL GES-5 that exhibits weak carbapenemase activity (5). This was followed by *bla*<sub>BEL-1</sub>, specifying the prototype enzyme of the ESBL family BEL, observed only in *Pseudomonas aeruginosa* so far (6). The last cassette was *aacA4*, encoding the acetyltransferase AAC(6')-Ib, which confers resistance to tobramycin, netilmicin, and amikacin (24). A putative promoter (TAGACA-N<sub>17</sub>-TAG GAT) was located within *intI3* and significantly differed from common and relatively strong class 1 integron promoters (25).

In1144 was inserted into a ColE1-like backbone of 2,737 bp (Fig. 1; nt 9293 to 12029). A DNA comparison showed that its 704-bp sequence (nt 9838 to 10541) had limited nucleotide similarity to replication regions of several RNA-priming plasmids (26–29). pKP-M1144 exhibited the highest similarity score with the replicon of pJHCMW1 (100% coverage, 75% identity) from *K.*

*pneumoniae* strain JHCK1 from Argentina (28). A consensus sequence for the ColE1 replication origin (*oriV*) (30) was located at positions 10414 to 10416. Additionally, putative regions containing the RNA transcripts RNA II and RNA I that control the initiation of DNA replication and the plasmid copy number (31) were identified (Fig. 1). RNA II (nt 9882 to 10417) acts as a primer for the initiation of replication, while RNA I (nt 9984 to 9883) is an antisense molecule that controls replication initiation by binding to RNA II and preventing primer formation. The RNA II and RNA I of pKP-M1144 were 78% and 68% identical, respectively, to the corresponding transcripts from pJHCMW1 (28). Downstream of *oriV*, a 192-bp sequence resembling the *rom* gene (96% identity) of pNBL63 from *Klebsiella oxytoca* strain NBL63 (29) was present (nt 10589 to 10780). The Rom (or Rop) protein enhances the interaction of the RNA I inhibitor with its target, thus resulting in a reduction of the replication initiation frequency (32). Just next to *rom*, an *excI*-like sequence of 423 bp, exhibiting 95% identity with that of pNE1280 from *Enterobacter cloacae* strain 1623 (33), was identified (nt 10780 to 11202). The Exc1 protein (entry exclusion protein 1) may reduce the formation of stable mating pairs (26). Of note is that an *excI*-like gene, whose putative product showed low amino acid similarity (41%) with the putative Exc1 of pKP-M1144, has also been found downstream of the *rom* gene in pNBL63 (29). In the remaining part of pKP-M1144 (nt 4680 to 9292), a 37-bp segment similar to the replication region of IncQ plasmids ( $\Delta$ *repC*) (22) was found at the boundary of In1144, 258 bp downstream of *aacA4*. The *repC* gene at a similar position was identified in the IncQ plasmid pQ7 with the *bla*<sub>GES-1</sub>-carrying class 3 integron (22). Upstream of  $\Delta$ *repC*, the intact transposon Tn5403 was found (34).

Although no origin-of-transfer (*oriT*) and ColE1 *mob* genes (35) were identified in pKP-M1144, the mobilization capability of the plasmid was tested. pKP-M1144 was introduced into *E. coli* strain XL1-Blue that harbors the fertility factor F', being an IncFIA-type conjugative plasmid. The resulting transformants were used in mating experiments with *E. coli* A15 Rif<sup>r</sup> (8). Transconjugants were selected on MacConkey agar plates with rifampin (150  $\mu\text{g/ml}$ ) and ampicillin (50  $\mu\text{g/ml}$ ) and confirmed to carry the ~15-kb plasmid pKP-M1144. The transfer of pKP-M1144 was achieved at a relatively high frequency ( $2 \times 10^{-5}$  *bla*<sub>IMP</sub>-positive recombinants per donor cell), indicating its capability to be mobilized by plasmids with apparently different conjugation systems. This finding might be explained by the presence of a sequence with limited identity with the ColE1 *oriT* (28); however, a fur-

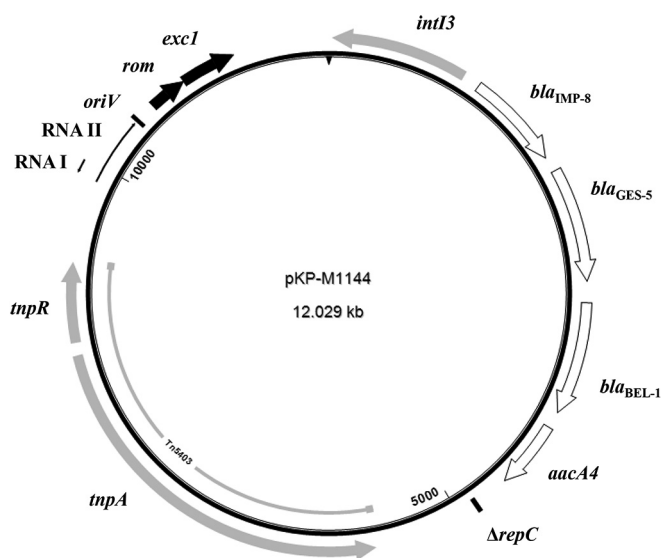


FIG 1 Circular genetic map of pKP-M1144. Arrows show directions of transcription of open reading frames and regulatory elements. Sequences characteristic of the ColE1-like plasmid backbone are indicated by black arrows. The *intI3* gene and transposases are shaded gray. White arrows indicate the resistance genes. Position 1 is indicated by a vertical black arrow on strand ruler.

ther study is necessary to prove this hypothesis and characterize the putative *oriT*.

To our knowledge, this is the first description of a *bla*<sub>IMP</sub>-carrying class 3 integron identified in Europe. In1144 also carries the *bla*<sub>GES-5</sub>, *bla*<sub>BEL-1</sub>, and *aacA4* gene cassettes. Of note was that Kpn-1144 showed only reduced susceptibility to carbapenems, even though it produced IMP-8 and GES-5 carbapenemases. It might be due to lower expression driven by a weaker promoter (25), low plasmid copy number, and/or good permeability of the outer membrane of the strain for antibiotics.

In general, IMP-like MBLs have been much more common in the Far East than in Europe (3), and class 3 integrons with MBL genes, exclusively *bla*<sub>IMP</sub>, have occurred rarely and only in Japan so far (23, 36). In 2010, the *bla*<sub>IMP-8</sub> cassette was reported in *K. oxytoca* in Spain and *Pseudomonas mendocina* in Portugal, but it was located in class 1 integrons (37, 38); moreover, the cassettes *bla*<sub>GES-5</sub> and *bla*<sub>BEL-1</sub> have been found exclusively in such elements so far (5, 6). All these observations suggest that In1144 emerged by the exchange of resistance cassettes between class 1 and class 3 integrons. Moreover, the presence of *bla*<sub>BEL-1</sub> in Kpn-1144 is the first report on a BEL-type ESBL in *Enterobacteriaceae*, suggesting its acquisition from *P. aeruginosa*. In1144 is carried by a new ColE1-like plasmid, pKP-M1144, but the presence of the IncQ-derived *ΔrepC* next to the integron suggests that it may have originated from an IncQ-like plasmid with a class 3 integron, like pQ7 (22). A plausible hypothesis is that this class 3 integron was acquired by a ColE1-like replicon from an IncQ-type plasmid at a certain step in pKP-M1144 evolution; however, it is not known whether this was In1144 already or any of its possible progenitors. This work confirms the significant role of ColE1-like plasmids in resistance dissemination (29, 39–41) and documents an interesting case of evolution of mobile genetic elements with resistance determinants in Gram-negative bacteria.

The nucleotide sequence of the plasmid pKP-M1144 has been assigned the GenBank accession no. [KF745070](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF745070).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Baraniak and J. Fiett for their assistance, and the curator team of the Institute Pasteur in Paris, France, for curating the MLST data of *K. pneumoniae* and making them publicly available.

This work was supported by funding from the European Community (MOSAR network contract LSHP-CT-2007-037941). It was also financed in part by grant NT11032-6/2010 from the Ministry of Health of the Czech Republic and grant P36 by the Charles University Research Fund.

We declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Bebrone C. 2007. Metallo- $\beta$ -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol* 74:1686–1701. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2007.05.021>.
2. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. 2011. Metallo- $\beta$ -lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams? *Lancet Infect Dis* 11:381–393. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70056-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70056-1).
3. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. 2012. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 25: 682–707. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.05035-11>.
4. Yan JJ, Ko WC, Wu JJ. 2001. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo- $\beta$ -lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2368–2371. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.8.2368-2371.2001>.
5. Vourli S, Giakkoupi P, Miriagou V, Tzelepi E, Vatopoulos AC, Tzouveleki LS. 2004. Novel GES/IBC extended-spectrum  $\beta$ -lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 234:209–213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2004.03.028>.
6. Poirel L, Brinas L, Verlinde A, Ide L, Nordmann P. 2005. BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, and the class 1 integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3743–3748. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.9.3743-3748.2005>.
7. Derde LP, Cooper BS, Goossens H, Malhotra-Kumar S, Willems RJ, Gniadkowski M, Hryniewicz W, Empel J, Daurzenberg MJ, Annane D, Aragão I, Chalfine A, Dumpis U, Esteves F, Giamarellou H, Muzlovic I, Nardi G, Petrikos GL, Tomic V, Martí AT, Stammet P, Brun-Buisson C, Bonten MJ; MOSAR WP3 Study Team. 2013. Interventions to reduce colonization and transmission of antimicrobial-resistant bacteria in intensive care units: an interrupted time series study and cluster randomised trial. *Lancet Infect Dis* 14:31–39.
8. Papagiannitsis CC, Izdebski R, Baraniak A, Fiett J, Herda M, Hrabak J, Derde LPG, Bonten MJM, Carmeli Y, Goossens H, Hryniewicz W, Brun-Buisson C, Gniadkowski M; MOSAR WP2, WP3, and WP5 Study Groups. 2015. Survey of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* colonizing patients in European ICUs and rehabilitation units, 2008–11. *J Antimicrob Chemother*, in press.
9. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 14(Suppl 1):90–103.
10. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2013. EUCAST guideline for the detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (EUCAST), Basel, Switzerland. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf).
11. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. 2003. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- $\beta$ -lactamase producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 41:4623–4629. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.10.4623-4629.2003>.
12. Papagiannitsis CC, Študentova V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, Petinaki E, Hrabak J. 2015. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , a reliable tool for the direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol* 53:1731–1735.
13. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2003. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clin Microbiol Infect* 9:1–7. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00790>.
14. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. 2007. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 59:321–322.
15. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. 2009. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>NDM-1</sub>, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 12 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 53:5046–5054. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00774-09>.
16. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont A, Brisse S. 2005. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolate. *J Clin Microbiol* 43:4178–4182. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005>.
17. Coelho A, Piedra-Carrasco N, Bartolome R, Quintero-Zarate JN, Larrosa N, Conejo-Sanchez T, Prats G, Garcillan-Barcia MP, de la Cruz F, Gonzalez-Lopez JJ. 2012. Role of IncHI2 plasmids harbouring *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *aac(6')*-Ib and *qnrA* genes in the spread of multiresistant *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* strains in different units at Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. *Int J Antimicrob Agents* 39: 514–517. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.01.006>.
18. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. 1995. A general method for the detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* 226:235–240.
19. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replication typing. *J Microbiol Methods* 63:219–228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.018>.
20. Študentova V, Dobiasova H, Hedlova D, Dolejska M, Papagiannitsis CC, Hrabak J. 2015. Complete nucleotide sequences of two NDM-1-encoding plasmids from the same sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 59:1325–1328. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.04095-14>.



21. Collis CM, Kim MJ, Patridge SR, Stokes HW, Hall RM. 2002. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J Bacteriol* 184:3017–3026. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.184.11.3017-3026.2002>.
22. Poirel L, Carattoli A, Bernabeu S, Bruderer T, Frei R, Nordmann P. 2010. A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 65:1594–1598. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq166>.
23. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayanankin R, Ohsuka S, Kato N, Ohta M. 1995. A novel integron-like element carrying the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>IMP</sub>. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1612–1615. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.39.7.1612>.
24. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 57:138–163.
25. Papagiannitsis CC, Tzouveleki LS, Miriagou V. 2009. Relative strengths of the class 1 integron promoter hybrid 2 and the combinations of strong and hybrid 1 with an active P2 promoter. *Antimicrob Agents Chemother* 53:277–280. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00912-08>.
26. Chan PT, Ohmori H, Tomizawa J, Lebowitz J. 1985. Nucleotide sequence and gene organization of ColE1 DNA. *J Biol Chem* 260:8925–8935.
27. Nomura N, Murooka Y. 1994. Characterization and sequencing of the region required for replication of a non-selftransmissible plasmid pEC3 isolated from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J Ferment Bioeng* 78:250–254. [http://dx.doi.org/10.1016/0922-338X\(94\)90299-2](http://dx.doi.org/10.1016/0922-338X(94)90299-2).
28. Dery KJ, Chavideh R, Waters V, Chamoro R, Tomalsky LS, Tomalsky ME. 1997. Characterization of the replication and mobilization regions of the multiresistance *Klebsiella pneumoniae* plasmid pJHCMW1. *Plasmid* 38:97–105. <http://dx.doi.org/10.1006/plas.1997.1303>.
29. Wu SW, Dornbusch K, Kronvall G, Norgen M. 1999. Characterization and nucleotide sequence of a *Klebsiella oxytoca* cryptic plasmid encoding a CMY-type beta-lactamase: confirmation that the plasmid-mediated cephamycinase originated from the *Citrobacter freundii* AmpC beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1350–1357.
30. Tomizawa JI, Ohmori H, Bird RE. 1977. Origin of replication of colicin E1 plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:1865–1869. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.74.5.1865>.
31. Polisky B. 1988. ColE1 replication control circuitry: sense from antisense. *Cell* 55:929–932. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90235-8](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(88)90235-8).
32. Cesareni G, Helmer-Citterich M, Castagnoli L. 1991. Control of ColE1 plasmid replication by antisense RNA. *Trends Genet* 7:230–235. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-9525\(91\)90370-6](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9525(91)90370-6).
33. Bryant KA, Van Schooneveld TC, Thapa I, Bastola D, Williams LO, Safranek TJ, Hinrichs SH, Rupp ME, Fey FD. 2013. KPC-4 is encoded within a truncated Tn4401 in an IncL/M plasmid, pNE1280, isolated from *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 57:37–41. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01062-12>.
34. Rinkel M, Hubert JC, Roux B, Lett MC. 1994. Identification of a new transposon Tn5403 in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a polluted aquatic environment. *Curr Microbiol* 29:249–254. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01577436>.
35. Warren GJ, Saul MW, Sherratt DJ. 1979. ColE1 plasmid mobility: essential and conditional functions. *Mol Gen Genet* 170:103–107.
36. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, Shimokata K, Kato N, Ohta M. 1996. PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (*bla*<sub>IMP</sub>) in Gram-negative rods resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams. *J Clin Microbiol* 34:2909–2913.
37. Conejo MC, Dominguez MC, López-Cerero L, Serano L, Rodríguez-Baño J, Pascual A. 2010. Isolation of multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca* carrying *bla*<sub>IMP-8</sub>, associated with OXY hyperproduction in the intensive care unit of a community hospital in Spain. *J Antimicrob Chemother* 65:1071–1073. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq063>.
38. Santos C, Caetano T, Ferreira S, Mendo S. 2010. First description of *bla*<sub>IMP-8</sub> in a *Pseudomonas mendocina* isolated at the Hospital Infante D. Pedro, Aveiro, Portugal. *Res Microbiol* 161:305–307.
39. Cao V, Lambert T, Courvalin P. 2002. ColE1-like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-17. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1212–1217. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.5.1212-1217.2002>.
40. Sarno R, McGillivray G, Sherratt DJ, Actis LA, Tomalsky ME. 2002. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multiresistance plasmid pJHCMW1. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3422–3427. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.11.3422-3427.2002>.
41. Zioga A, Whichard JM, Kotsakis SD, Tzouveleki LS, Tzelepi E, Miriagou V. 2009. CMY-31 and CMY-36 cephalosporinases encoded by ColE1-like plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 53:1256–1259. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01284-08>.

## Příloha 29

DOBIASOVA, H., VIDENSKA, P., DOLEJSKA, M., 2015, Complete sequences of IncU plasmids harboring quinolone resistance genes *qnrS2* and *aac(6')-Ib-cr* in *Aeromonas* spp. from ornamental fish: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, p. 653-657.

### Souhrn

---

Technologií nové generace sekvenování byla stanovena primární nukleotidová sekvence tří IncU plazmidů získaných z izolátů *Aeromonas* spp. z okrasných ryb, které nesou geny rezistence k fluorochinolonům *qnrS2* a *aac(6')-Ib-cr*. Plazmidy obsahovaly kostru typickou pro IncU skupinu a gen *qnrS2* byl včleněn do *mpR* ve formě mobilní inzerční kazety. V rámci plazmidů byly zjištěny významné evoluční přestavby dokumentující vysokou plasticitu IncU plazmidů. V jejich sekvencích byly dále nalezeny nové geny, které se mohou podílet na perzistenci a stabilitě plazmidů ve vodním prostředí.



# Complete Sequences of IncU Plasmids Harboring Quinolone Resistance Genes *qnrS2* and *aac(6')-Ib-cr* in *Aeromonas* spp. from Ornamental Fish

Hana Dobiasova,<sup>a,b</sup> Petra Videnska,<sup>c</sup> Monika Dolejska<sup>a,b</sup>

Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic<sup>a</sup>; Central European Institute of Technology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic<sup>b</sup>; Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic<sup>c</sup>

**The nucleotide sequences of three IncU plasmids from *Aeromonas* spp. isolated from ornamental fish are described. They had a typical IncU backbone for plasmid replication and maintenance functions, but conjugative transfer modules were disrupted. The gene *qnrS2* was inserted into *mpR* as a mobile insertion cassette. Novel Tn3 family transposons carrying putative toxin-antitoxin and plasmid stability genes were identified. The study demonstrates high plasticity of IncU plasmids from aquatic environments.**

*Aeromonas* is a ubiquitous microorganism distributed in water ecosystems and includes species causing various kinds of infections in fish and humans. Antibiotic resistance in *Aeromonas* in aquatic environments is associated especially with plasmids of the IncU family. Most IncU plasmids described in this genus to date share a highly conserved backbone represented by genes for plasmid replication, stability, and conjugative transfer and one variable region for resistance genes to antibiotics, such as tetracyclines, sulfonamides, trimethoprim, streptomycin, and chloramphenicol (1–6). Quinolones are broad-spectrum antimicrobial agents widely used in human and veterinary medicine, and they are among the most widely used antibiotics in aquacultures (7). *Aeromonas* isolates harboring quinolone resistance (PMQR) genes on IncU plasmids have been recently reported in river water, lake water, and fish (2, 3, 6, 8), highlighting the role of this plasmid family in dissemination of clinically relevant resistance mechanisms in a wide range of aquatic environments.

In our previous study, IncU plasmids carrying *qnrS2* and *aac(6')-Ib-cr* genes in *Aeromonas* spp. from ornamental fish originating from various geographic locations were identified (8). The aim of this study was to elucidate the structure and features of three representative IncU plasmids carrying PMQR genes by sequencing and bioinformatic analysis. At present, complete nucleotide sequences of nine IncU plasmids are available in the GenBank database. Four of them, plasmids pRA3 (GenBank accession no. DQ401103), pFBAOT6 (GenBank accession no. CR376602), pAC3 (GenBank accession no. KM204147), and pP2G1 (GenBank accession no. HE616910), originate from *Aeromonas* spp., and only the last two plasmids carry PMQR genes (updated on 22 July 2015).

The three sequenced IncU plasmids pAH6, pAH227, and pASCH21 were nonconjugative and varied in size (20 to 40 kb). Plasmid pAH6 (~20 kb) originated from *Aeromonas hydrophila* from a koi carp bred in the Czech Republic. It has been identified as a highly diffused plasmid in isolates of *A. hydrophila* and *Aeromonas sobria* from Czech koi carps and tropical fish imported from Asia (8). The other two plasmids, pAH227 (~40 kb) and pASCH21 (~35 kb), carrying *qnrS2*, originated from *A. hydrophila* from a koi carp from the Czech Republic and *A. sobria* from

a tropical fish from Thailand, respectively. Plasmids were transferred to chemically competent *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  cells by transformation followed by selection of the transformants on Luria-Bertani agar with ciprofloxacin (0.05 mg/liter) as described previously (8). Plasmid DNAs were extracted from transformants using the PureLink HiPure plasmid filter midiprep kit (Invitrogen, Life Technologies, Germany) and sequenced using the 454 Genome Sequencer Junior system (Roche, Prague, Czech Republic) on a standard DNA fragment library following the manufacturer's protocol. One, one, and three contigs for plasmids pAH6, pAH227, and pASCH21, respectively, ranging from 250 to 41,761 bp in size with at least a 444-fold coverage, were obtained using GS *De Novo* Assembler v2.6 software. Gaps between contigs were filled by PCR, and the obtained amplicons were sequenced using the Sanger method to link the contigs (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Geneious 7.0.6 software (Biomatters, Auckland, New Zealand) was used to combine the data from the 454 Genome Sequencer Junior system and Sanger sequencing. The BLAST algorithm ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) was used for further data analysis. The plasmids were mapped against IncU plasmids pRA3 and pFBAOT6 to verify the obtained sequences. pRA3 and pFBAOT6 were used as reference plasmids to annotate the plasmid sequences.

All three sequenced plasmids showed a highly conserved backbone. Genes involved in plasmid replication and maintenance showed significant sequence identity with the corresponding regions of other plasmids in the IncU family. The replication module was represented by the genes *repA* and *repB* and repetitive sequences (Fig. 1). RepB showed 99.8% and 100% sequence iden-

Received 22 July 2015 Returned for modification 25 August 2015

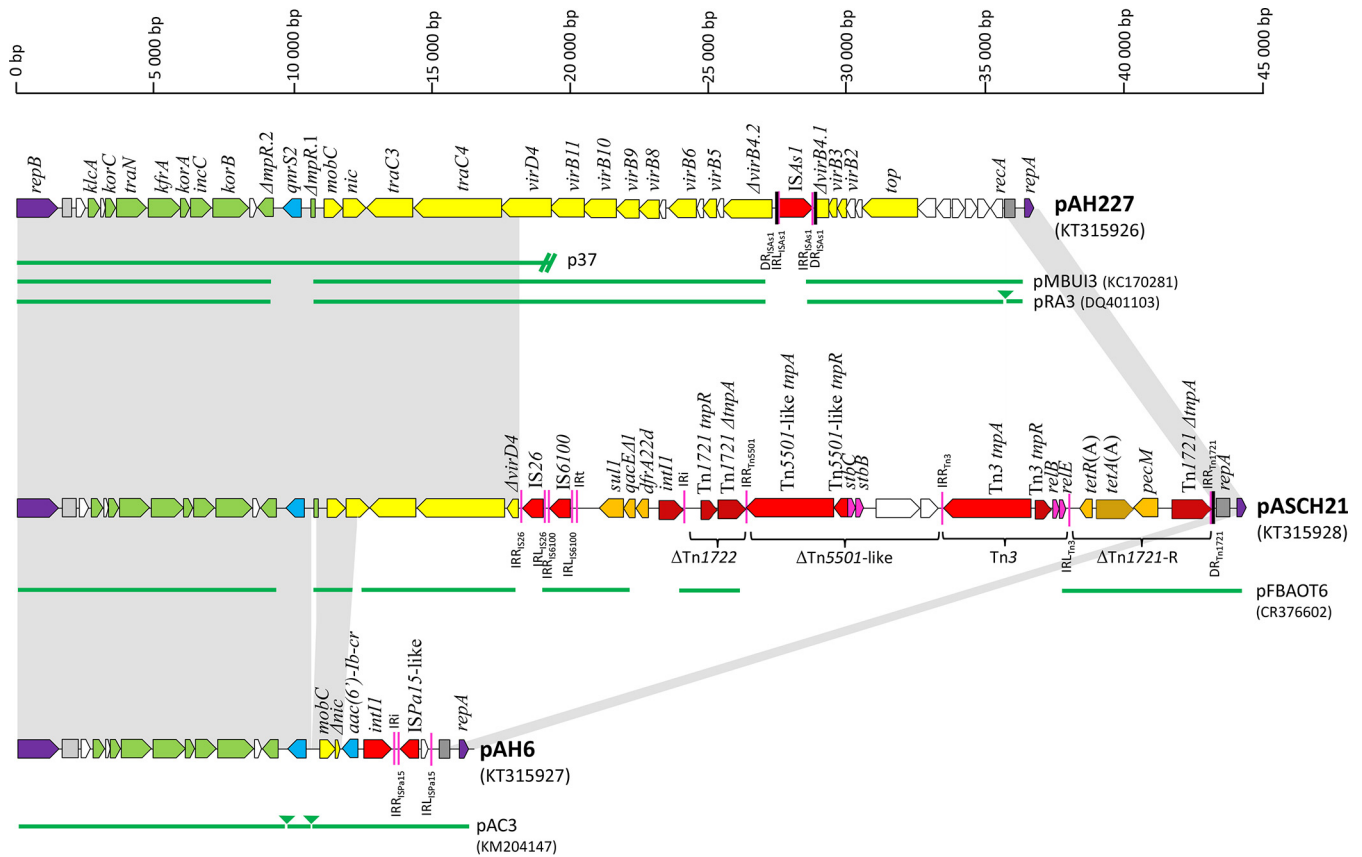
Accepted 25 October 2015

Accepted manuscript posted online 2 November 2015

Citation Dobiasova H, Videnska P, Dolejska M. 2016. Complete sequences of IncU plasmids harboring quinolone resistance genes *qnrS2* and *aac(6')-Ib-cr* in *Aeromonas* spp. from ornamental fish. *Antimicrob Agents Chemother* 60:653–657. doi:10.1128/AAC.01773-15.

Address correspondence to Monika Dolejska, [monika.dolejska@gmail.com](mailto:monika.dolejska@gmail.com).

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.



**FIG 1** Linear maps of PMQR-carrying IncU plasmids pAH227, pASCH21, and pAH6 from *Aeromonas*. Open reading frames (ORFs) are shown as arrows, indicating the direction of transcription. Plasmid scaffold, including the plasmid replicons, maintenance genes, and transfer region, are shown in violet, green, and yellow, respectively. PMQR genes are shown in blue, while other resistance genes are indicated in orange. IS, *int1*, *tnpA*, and *tnpR* are shown in red. Other genes are shown in white or pink. Dark gray boxes represent repetitive regions adjacent to *rep* genes. Inverted repeats (IRL, left inverted repeat; IRR, right inverted repeat) and direct repeats (DR) are shown in purple and black lines, respectively. The extent of transposons is indicated below the plasmid map. The green lines below the maps correspond to highly similar sequences from other fully and partially (p37) sequenced IncU plasmids. Homologous regions are indicated by gray shading.

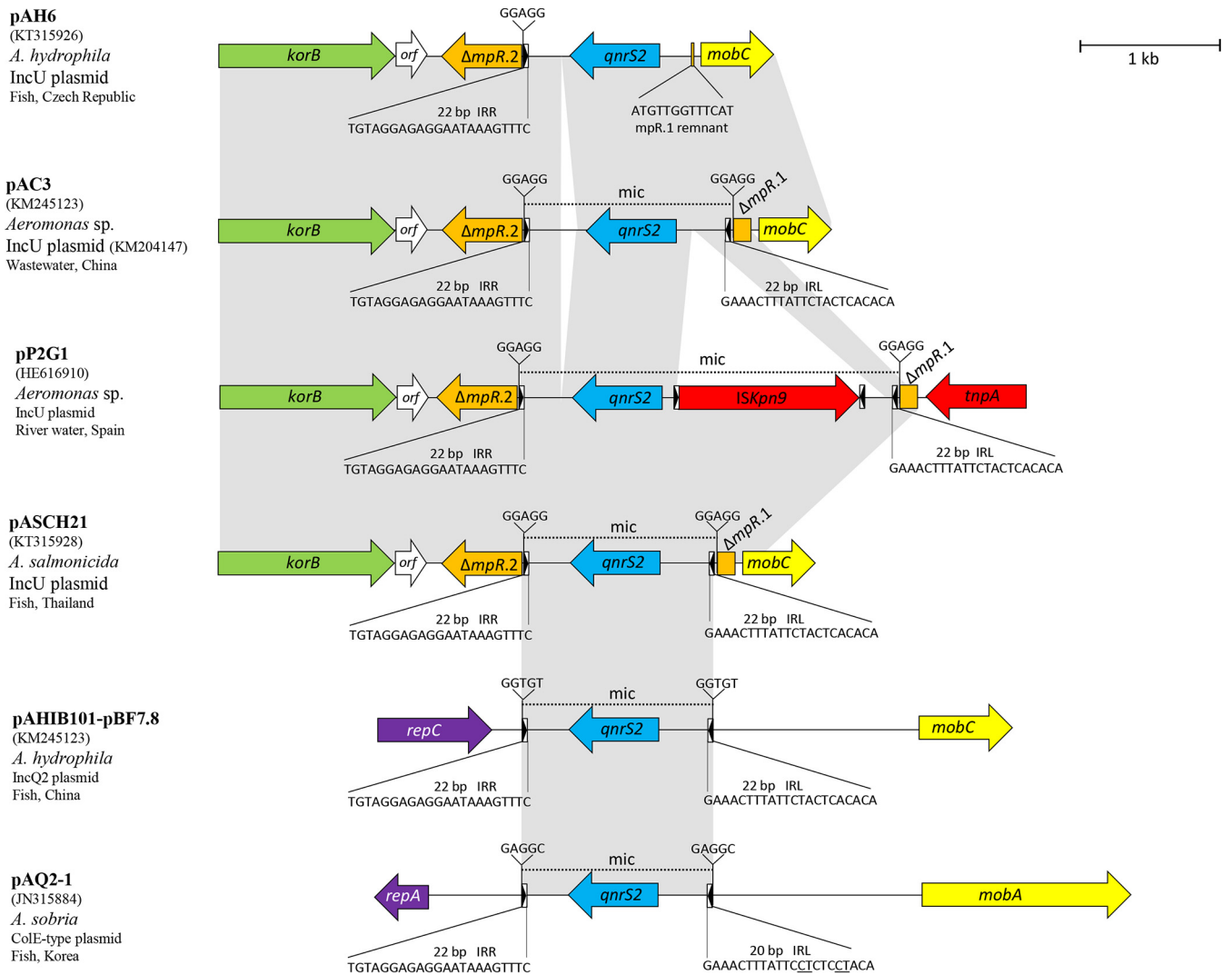
tivity with the replication protein in pRA3 and pFBAOT6, respectively. RepA was 100% identical with the transcriptional repressor protein of IncU archetypes. The complete set of plasmid maintenance genes, found adjacent to the replication module, was disrupted by insertion of *qnrS2* into the gene *mpR* coding for a putative zinc-metalloprotease as observed in other *qnrS2*-carrying IncU plasmids (2, 3, 6). Significant differences between the three sequenced plasmids were observed in the transfer modules involved in plasmid conjugation and in plasmid variable regions containing various antibiotic resistance genes and mobile elements.

Plasmid pAH227 was 36,559 bp in size and had 52.3% G+C content. It carried *qnrS2* and showed significant similarity to pFBAOT6 and pRA3 (92% coverage, 99% identity). The majority of the plasmid sequence (33,947 bp) was composed of conserved IncU plasmid backbone. It contained a complete transfer region as seen in pRA3. However, the transfer region in pAH227 was disrupted by the insertion sequence *ISAs1* inserted into the gene coding for conjugal transfer protein VirD4, likely resulting in the loss of conjugative abilities of the plasmid, as demonstrated *in vitro* (8). The *ISAs1* was flanked by imperfect 22-bp inverted repeats (IRs) and showed 100% nucleotide identity to a transposase gene

found in *A. salmonicida* (GenBank accession no. CP000645) and *Aeromonas media* (GenBank accession no. CP007567) genomes. Target site duplication of 10 bp (ACTGCATACC) at the *ISAs1* boundaries indicated the insertion via transposition. In contrast to other IncU plasmids described in *Aeromonas* spp. to date, no accessory genes apart from *qnrS2* were found on pAH227. However, plasmids pMBUI3 (KC170281) and pMBUI7 (KC170284) from an unknown bacterial species recently isolated from freshwaters in the United States show great similarity (91% to 92% coverage, 93% to 95% identity) to pAH227 and consist entirely of IncU plasmid backbone with no known accessory genes (9). These plasmids may represent IncU archetypes before the acquisition of resistance genes.

Plasmid pASCH21 contained *qnrS2* and was 44,649 bp in size, with an average G+C content of 56.5%. It was composed of a 17,694-bp IncU plasmid backbone and a 26,955-bp accessory region. The plasmid backbone was disrupted within the gene coding for VirD4 conjugal transfer protein by a continuous highly mosaic variable region, consisting of sets of resistance genes, transposable elements, and integrons. The sequencing data indicated that pASCH21 was a derivative of pFBAOT6 (65% coverage, 99% identity). Both plasmids contained plasmid backbone sharing 99%





**FIG 2** Mobile insertion cassette (mic) carrying *qnrS2* gene and the insertion site on various plasmid backbones. Open reading frames (ORFs) are shown as arrows, indicating the direction of transcription. Plasmid scaffolds, including the plasmid replicons, maintenance genes, and transfer region, are shown in violet, green, and yellow, respectively. The gene *qnrS2* is shown in blue. Inverted repeats (IRL, left inverted repeat; IRR, right inverted repeat) are shown in boxes, with a black arrow indicating the direction; their length and sequence are shown below the structures, and nucleotides that differed among the plasmids are underlined. Direct repeats (DR) flanking the mic are shown above the map. Homologous regions are indicated by gray shading.

sequence similarity and a related genetic load represented by an In4-like class 1 integron and a Tn21-like unit transposon, Tn1721. In both plasmids, Tn1721 was separated into left (Tn1721-L, i.e., truncated region corresponding to Tn1722) and right [Tn1721-R, harboring *tetA(A)* resistance gene] ends. pFBAOT6 had a complete Tn1721 surrounded by direct repeats (DRs) at both ends, suggesting its acquisition by a single transposition event. On the other hand, the left end of Tn1721-L in pASCH21, including DR, IRL<sub>Tn1721-L</sub>, and part of *mcp* (previously designated *orfI*) encoding methyl-accepting chemotaxis protein, has been removed, likely by insertion of the integron. Both plasmids contained insertion sequence IS6100 upstream of the class 1 integron, a typical feature of In4-like integrons. However, the integrons of pASCH21 and pFBAOT6 differed. pASCH21 contained a *dfiA22d* cassette coding for resistance to trimethoprim, while pFBAOT6 had the streptomycin resistance gene cassette *aadA2*. In addition, the integron of pFBAOT6 was inserted at the left end of

an intact sequence of Tn1721-L, while in pASCH21, the integron was truncated Tn1721-L in *mcp*. Furthermore, the sequence of a remnant *tni*<sub>402</sub> and a terminal IR typical for In4-like integrons were missing in pASCH21, likely as a result of insertion of IS26 adjacent to IS6100. Two Tn3 family transposons were found between Tn1721-L and Tn1721-R. Tn5501-like was inserted immediately downstream of ΔTn1721-L, truncating the gene *tnpA* of the transposon. This novel transposon is flanked by typical 38-bp left IRs and exhibits 90% to 91% identity at the amino acid level with Tn3 family transposons identified in IncP1 plasmids pGNB1 (10) and pB8 (11) isolated from unknown bacteria collected from activated sludge from wastewater treatment plants. Compared to the IncP1 plasmids, Tn5501-like in pASCH21 carried four genes, two of them coding for putative plasmid stabilization proteins showing significant similarity to proteins identified in plant-associated *Pseudomonas savastanoi* (12, 13). Insertion of another 4,717-bp Tn3 transposon downstream of Tn5501-like likely re-

moved parts of Tn5501-like and Tn1721-R, including their corresponding IRs. This Tn3 transposon was flanked by 38-bp IRs; however, the insertion has not generated target site duplications; thus, it is unlikely that it has been acquired by transposition. The transposon carried toxin-antitoxin gene pairs, probably ensuring plasmid stability. These putative plasmid stability proteins exhibited 86% and 96% identity at the amino acid level with RelE and RelB proteins, respectively, encoded by small cryptic ColE2-type plasmids in *A. salmonicida* (14).

pAH6 plasmid harbored *qnrS2* and *aac(6')-Ib-cr* genes and was found to be 15,886 bp in size, with an average G+C content of 54.9%. It shared extensive similarities with IncU plasmids pFBAOT6 (88% coverage, 100% identity) and pRA3 (87% coverage, 99% identity). The sequence is highly related to PMQR-carrying IncU plasmid pAC3 from *Aeromonas* sp. from a wastewater treatment plant in South Korea (99% coverage, 100% identity). pAH6 is one of the smallest IncU plasmids described so far. Recently, 8-kb IncU plasmid pPA-2 harboring *bla*<sub>KPC-2</sub> and lacking genes involved in plasmid transfer and partitioning was identified in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* (15), highlighting the ability of IncU plasmids to form smaller molecules. In pAH6, the conjugative transfer region was disrupted inside the gene *nic* encoding VirD2 relaxase by a class 1 integron harboring the gene cassette *aac(6')-Ib-cr*. The 3' part of the integron was removed, likely as a result of subsequent rearrangements after the integron acquisition. A complete In2 family integron with an *aac(6')-Ib-cr-bla*<sub>OXA-1</sub>-*catB3-arr-3* cassette array is present in other PMQR-carrying IncU plasmids in *Aeromonas* spp. isolated from river water in Spain and France (3, 6). Adjacent to the integron, pAH6 contained a 1,025-bp *ISPa15*-like element separated by a 114-bp sequence from the integron, as observed in IncU plasmid pFBAOT6 and IncP-6 plasmid Rms149 (4, 16). The In2-like integron and *ISPa15*-like element were suggested to form a composite transposon whose complete structure appears to be present in pFBAOT6 (4).

All three sequenced plasmids contained the *qnrS2* gene inserted in the same position of the plasmid maintenance region into the gene *mpR* in the form of a mobile insertion cassette (mic). pAH227 and pASCH21 contained the intact 1,370-bp mic bracketed by 22-bp imperfect IRs and a 5-bp duplication of the target site (Fig. 2), suggesting the acquisition of the structure by transposition. The same insertion site of *qnrS2* and structure of mic have been observed in other IncU plasmids (2, 3), highlighting the gene *mpR* as a hot spot for *qnrS2* insertion in this plasmid group. The identical structure of mic seen in pCH21 and pAH227 was found in IncU plasmid p37 in *Aeromonas punctata* from river water in France (2) and in plasmids of other incompatibility groups, such as IncQ2 plasmid pAHIB101-pBF7.8 in *A. hydrophila* from a fish isolate in China (GenBank accession no. KM245123) and ColE-type plasmids pAQ2-1 and pAQ2-2 in *A. sobria* from fish in South Korea (17). This suggests that this *qnrS2*-carrying mic represents a promiscuous element moving between different replicons. In IncQ and ColE-type plasmids, the mic was inserted in plasmid backbones between genes encoding replication and mobilization proteins, generating target site duplication of 5 bp (Fig. 2). Other *qnrS2*-carrying IncU plasmids from *Aeromonas* spp. described so far contain various insertions of extra sequences inside the mic. Plasmid pP2G1 from river water in Spain carries *ISKpn9* inserted at the 5' end of *qnrS2*, while pAC3 and p42 from China and France, respectively, contain a 106-bp

insert at the 3' end of *qnrS2* (6). In pAH6, IRLs and DRs of mic upstream of *qnrS2* were missing, likely due to subsequent plasmid rearrangements after the acquisition of the *qnrS2*-carrying mic. This resulted in the loss of mobilization abilities of the gene.

Our study described complete sequences of IncU plasmids carrying PMQR determinants from *A. hydrophila* and *A. sobria* recovered from ornamental fish from distant geographic areas. pAH6-like IncU plasmids carrying *qnrS2* and *aac(6')-Ib-cr* genes have been found in various *Aeromonas* isolates from the Czech Republic, Thailand, Vietnam, and South Korea, suggesting the importance of this plasmid lineage in dissemination of PMQR genes among aquatic animals and the environment. None of the plasmids could be transferred to recipient bacteria by conjugation, most likely because of disruption of the conjugative transfer region. A general ability of *Aeromonas* environmental isolates to acquire free DNA was recently described (18), highlighting the role of transformation in the gene flow in natural environments, including water. Despite the loss of conjugative abilities, the IncU plasmids may be efficiently transferred in aquatic environments, most likely by the transformation of free plasmid DNA to naturally competent bacteria. IncU plasmids formed smaller molecules and acquired novel stability genes, which may give them the ability to pose a lower biological burden for host cells and to be maintained in antibiotic-free environments. Our study demonstrated higher variability in this plasmid family than previously anticipated, its rapid evolution, and an important role in the circulation of fluoroquinolone resistance in the environment.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The nucleotide sequences of plasmids pAH6, pAH227, and pASCH21 have been assigned the GenBank accession numbers [KT315927](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KT315927), [KT315926](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KT315926), and [KT315928](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KT315928), respectively.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a research project grant from the Czech Ministry of Agriculture (NAZV QJ1210237), Czech Science Foundation (15-14683Y/P502), CEITEC-Central European Institute of Technology (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from European Regional Development Fund and AdmireVet project (CZ.1.05/2.1.00/01.0006-ED0006/01/01) from the Czech Ministry of Education.

We thank Alois Cizek, Marie Slavikova, and Iva Kutilova from University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno for their assistance.

## FUNDING INFORMATION

Czech Ministry of Education provided funding to Petra Videnska under grant number CZ.1.05/2.1.00/01.0006. European Regional Development Fund provided funding to Monika Dolejska and Hana Dobiasova under grant number CZ.1.05/1.1.00/02.0068. Czech Science Foundation provided funding to Monika Dolejska under grant number 15-14683Y/P502. Czech Ministry of Agriculture provided funding to Monika Dolejska and Hana Dobiasova under grant number NAZV QJ1210237.

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

## REFERENCES

- Aoki T, Egusa S, Kimura T, Watanabe T. 1971. Detection of R factors in naturally occurring *Aeromonas salmonicida* strains. *Appl Microbiol* 22: 716–717.
- Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ, Nordmann P. 2008. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg Infect Dis* 14:231–237. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1402.070677>.

3. Picao RC, Poirel L, Demarta A, Silva CS, Corvaglia AR, Petrini O, Nordmann P. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. *J Antimicrob Chemother* 62:948–950. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn341>.
4. Rhodes G, Parkhill J, Bird C, Ambrose K, Jones MC, Huys G, Swings J, Pickup RW. 2004. Complete nucleotide sequence of the conjugative tetracycline resistance plasmid pFBAOT6, a member of a group of IncU plasmids with global ubiquity. *Appl Environ Microbiol* 70:7497–7510. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.12.7497-7510.2004>.
5. Sorum H, L'Abée-Lund TM, Solberg A, Wold A. 2003. Integrin-containing IncU R plasmids pRAS1 and pAr-32 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1285–1290. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.47.4.1285-1290.2003>.
6. Marti E, Balcazar JL. 2012. Multidrug resistance-encoding plasmid from *Aeromonas* sp. strain P2G1. *Clin Microbiol Infect* 18:E366–E368. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03935.x>.
7. Quesada SP, Paschoal JA, Reyes FG. 2013. Considerations on the aquaculture development and on the use of veterinary drugs: special issue for fluoroquinolones—a review. *J Food Sci* 78:R1321–R1333. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.12222>.
8. Dobiasova H, Kutilova I, Piackova V, Vesely T, Cizek A, Dolejska M. 2014. Ornamental fish as a source of plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic resistance plasmids. *Vet Microbiol* 171:413–421. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.011>.
9. Brown CJ, Sen D, Yano H, Bauer ML, Rogers LM, Van der Auwera GA, Top EM. 2013. Diverse broad-host-range plasmids from freshwater carry few accessory genes. *Appl Environ Microbiol* 79:7684–7695. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02252-13>.
10. Schluter A, Krahn I, Kollin F, Bonemann G, Stiens M, Szczepanowski R, Schneiker S, Puhler A. 2007. IncP-1-beta plasmid pGNB1 isolated from a bacterial community from a wastewater treatment plant mediates decolorization of triphenylmethane dyes. *Appl Environ Microbiol* 73:6345–6350. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01177-07>.
11. Schluter A, Heuer H, Szczepanowski R, Poler SM, Schneiker S, Puhler A, Top EM. 2005. Plasmid pB8 is closely related to the prototype IncP-1beta plasmid R751 but transfers poorly to *Escherichia coli* and carries a new transposon encoding a small multidrug resistance efflux protein. *Plasmid* 54:135–148. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plasmid.2005.03.001>.
12. Qi M, Wang D, Bradley CA, Zhao Y. 2011. Genome sequence analyses of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and subtractive hybridization-based comparative genomics with nine pseudomonads. *PLoS One* 6:e16451. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016451>.
13. Rodriguez-Palenzuela P, Matas IM, Murillo J, Lopez-Solanilla E, Bardaji L, Perez-Martinez I, Rodriguez-Mosquera ME, Penyalver R, Lopez MM, Quesada JM, Biehl BS, Perna NT, Glasner JD, Cabot EL, Neeno-Eckwall E, Ramos C. 2010. Annotation and overview of the *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 draft genome reveals the virulence gene complement of a tumour-inducing pathogen of woody hosts. *Environ Microbiol* 12:1604–1620. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02207.x>.
14. Boyd J, Williams J, Curtis B, Kozera C, Singh R, Reith M. 2003. Three small, cryptic plasmids from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449. *Plasmid* 50:131–144. [http://dx.doi.org/10.1016/S0147-619X\(03\)00058-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0147-619X(03)00058-1).
15. Naas T, Bonnin RA, Cuzon G, Villegas MV, Nordmann P. 2013. Complete sequence of two KPC-harboring plasmids from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 68:1757–1762. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt094>.
16. Haines AS, Cheung M, Thomas CM. 2006. Evidence that IncG (IncP-6) and IncU plasmids form a single incompatibility group. *Plasmid* 55:210–215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plasmid.2005.11.003>.
17. Han JE, Kim JH, Choresca CH, Jr, Shin SP, Jun JW, Chai JY, Park SC. 2012. First description of ColE-type plasmid in *Aeromonas* spp. carrying quinolone resistance (*qnrS2*) gene. *Lett Appl Microbiol* 55:290–294. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03293.x>.
18. Huddleston JR, Brokaw JM, Zak JC, Jeter RM. 2013. Natural transformation as a mechanism of horizontal gene transfer among environmental *Aeromonas* species. *Syst Appl Microbiol* 36:224–234. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.01.004>.



## Příloha 30

DOLEJSKA, M., MASARIKOVA, M., DOBIASOVA, H., JAMBOROVA, I., KARPISKOVA, R., HAVLICEK, M., CARLILE, N., PRIDDEL, D., CIZEK, A., LITERAK, I., 2016, High prevalence of *Salmonella* and IMP-4-producing Enterobacteriaceae in the silver gull on Five Islands, Australia: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 71, p. 63-70.

### Souhrn

---

V jedné z největších hnízdních kolonií racků australských byly nalezeny u 40 % vyšetřených mláďat izoláty různých druhů čeledi Enterobacteriaceae s produkcí metalo-beta-laktamázy skupiny IMP-4. Jedná se teprve o třetí záchyt karbapenemáz u volně žijících zvířat a o první případ s tak vysokou prevalencí. Izoláty náležely k různým sekvenčním typům a gen pro produkci metalo-beta-laktamázy byl nalezen na různých skupinách plazmidů. Ornitologické pozorování v oblasti ukazuje na pravděpodobný zdroj těchto kmenů v blízké skládce komunálního odpadu, kam rackové zalétávají za potravou pro svá mláďata. IMP-4 představuje dominující karbapenemázu v australských nemocnicích, což ukazuje na humánní zdroj těchto izolátů. Tento pilotní výsledek potvrzuje nutnost intenzivního sledování stavu šíření producentů karbapenemáz do prostředí.



# High prevalence of *Salmonella* and IMP-4-producing Enterobacteriaceae in the silver gull on Five Islands, Australia

Monika Dolejska<sup>1,2\*</sup>, Martina Masarikova<sup>1,3</sup>, Hana Dobiasova<sup>2</sup>, Ivana Jamborova<sup>2</sup>, Renata Karpiskova<sup>4</sup>, Martin Havlicek<sup>5</sup>, Nicholas Carlile<sup>6</sup>, David Priddel<sup>6</sup>, Alois Cizek<sup>1,3</sup> and Ivan Literak<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Central European Institute of Technology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic; <sup>2</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic; <sup>3</sup>Department of Infectious Diseases and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic; <sup>4</sup>Veterinary Research Institute, Hudcova 296/70, 621 00 Brno, Czech Republic; <sup>5</sup>Small Animal Specialist Hospital, Richardson Place 1/1, North Ryde, NSW 2113, Australia; <sup>6</sup>Office of Environment and Heritage (NSW), PO Box 1967, Hurstville, NSW 2220, Australia

\*Corresponding author. Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic. Tel: +420-541-562-640; E-mail: monika.dolejska@gmail.com

Received 26 May 2015; returned 7 July 2015; revised 14 July 2015; accepted 27 August 2015

**Objectives:** The objective of this study was to investigate the silver gull as an indicator of environmental contamination by salmonellae and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) in south-east Australia.

**Methods:** A total of 504 cloacal samples were collected from gull chicks at three nesting colonies in New South Wales, Australia [White Bay ( $n=144$ ), Five Islands ( $n=200$ ) and Montague Island ( $n=160$ )] and were examined for salmonellae and CPE. Isolates were tested for carbapenemase genes and susceptibility to 14 antibiotics. Clonality was determined by PFGE and MLST. Genetic context and conjugative transfer of the carbapenemase gene were determined.

**Results:** A total of 120 CPE of 10 species, mainly *Escherichia coli* ( $n=85$ ), carrying the gene  $bla_{IMP-4}$ ,  $bla_{IMP-38}$  or  $bla_{IMP-26}$  were obtained from 80 (40%) gulls from Five Islands. Thirty percent of birds from this colony were colonized by salmonellae. Most isolates contained the gene within a class 1 integron showing a  $bla_{IMP-4}$ - $qacG$ - $aacA4$ - $catB3$  array. The  $bla_{IMP}$  gene was carried by conjugative plasmids of variable sizes (80–400 kb) and diverse replicons, including HI2-N ( $n=30$ ), HI2 (11), A/C (17), A/C-Y (2), L/M (5), I1 (1) and non-typeable (6). Despite the overall high genetic variability, common clones and plasmid types were shared by different birds and bacterial isolates, respectively.

**Conclusions:** Our data demonstrate a large-scale transmission of carbapenemase-producing bacteria into wildlife, likely as a result of the feeding habits of the birds at a local waste depot. The isolates from gulls showed significant similarities with clinical isolates from Australia, suggesting the human origin of the isolates. The sources of CPE for gulls on Five Islands should be explored and proper measures applied to stop the transmission into the environment.

## Introduction

Carbapenems are one of the most important antibiotics in human medicine and are regarded as last-line drugs to treat infections caused by MDR Gram-negative bacteria. Clinical efficacy of these antibiotics is threatened by carbapenemases,  $\beta$ -lactamases capable of rapid degradation of carbapenems. Metallo- $\beta$ -lactamases, mainly VIM, NDM and IMP, are among the most disseminated carbapenemases worldwide.<sup>1</sup> IMP-type  $\beta$ -lactamases are found in various clinically important Gram-negative bacteria, such

as *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. and Enterobacteriaceae, all round the world,<sup>2</sup> endemically in Japan, Taiwan, China, Korea and the Philippines.<sup>3–6</sup> Currently, IMP-4 is the most commonly reported carbapenemase in clinical isolates of Enterobacteriaceae, associated with outbreaks in healthcare settings in Australia,<sup>7</sup> but its wide dissemination has been documented also in China.<sup>4</sup>

Transmission of carbapenem-resistant bacteria to food-producing animals and the environment is of great concern. So far, there are scarce reports of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) from farm animals and wildlife.<sup>8</sup>



*Salmonella* is an important zoonotic pathogen causing infections in humans and domestic animals. Wild birds, such as gulls, influenced by various anthropogenic activities, are important in the epidemiology of human and livestock salmonellosis.<sup>9</sup> In Australia, the prevalence of *Salmonella*, including antibiotic-resistant strains in wild birds, is largely unknown.<sup>10</sup>

In this work, we studied the silver gull (*Chroicocephalus novaehollandiae*) as an indicator of environmental contamination by *Salmonella* and CPE in south-east Australia in respect of the current epidemiological situation in this country. The silver gull feeds on fish, marine and terrestrial invertebrates, but also on human refuse collected at landfills.<sup>11,12</sup> This study is the first known report of a large-scale transmission of CPE into wildlife.

## Materials and methods

### Birds and sampling

The silver gull is widespread throughout Australia, New Zealand and New Caledonia. There has been marked expansion of the population of the silver gull in Australia in the last century, with most increases in numbers occurring near to and within major cities. Although silver gulls do occur near inland wetlands, they are predominantly a coastal species. In south-east Australia they breed mostly on marine islands, the highest densities occurring on islands close to major urban areas, particularly Newcastle, Sydney and Wollongong. Seventy percent of coastal breeding in New South Wales (NSW) occurs at Five Islands off the coast of Wollongong.<sup>11,12</sup>

A total of 504 cloacal samples were taken from silver gull chicks within the three nesting colonies on the south-eastern coast of NSW, Australia—White Bay ( $n=144$ ), Five Islands ( $n=200$ ) and Montague Island ( $n=160$ )—in October 2012. The samples were collected using a sterile cotton swab and placed in an Amies transport medium (Coban, Italy).

The small colony at White Bay near Glebe ( $33^{\circ}86' S$ ,  $151^{\circ}18' E$ ) nest on a diffused industrial wharf within Sydney Harbour, ~70 km north of Five Islands. In October 2012, the colony contained ~1500 birds. These birds feed at the nearby fish markets and in other suburban areas surrounding Sydney Harbour,<sup>11,12</sup> which provides natural prey enriched by refuse carried by urban runoff.

Big Island, in the Five Islands group ( $34^{\circ}29' S$ ,  $150^{\circ}56' E$ ), is a 19 ha nature reserve ~500 m offshore from Port Kembla, 60 km south of Sydney. Big Island represents the largest silver gull breeding colony in NSW, with historical estimates of up to 50000 pairs,<sup>11</sup> although numbers have declined recently for unknown reasons. During our sampling in the 2012 breeding season we estimated only 3854 pairs. Studies have shown that the gulls breeding on Big Island feed predominantly on human refuse.<sup>12</sup> As many as 6000 gulls per hour have been recorded leaving Whyte Gully landfill ( $34^{\circ}26' S$ ,  $150^{\circ}48' E$ ), the main waste depot, located on the mainland 12 km from the nesting colony. Regurgitations from gulls trapped on Big Island contained solely human refuse (85% of samples), solely natural food (13%) or a mixture of both (2%). Meat constituted 63% of the human refuse.<sup>12</sup>

Montague Island ( $36^{\circ}15' S$ ,  $150^{\circ}14' E$ ) lies 6 km offshore, 10 km south-west of Narooma, NSW. The entire island is a natural reserve of 82 ha and supports a silver gull population of 1500–2000 pairs, which feed predominantly on a natural diet of worms, fish, crustaceans and insects (N. Carlile, unpublished results).

### Isolation of carbapenemase-producing isolates and *Salmonella*

Individual cloacal samples were enriched overnight in Buffered Peptone Water (Oxoid, UK) and then cultured for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae on CHROMagar™ KPC (CHROMagar, Paris, France) and

MacConkey agar supplemented with meropenem (0.125 mg/L) and ZnSO<sub>4</sub> (100 mg/L) (MCA<sub>mer</sub>) and for *Salmonella* using semi-solid Rappaport–Vassiliadis medium (Oxoid) and X.L.D. agar (Oxoid). One colony for each morphological type growing on CHROMagar KPC or MCA<sub>mer</sub> was selected and identified by MALDI-TOF MS (Microflex LT, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). *Salmonella* isolates were subjected to serotyping using the Kauffmann–White–LeMinor scheme<sup>13</sup> and phage typing according to the HPA Colindale protocol.<sup>14,15</sup>

### Antibiotic resistance profiling

Susceptibility to 14 antibiotics, including amoxicillin/clavulanic acid (30 µg), ampicillin (10 µg), cefalotin (30 µg), ceftazidime (30 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), nalidixic acid (30 µg), streptomycin (10 µg), sulfamethoxazole/trimethoprim (25 µg), compound sulphonamides (300 µg) and tetracycline (30 µg) (Oxoid, UK), was tested in *Salmonella* and *bla*<sub>IMP</sub>-positive isolates using a disc-diffusion method.<sup>16</sup> Isolates negative for the tested carbapenemase genes were screened for metallo-β-lactamase, AmpC and ESBL production by phenotypic assays.<sup>16–18</sup>

MICs of meropenem for IMP- and AmpC-producing isolates were determined using the agar dilution method.<sup>16</sup>

Statistical significance of the data was analysed using the  $\chi^2$  test. *P* value  $\leq 0.05$  was considered to be statistically significant.

### Molecular typing of CPE isolates

Enterobacteriaceae isolates growing on CHROMagar KPC or MCA<sub>mer</sub> and all *Salmonella* isolates were screened for carbapenemase genes (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>OXA-48-type</sub>) by PCR (Table S1, available as Supplementary data at JAC Online). Isolates positive for *bla*<sub>IMP</sub> were tested for the gene *bla*<sub>IMP-4</sub> using PCR followed by sequencing of the amplicons (Table S1). Clonality of *bla*<sub>IMP</sub>-positive isolates was determined by XbaI-PFGE. Cluster analysis using Dice similarity indices was done in BioNumerics 6.6 software (Applied Maths, Ghent, Belgium) to generate a dendrogram describing the relationships among PFGE profiles. Isolates with  $\geq 85\%$  similarity of PFGE profiles were assigned to the same cluster (designated as 1, 2, 3, etc. for *Escherichia coli* and A, B, C, etc. for other species). MLST of representative isolates of *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* showing unique PFGE profiles was performed using Achtman's<sup>19</sup> and Institut Pasteur's schemes,<sup>20</sup> respectively. A PCR-based scheme was used to categorize *E. coli* isolates into phylogenetic groups.<sup>21</sup>

### Genetic context and transferability of the *bla*<sub>IMP</sub> gene

At least one randomly selected isolate for each PFGE pattern/bacterial species was further analysed for context of the *bla*<sub>IMP-4</sub> gene. A reference sequence of typical Australian class 1 integron array *bla*<sub>IMP-4</sub>-*qacG*-*aacA4*-*catB3* (Accession number JX101693) was used to design the PCR mapping.<sup>22</sup> The presence of the *bla*<sub>IMP</sub> gene inside a class 1 integron was tested using primers specific for the 5'-conserved region of a class 1 integron and *bla*<sub>IMP</sub>. The 3' parts of the integron were analysed in three reactions using forward primer IMP-F in combination with reverse primers targeting the aminoglycoside resistance gene *aacA4*, the chloramphenicol resistance gene *catB3* or the 3'-conserved region of a class 1 integron (for list of primers see Table S1). Selected amplicons were sequenced. Conjugative transfer of *bla*<sub>IMP</sub> was tested in all 120 isolates at 37°C using the plasmid-free, rifampicin- and sodium-azide-resistant *E. coli* MT102 recipient strain. Since IncHI plasmids have a thermosensitive mode for conjugation,<sup>23</sup> the experiment was performed in parallel at 25 and 37°C for all isolates harbouring IncHI2 plasmids. Transconjugants were selected on media supplemented with cefotaxime (2 mg/L), sodium azide (100 mg/L) and rifampicin (25 mg/L) and transfer of *bla*<sub>IMP</sub> was confirmed

by PCR. Plasmids carrying *bla*<sub>IMP</sub> were assigned to incompatibility groups by PCR-based replicon typing (PBRT)<sup>24,25</sup> and their sizes were determined using PFGE of the total DNA digested with S1 nuclease. Where transconjugants with a single *bla*<sub>IMP</sub>-carrying plasmid were obtained, plasmid contents were confirmed in the corresponding donor strains using the same procedure.

## Results

### Salmonella

A total of 66 (13%) *Salmonella enterica* isolates were obtained from 504 silver gull cloacal samples from all three nesting colonies. The highest prevalence of salmonellae was found in gulls from Five Islands (56/200; 28%), while the other two locations showed significantly lower prevalences of 0.6% and 6% (Table 1). Salmonellae of 17 different serotypes, with dominance of *Salmonella* Typhimurium (33/66; 50%), were identified (Table 1). *Salmonella* Typhimurium DT2 and DT12 were the most common phage types, found in 16

**Table 1.** *S. enterica* isolates from the silver gull in three nesting colonies in Australia

Serotype, phage type	Nesting colony (no. of samples)		
	WB (144)	FI (200)	MI (160)
Bovismorbificans		2	
Charity		1	
Chester		1	
Heidelberg		1	
Infantis		1	
Mbandaka		1	
Muenchen		1	
Oranienburg		1	
Paratyphi B		1	
Rissen	4 <sup>a</sup>		
3,10:r:-		1 <sup>a</sup>	
Saintpaul		5	
Senftenberg		4	
Stanleyville		4	
Typhimurium DT2	1	14 <sup>a</sup>	1
Typhimurium DT8		1	
Typhimurium DT12		8	
Typhimurium DT13		1	
Typhimurium DT120		3	
Typhimurium RDNC	4		
Virchow		4	
Wangata		1	
Total (prevalence)	9 (6%)	56 (28%)	1 (0.6%)

WB, White Bay; FI, Five Islands; MI, Montague Island.

<sup>a</sup>Three isolates showing resistance to tested antibiotics: *Salmonella* 3,10:r:- (strain no. 1620), resistant to ampicillin and amoxicillin/clavulanic acid; *Salmonella* Typhimurium DT2 (strain no. 1718), resistant to ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefalotin and ceftazidime; and *Salmonella* Rissen (strain no. 1786), resistant to ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, streptomycin, compound sulphonamides, sulfamethoxazole/trimethoprim and tetracycline.

and 8 gulls, respectively. Antibiotic resistance was demonstrated only in 3/66 (4.5%) *Salmonella* isolates (Table 1).

### Isolation of Enterobacteriaceae with the *bla*<sub>IMP</sub> gene

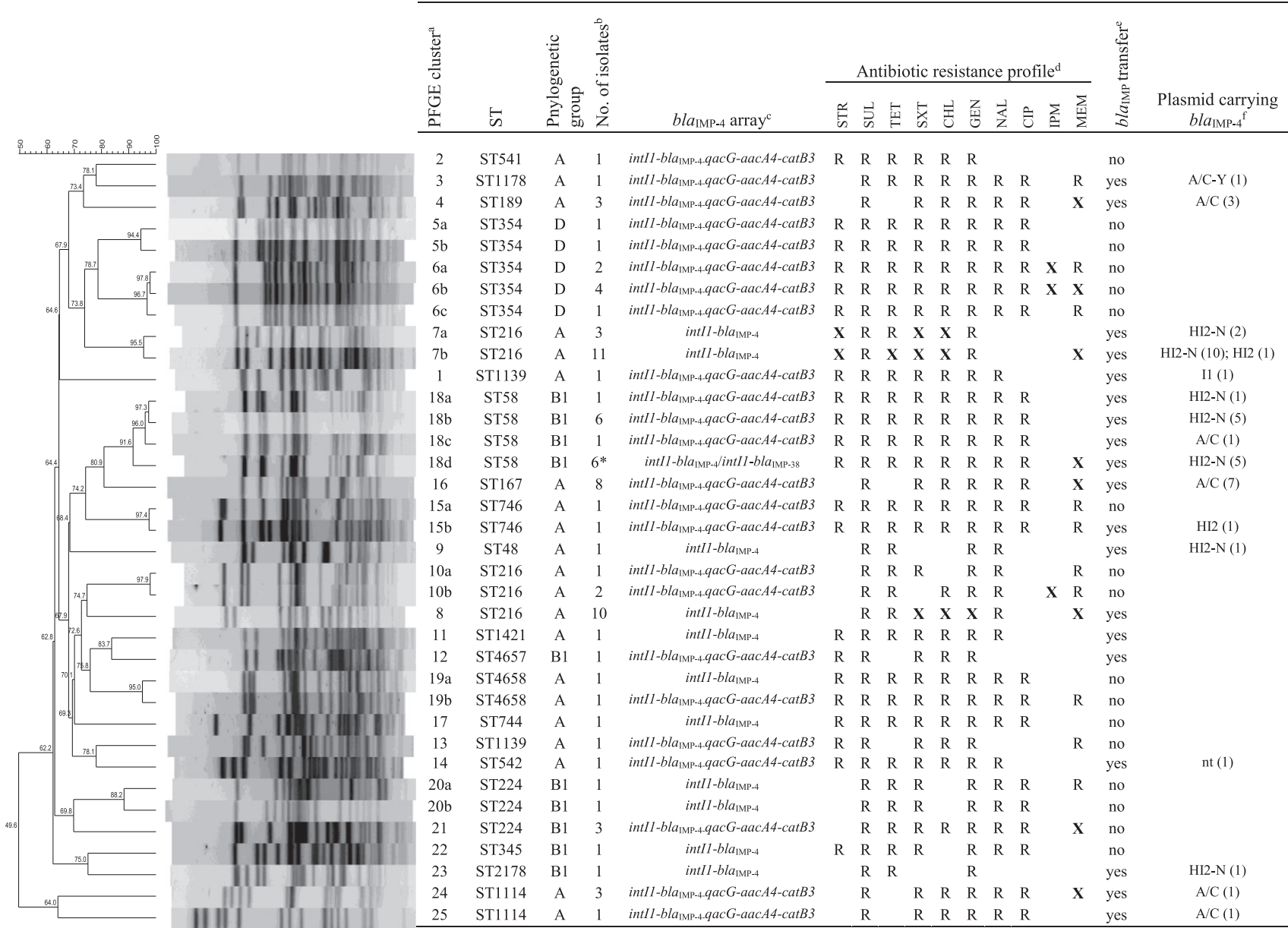
A total of 167 Enterobacteriaceae isolates were obtained by culture on selective media, 150 and 17 on MCA<sub>mer</sub> and CHROMagar KPC, respectively. The only carbapenemase gene detected was *bla*<sub>IMP</sub>, found in 120 (72%, *n*=167) isolates. All *bla*<sub>IMP</sub>-positive isolates originated from 80 of 200 (40%) gulls sampled on Five Islands. No carbapenemase-producing isolates were found in the other two locations, White Bay and Montague Island. Thirty-seven out of 80 (46%) *bla*<sub>IMP</sub>-positive gulls carried more than one isolate; 33 and 4 gulls were colonized by two and three different isolates, respectively. The isolates were identified as *E. coli* (85 isolates), *Escherichia fergusonii* (10), *K. pneumoniae* (9), *Enterobacter aerogenes* (4), *Proteus mirabilis* (4), *Kluyvera georgiana* (2), *Citrobacter freundii* (2), *Enterobacter cloacae* (2), *Proteus penneri* (1) and *Citrobacter braakii* (1). Isolates negative for the carbapenemase genes (*n*=36) included *P. mirabilis* (14), *Hafnia alvei* (6), *E. coli* (4), *Providencia* spp. (4), *E. aerogenes* (3), *E. cloacae* (2), *Morganella morganii* (2) and *Proteus vulgaris* (1) and were susceptible to third-generation cephalosporins (data not shown). Twelve of them (33%) produced inducible AmpC β-lactamase while neither carbapenemase nor ESBL production was found in the other 24 (67%) isolates. AmpC producers showed resistance to ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefalotin and ceftazidime and MICs to meropenem varied from 0.06 to 1 mg/L; they were identified as *H. alvei* (5), *E. aerogenes* (3), *E. cloacae* (2), *Providencia* spp. (1) and *M. morganii* (1).

### Antibiotic resistance profiles of *bla*<sub>IMP</sub>-positive isolates

All *bla*<sub>IMP</sub>-positive isolates showed resistance to at least two antibiotic groups. Resistance to sulphonamides was the most prevalent (100%), followed by resistance to ampicillin (99%), amoxicillin/clavulanic acid (99%), ceftazidime (98%), gentamicin (93%), sulfamethoxazole/trimethoprim (93%), chloramphenicol (73%), tetracycline (69%), nalidixic acid (67%), streptomycin (53%), ciprofloxacin (46%), meropenem (25%) and imipenem (6%). According to CLSI criteria, 57% and 18% showed intermediate resistance and susceptibility to meropenem, respectively. Intermediate resistance and susceptibility to imipenem was observed in 33% and 61% of isolates, respectively. A significantly higher number of non-*E. coli* isolates showed susceptibility to meropenem compared with *E. coli* isolates (*P*<0.01). Such differences were not observed for imipenem. According to CLSI criteria, the majority (79%) of the isolates were susceptible to meropenem, with MICs ≤4 mg/L. MICs were distributed as follows: ≤0.125 mg/L (6 isolates); 0.25 mg/L (7); 0.5 mg/L (39); 1 mg/L (26); 2 mg/L (27); 4 mg/L (12); and 8 mg/L (3).

### Clonality of *bla*<sub>IMP</sub>-positive isolates

PFGE and MLST analysis demonstrated significant genetic diversity of *bla*<sub>IMP</sub>-positive isolates (Figure 1), but also the carriage of identical isolates by different birds (Figure S1). Eighty-five *E. coli* isolates showed 36 unique PFGE profiles and were divided into 25 clusters based on the criteria of 85% similarity of PFGE patterns. MLST analysis assigned the isolates to 19 different STs (Figure 1).



**Figure 1.** Characteristics of *E. coli* isolates with the *bla*<sub>IMP-4</sub> gene from the silver gull on Five Islands. <sup>a</sup>Isolates with  $\geq 85\%$  similarity of PFGE profiles are assigned to the same cluster (designated as 1, 2, 3, etc.). Isolates from the same cluster with  $< 100\%$  identity of PFGE patterns are indicated by letters (e.g. 5a, 5b, 6a, 6b, 6c, etc.). <sup>b</sup>Five of the six *E. coli* ST58 isolates (indicated by an asterisk) carry both *bla*<sub>IMP-4</sub> and *bla*<sub>IMP-38</sub>. <sup>c</sup>Integrons with *intI1-bla*<sub>IMP-4</sub> arrays are missing the 3' parts of the integron conserved region. <sup>d</sup>STR, streptomycin; SUL, compound sulphonamides; TET, tetracycline; SXT, sulfamethoxazole/trimethoprim; CHL, chloramphenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin; IPM, imipenem; MEM, meropenem. All isolates showed resistance to ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefalotin and ceftazidime. Resistance is indicated by 'R'. Resistance patterns of isolates from the same cluster that show variable profiles are indicated by 'X'. <sup>e</sup>Transfer of the gene by conjugation to recipient strains of *E. coli*. All isolates of *E. coli* ST58 carrying two *bla*<sub>IMP</sub> variants transferred only the gene *bla*<sub>IMP-4</sub>. <sup>f</sup>nt, plasmid non-typeable by PBRT.

**Table 2.** Characteristics of non-*E. coli* isolates with the *bla*<sub>IMP</sub> gene from the silver gull on Five Islands

Species	PFGE cluster <sup>a</sup>	ST	No. of isolates	<i>bla</i> <sub>IMP</sub> integron	Antibiotic resistance profile <sup>b</sup>											<i>bla</i> <sub>IMP</sub> transfer <sup>c</sup>	Plasmid carrying <i>bla</i> <sub>IMP</sub> <sup>d</sup>
					STR	SUL	TET	SXT	CHL	GEN	NAL	CIP	IPM	MEM			
<i>Escherichia fergusonii</i>	H1		2	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>		R		R		R	R					yes	HI2 (1)
	H2		7	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>	<b>X</b>	R		<b>X</b>		R	<b>X</b>				<b>X</b>	yes	HI2 (5)
	H3		1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>		R		R		R	R					yes	HI2 (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A	1735	2	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-26</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>	R	R	R	R	R	R					R	yes	A/C (2)
	B	1736	1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>		R		R	R	R						yes	nt (1)
	C	1734	1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>		R		R	R							yes	A/C-Y (1)
	D	394	1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>	R	R	R	R	R	R						no	
	E	1737	2	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>	<b>X</b>	R	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	R	<b>X</b>	<b>X</b>			<b>X</b>	yes	HI2-N (1)
	F	1738	1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>		R		R		R						no	
	G	584	1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>		R				R						yes	L/M (1)
<i>Kluyvera georgiana</i>	I		2	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>		R		R		R					yes		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	J1		1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>		R	R	R	R							yes	L/M (1)
	J2		1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>		R	R	R								yes	L/M (1)
	J3		1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>	R	R			R					R		yes	nt (1)
<i>Enterobacter cloacae</i>	L		1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>	R	R	R	R	R	R						yes	L/M (1)
	O		1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>		R	R	R		R	R			R		no	
	P		1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>		R	R	R	R							yes	L/M (1)
<i>Citrobacter freundii</i>	M		1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-38</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>		R		R	R							yes	A/C (1)
	N		1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-38</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>	R	R	R	R	R	R						yes	A/C (1)
<i>Citrobacter braakii</i>	V		1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>	R	R	R	R	R	R	R					no	
<i>Proteus mirabilis</i>	Q		1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4</i>	R	R	R	R		R	R			R		yes	nt (1)
	R		1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4</i>		R	R	R	R	R	R					no	
	S		1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>		R	R	R		R				R		yes	
	T		1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4-catB3</i>		R	R	R	R	R	R					yes	nt (1)
<i>Proteus penneri</i>	U		1	<i>intI1-bla</i> <sub>IMP-4</sub> - <i>qacG-aacA4</i>		R	R	R		R	R			R		yes	nt (1)

<sup>a</sup>Isolates with ≥85% similarity of PFGE profiles are assigned to the same cluster (designated as A, B, C, etc.). Isolates from the same cluster with <100% identity of PFGE patterns are indicated by numbers (e.g. H1, H2, etc.).

<sup>b</sup>STR, streptomycin; SUL, compound sulphonamides; TET, tetracycline; SXT, sulfamethoxazole/trimethoprim; CHL, chloramphenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin; IPM, imipenem; MEM, meropenem. All isolates showed resistance to ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefalotin and ceftazidime except for two isolates of *P. mirabilis* (isolate of PFGE type S susceptible to ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid and ceftazidime, and isolate of PFGE type T, susceptible to ceftazidime). Resistance is indicated by 'R'. Resistance patterns of isolates from the same cluster that show variable profiles are indicated by 'X'.

<sup>c</sup>Transfer of the gene by conjugation to recipient strains of *E. coli*.

<sup>d</sup>nt, plasmid non-typeable by PBRT.



The most prevalent clonal lineages included ST216 ( $n=27$ ), ST58 ( $n=14$ ), ST354 ( $n=9$ ), ST167 ( $n=8$ ) and ST224 ( $n=5$ ) and constituted 68% of all *E. coli* isolates. Two novel STs (ST4657 and ST4658) were identified among three isolates. Eleven birds carried two *E. coli* isolates of different STs. Twenty-four birds were colonized by two or three different species of the Enterobacteriaceae family. Ten *E. fergusonii* isolates belonged to a single cluster, H, with overall similarity of 95% (Table 2). Nine *K. pneumoniae* isolates were divided into seven distinct PFGE clusters and belonged to seven different STs, including five novel types (ST1734–ST1738). Two different *E. coli* strains sharing an identical  $bla_{IMP-4}$ -integron array and plasmid replicon type were identified only in one bird, which may suggest a limited role of *in vivo* plasmid conjugative transfer inside the gull intestine.

### Sequence analysis and genetic environment of the $bla_{IMP}$ gene

The sequence analysis of  $bla_{IMP}$  amplicons revealed the presence of  $bla_{IMP-4}$  in 116 (97%) isolates. Single-locus variants of  $bla_{IMP-4}$ , the genes  $bla_{IMP-26}$  and  $bla_{IMP-38}$ , were found in two (2%) and seven (6%) isolates, respectively. The gene  $bla_{IMP-26}$  was identified in two isolates of *K. pneumoniae* ST1735 while  $bla_{IMP-38}$  was found in two *C. freundii* isolates (Table 2) and five *E. coli* ST58 that were also positive for the variant  $bla_{IMP-4}$  (Figure 1). Seventy randomly selected isolates representing each PFGE cluster/ST/bacterial species, including 40 *E. coli* and 30 non-*E. coli*, were tested for the genetic context of the  $bla_{IMP}$  gene (Figure S1). The gene  $bla_{IMP}$  was present in the class 1 integron as the first gene cassette in all isolates. PCR mapping revealed the  $bla_{IMP-4}$ -*qacG*-*aacA4*-*catB3* cassette array in 50 (71%) isolates (65% *E. coli*, 80% non-*E. coli*). The same integron arrangement was also demonstrated for  $bla_{IMP-26}$  and  $bla_{IMP-38}$  from *K. pneumoniae* and *C. freundii* isolates, respectively. An additional  $bla_{IMP-4}$ -*qacG*-*aacA4* array was identified in three *Proteus* spp. PCR mapping of the 3' parts of the integron carrying  $bla_{IMP-4}$  or  $bla_{IMP-38}$  failed in 14 *E. coli* (21%), suggesting the existence of a structure different from the typical Australian integron used as a reference in this study.

### Plasmids carrying the $bla_{IMP}$ gene

All isolates were tested for transfer of  $bla_{IMP}$  by conjugation. In 57 (67%) and 22 (63%) *E. coli* and non-*E. coli* isolates, respectively, the gene was transferred at 37°C. The experiment was repeated at 25°C in 41 isolates that did not transfer the gene by conjugation at 37°C, revealing another seven positive isolates. Overall, the conjugative transfer of  $bla_{IMP}$  was successful in 86 (72%) isolates. Transconjugants carrying  $bla_{IMP}$  on a single plasmid were obtained from 66 isolates, including *E. coli* of 11 different STs, *E. fergusonii*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *P. mirabilis* and *P. penneri*. Furthermore, five isolates produced two or three transconjugants that showed a difference in size of  $bla_{IMP}$ -carrying plasmids (Figure S1); therefore, they were all included in the further analysis. Testing of 72 transconjugants demonstrated the association of the gene with plasmids of variable sizes (80–400 kb) and diverse replicons: HI2 ( $n=41$ ), N (30), A/C (19), Y (2), L/M (5) and I1 (1). Thirty-five plasmids contained multi-replicons HI2-N (30) and A/C-Y (2). Six plasmids were not typeable by PBRT.

IncA/C plasmids ranged from 180 to 220 kb and were associated with three  $bla_{IMP}$  genes ( $bla_{IMP-4}$ ,  $bla_{IMP-26}$ ,  $bla_{IMP-38}$ ) within the typical Australian cassette array. The gene  $bla_{IMP-4}$  was found on replicon A/C in *E. coli* of various genotypes (ST58, ST167, ST189 and ST1144) as well as on multi-replicon A/C-Y in one *E. coli* ST1178 and one *K. pneumoniae* ST1734. The presence of the two A/C and Y replicons on a single plasmid did not occur as a result of plasmid fusion during the conjugative experiment. IncL/M plasmids of 75 kb carrying  $bla_{IMP-4}$  within the typical Australian array were found in one isolate of *K. pneumoniae* ST584, three *E. aerogenes* isolates and one *E. cloacae* isolate. Six strains, including *E. coli* ST542, *K. pneumoniae* ST1736, *E. aerogenes*, *P. mirabilis* and *P. penneri*, contained the gene on plasmids ranging between 140 and 400 kb that were not typeable by the PBRT scheme. Apart from two *Proteus* isolates that carried the gene in a class 1 integron with a different cassette array ( $bla_{IMP-4}$ -*qacG*-*aacA4*), the typical Australian array was identified for these plasmids.

The most common replicon associated with  $bla_{IMP-4}$  was HI2, found in 41 transconjugants of donor strains, including *E. coli* ( $n=33$ ; ST48, ST58, ST216, ST746 and ST2178), *E. fergusonii* (7) and *K. pneumoniae* ST1737 (1). *E. coli* ST58 isolates with two  $bla_{IMP}$  variants ( $bla_{IMP-4}$  and  $bla_{IMP-38}$ ) produced transconjugants that carried the gene  $bla_{IMP-4}$  on HI2-N replicons. The gene  $bla_{IMP-38}$  was not transferred by conjugation. IncHI2 plasmids ranged from 150 up to 320 kb and contained the gene in both the typical Australian array (47%) or as a single-gene cassette with unknown structure of the 3' parts of the integron (53%). Twenty-two transconjugants contained plasmids of higher molecular weight than their donors, indicating frequent fusions during conjugation, likely occurring between  $bla_{IMP}$ -carrying IncHI2 or IncHI2-N plasmids and other plasmids, co-resident within the donor strain. The majority (84%) of IncHI2 plasmids were transferred at 37°C and no relationship between the change in plasmid size and temperature used for conjugative transfer was observed (data not shown).

## Discussion

Our study demonstrates a high level of colonization by *Salmonella* and carbapenemase-producing bacteria of gulls on Five Islands. This is the first known report of extensive transmission of carbapenemase-producing bacteria into wild animals. Feeding habits related to garbage and sewage have been largely assumed to increase the risk of transmission of bacteria originating from humans or farm animals to wildlife. The long-term observations of the colony on Five Islands demonstrated the role of human refuse from the local depot near the city of Wollongong as an important source of food for breeding gulls in the colony.<sup>12</sup> We assume that the source of IMP-4-producing isolates for gulls could be clinical material contaminating this local waste depot, supported by the demonstrated significant similarities of gull isolates with those reported from humans in Australia and the fact that no carbapenemase-producing bacteria have been reported from livestock and meat in that continent.

The distribution of *Salmonella* serovars in Australia varies geographically; however, *Salmonella* Typhimurium is one of the most commonly reported serovars from human infections. Three phage types of *Salmonella* Typhimurium, DT135, DT170/108 and DT9,

are predominantly isolated from human infections, but also from animals.<sup>26</sup> Although *Salmonella* Typhimurium dominated in the gulls in our study, none of these phage types was identified. The most prevalent phage type found in gulls, DT2, is commonly isolated from pigeons worldwide.<sup>27</sup> The second most prevalent phage type, DT12, used to be prevalent in human infections in Australia, but it has declined in recent years.<sup>26</sup>

Carbapenemase producers belonged to 10 different species of the Enterobacteriaceae family and showed resistance to several groups of antimicrobials. Most isolates were selected by cultivation on in-house MacConkey agar supplemented with meropenem (0.125 mg/L) and ZnSO<sub>4</sub> (100 mg/L) compared with commercially available CHROMagar KPC, suggesting that media with a low concentration of carbapenems are more suitable for environmental samples, where carbapenemase-producing bacteria can be present at very low concentration. CPE are infrequent in Australia, with overall prevalence of 0.3% and <0.1% in hospitals and the community, respectively.<sup>28</sup> Nevertheless, *bla*<sub>IMP-4</sub>, found in the majority of the isolates from gulls, is also the most prevalent among carbapenemase-producing clinical Enterobacteriaceae isolates in Australia. IMP-4-producing *E. coli* isolates from gulls showed significant clonal similarity with five predominant STs (ST58, ST167, ST216, ST224 and ST354), suggesting their common source in the environment. The majority of them belonged to widely disseminated pathogenic and commensal MDR clones contributing to the spread of ESBL.<sup>29–31</sup> Of note is that *E. coli* ST354 is the most common clonal lineage found among colonized and infected dogs in Australia.<sup>32</sup> ST216, the most prevalent ST in our study, is not frequently reported in association with emerging resistance mechanisms.

Various plasmids and class 1 integrons were described to play a role in the dissemination of *bla*<sub>IMP-4</sub> between clinical isolates in Australia, including the *bla*<sub>IMP-4</sub>-*qacG*-*aacA4*-*catB3* array carried by IncA/C and IncL/M plasmids in Sydney and Melbourne<sup>22</sup> and the *bla*<sub>IMP-4</sub>-*aacA4* array on IncHI2 or IncL/M plasmids in the state of Queensland.<sup>33</sup> The same *bla*<sub>IMP-4</sub>-*qacG*-*aacA4*-*catB3* array was present in the majority of the isolates from gulls in our study and it was carried by conjugative plasmids of various sizes and replicon types, including IncHI2, IncA/C, IncL/M, IncI1 and multi-replicon (HI2-N, A/C-Y) and non-typeable plasmids. We also identified this integron array in single-nucleotide variants of the *bla*<sub>IMP-4</sub> gene, the genes *bla*<sub>IMP-26</sub> and *bla*<sub>IMP-38</sub>, carried by IncA/C plasmids. In Australia and the Philippines, *bla*<sub>IMP-26</sub> has been identified in various STs of *K. pneumoniae* with the *bla*<sub>IMP-26</sub>-*qac*-*aacA4* cassette array on A/C or L/M replicons.<sup>6</sup> A novel *bla*<sub>IMP-4</sub>-*qacG*-*aacA4* cassette array, recently reported for *bla*<sub>IMP-26</sub>,<sup>6</sup> was found in *Proteus* spp. isolates. In 14 *E. coli* isolates, *bla*<sub>IMP-4</sub> was found as a single cassette of the integron missing the 3'-conserved region and carried by multi-replicon HI2-N plasmids. These observations point out the high plasticity of class 1 integrons carrying genes of the *bla*<sub>IMP-4</sub> family and their ability to be transferred between various plasmid families, likely increasing their dissemination potential in bacterial communities.

The most prevalent plasmids associated with the *bla*<sub>IMP</sub> gene found in 57% of transconjugants belonged to IncHI2. Recently, a high incidence of IncHI2 plasmids carrying *bla*<sub>IMP-4</sub> was identified in various human clinical isolates of Enterobacteriaceae in Queensland,<sup>33</sup> suggesting a growing role of this plasmid family in dissemination of *bla*<sub>IMP-4</sub> in Australia. In contrast with this report, most of our plasmids showed a second replicon specific

for plasmids of the IncN family and contained the *bla*<sub>IMP-4</sub>-integron within a different cassette array. IncN plasmid pIMP-HZ1, carrying *bla*<sub>IMP-4</sub> in a class 1 integron with a truncated 3'-conserved region, as observed in our IncHI2-N plasmids, has been recently described in China.<sup>34</sup> Ability of IncHI2 plasmids to conjugate at low temperature and to fuse with highly conjugative epidemic plasmids with a broad host range, such as IncN, may facilitate their dissemination in the environment. We identified several plasmids, such as IncI1 or non-typeable, that have not been previously associated with the *bla*<sub>IMP-4</sub> gene. Demonstrated variability of Enterobacteriaceae isolates and plasmids carrying *bla*<sub>IMP-4</sub> as well as the ability of the plasmids to be efficiently transferred by conjugation even at low temperature may indicate the further movement of the gene between bacteria and replicons after transmission to the environment of the gull nesting colony.

Overall, the findings from the silver gull reflect the current epidemiological situation in Australia, indicating the human origin of IMP-4-producing Enterobacteriaceae. Differences from reported data on human isolates may reflect unexplored complexity of epidemiology of IMP-4-producing bacteria in that continent and the important role of the environment in dissemination of the gene. This study documents a significant level of environmental contamination by bacteria resistant to clinically important carbapenems, which may potentially pose a risk for public health. As migratory birds, gulls may be potential vectors of IMP-producing strains along the coast of Australia. The cloacal samples were taken only from gull chicks in the colony, and the level of colonization by CPE in adult birds as possible vectors is unknown and should be explored in the future studies to fully understand the importance of these findings and the real risks indicated by them. The source of these MDR bacterial strains among the gulls nesting on Five Islands should be explored and proper measures applied to stop the transmission of this pathogen from the human population into the environment.

## Acknowledgements

We thank Jana Hofirkova, Katerina Kachlikova, Katerina Kralova, Magdalena Sevcikova, Jiri Sedmik, Veronika Hradilova, Monika Novakova, Nicol Janecko, Dana Halova, Eva Suchanova and Petra Myskova for excellent cooperation in the laboratory. Our thanks go to Alessandra Carattoli and Sally Partridge for providing control strains. We thank the team of the curators of the Institut Pasteur MLST system (Paris, France) for importing novel alleles, profiles and/or isolates at <http://bigsdweb.pasteur.fr>. This publication made use of the *E. coli*/MLST database developed by Mark Achtman and colleagues at University College Cork, formally hosted at <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>.

## Funding

This work was funded by the Czech Science Foundation (15-14683Y/P502) and CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from the European Regional Development Fund. I. J. and H. D. were supported by the Internal Grant Agency of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences (projects 12/2014/FVHE and 242/2015/FVHE). Characterization of *Salmonella* isolates was partially funded by project LO1218 of MEYS of the CR under the NPU I programme.

## Transparency declarations

None to declare.

## Supplementary data

Table S1 and Figure S1 are available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

## References

- Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- $\beta$ -lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams? *Lancet Infect Dis* 2011; **11**: 381–93.
- Zhao WH, Hu ZQ. IMP-type metallo- $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. *Crit Rev Microbiol* 2011; **37**: 214–26.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011; **17**: 1791–8.
- Hu L, Zhong Q, Shang Y et al. The prevalence of carbapenemase genes and plasmid-mediated quinolone resistance determinants in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from five teaching hospitals in central China. *Epidemiol Infect* 2014; **142**: 1972–7.
- Hong JS, Kim JO, Lee HB. Characteristics of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. *Infect Chemother* 2015; **47**: 33–40.
- Peirano G, Lascols C, Hackel M et al. Molecular epidemiology of Enterobacteriaceae that produce VIMs and IMPs from the SMART surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; **78**: 277–81.
- Leung GH, Gray TJ, Cheong EY et al. Persistence of related bla<sub>IMP-4</sub> metallo- $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae from clinical and environmental specimens within a burns unit in Australia—a six-year retrospective study. *Antimicrob Resist Infect Control* 2013; **2**: 35.
- Guerra B, Fischer J, Helmuth R. An emerging public health problem: acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Vet Microbiol* 2014; **171**: 290–7.
- Palmgren H, Aspan A, Broman T et al. *Salmonella* in black-headed gulls (*Larus ridibundus*); prevalence, genotypes and influence on *Salmonella* epidemiology. *Epidemiol Infect* 2006; **134**: 635–44.
- Iveson JB, Shellam GR, Bradshaw SD et al. *Salmonella* infections in Antarctic fauna and island populations of wildlife exposed to human activities in coastal areas of Australia. *Epidemiol Infect* 2009; **137**: 858–70.
- Smith GC, Carlile N. Habitat use by silver gulls *Larus novaehollandiae* in the Sydney-Wollongong region, New South Wales. *Wetlands (Australia)* 1992; **11**: 33–46.
- Smith GC, Carlile N. Food and feeding ecology of breeding silver gulls (*Larus novaehollandiae*) in urban Australia. *Colonial Waterbirds* 1993; **16**: 9–17.
- Grimont P, Weill F. *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*. 9th edn. Paris, France: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, 2007.
- Anderson ES, Ward LR, Saxe MJ et al. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *J Hyg (Lond)* 1977; **78**: 297–300.
- Ward LR, de Sa JD, Rowe B. A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidemiol Infect* 1987; **99**: 291–4.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fourth Informational Supplement M100-S24*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2014.
- Dunne MW, Hardin DJ. Use of several inducer and substrate antibiotic combinations in a disk approximation assay format to screen for AmpC induction in patient isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., and *Serratia* spp. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 5945–9.
- Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø et al. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**: 552–6.
- Diancourt L, Passet V, Verhoef J et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4178–82.
- Wirth T, Falush D, Lan R et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 2006; **60**: 1136–51.
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; **66**: 4555–8.
- Espedido BA, Partridge SR, Iredell JR. bla<sub>IMP-4</sub> in different genetic contexts in Enterobacteriaceae isolates from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 2984–7.
- Maher D, Taylor DE. Host range and transfer efficiency of incompatibility group HI plasmid. *Can J Microbiol* 1993; **39**: 581–7.
- Carattoli A, Bertini A, Villa L et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; **63**: 219–28.
- Garcia-Fernandez A, Fortini D, Veldman K et al. Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 274–81.
- Powling J. *National Enteric Pathogens Surveillance Scheme, Human Annual Report 1996–2010*. Victoria: Microbiological Diagnostic Unit, University of Melbourne, 2010.
- Rabsch W, Andrews HL, Kingsley RA et al. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect Immun* 2002; **70**: 2249–55.
- Australian Group on Antimicrobial Resistance. *The Evolution of Carbapenemases in Enterobacteriaceae in Australia*. Updated 20 October 2014. [http://www.agargroup.org/files/AGAR\\_Carbapenemase\\_evolution%20Final.pdf](http://www.agargroup.org/files/AGAR_Carbapenemase_evolution%20Final.pdf).
- Dahmen S, Metayer V, Gay E et al. Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of Enterobacteriaceae causing cattle mastitis in France. *Vet Microbiol* 2013; **162**: 793–9.
- Fischer J, Rodriguez I, Baumann B et al. bla<sub>CTX-M-15</sub>-carrying *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from livestock and food in Germany. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 2951–8.
- Izdebski R, Baraniak A, Fiett J et al. Clonal structure, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, and acquired AmpC-type cephalosporinases of *Escherichia coli* populations colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 309–16.
- Guo S, Wakeham D, Brouwers HJ et al. Human-associated fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clonal lineages, including ST354, isolated from canine feces and extraintestinal infections in Australia. *Microbes Infect* 2015; **17**: 266–74.
- Sidjabat HE, Townell N, Nimmo GR et al. Dominance of IMP-4-producing *Enterobacter cloacae* amongst carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 4059–66.
- Lo WU, Cheung YY, Lai E et al. Complete sequence of an IncN plasmid, pIMP-HZ1, carrying bla<sub>IMP-4</sub> in a *Klebsiella pneumoniae* strain associated with medical travel to China. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 1561–2.



## Příloha 31

MASARIKOVA, M., MANGA, I., CIZEK, A., DOLEJSKA, M., ORAVCOVA, V., MYSKOVA, P., KARPISKOVA, R., LITERAK, I., 2016, *Salmonella enterica* resistant to antimicrobials in wastewater effluents and black-headed gulls in the Czech Republic, 2012: Science of the Total Environment, v. 542, p. 102-107.

### Souhrn

---

Ve vzorcích přečištěné odpadní vody při výtoku z Čistírny odpadních vod do řeky Svratky a u mláďat racků chechtavých z hnízdní kolonie na vodním díle Nové mlýny, do kterého se řeka Svratka vlévá, byla sledována přítomnost salmonel. Ve většině vzorků byly zjištěny rezistentní salmonely různých sérotypů a fagotypů. Byly identifikovány izoláty s identickým genetickým profilem ve vodě a u vyšetřených racků. Studie dokumentuje šíření rezistentních salmonel cestou odpadních vod do vodních toků. Čistírny odpadních vod mohou představovat potenciální zdroj rezistentních a patogenních bakterií pro volně žijící zvířata obývající přilehlé vodní ekosystémy.





## *Salmonella enterica* resistant to antimicrobials in wastewater effluents and black-headed gulls in the Czech Republic, 2012



Martina Masarikova<sup>a,b,\*</sup>, Ivan Manga<sup>a,b</sup>, Alois Cizek<sup>a,b</sup>, Monika Dolejska<sup>b,c</sup>, Veronika Oravcova<sup>c</sup>, Petra Myskova<sup>d</sup>, Renata Karpiskova<sup>d</sup>, Ivan Literak<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Department of Infectious Diseases and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic

<sup>b</sup> CEITEC VFU Brno, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic

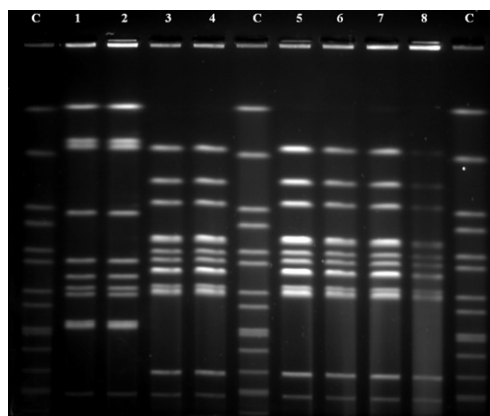
<sup>c</sup> Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic

<sup>d</sup> Department of Bacteriology, Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

### HIGHLIGHTS

- We documented the continuous presence of resistant *Salmonella* in wastewater.
- Using PFGE, we confirmed identical clusters of *Salmonella* in wastewater and gulls.
- Wastewater aids to the spreading of resistant *Salmonella* in the environment.
- Prevalence of resistant *Salmonella* gull isolates in Czech Republic increased.

### GRAPHICAL ABSTRACT



PFGE analysis of salmonellae from wastewaters and gulls.

Lanes C: control strain – *S. Braenderup* H9812, L. 1: *S. Senftenberg* – gull, L. 2: *S. Senftenberg* – wastewater, L. 3: *S. Agona* – wastewater, L. 4: *S. Agona* – wastewater, L. 5: *S. Agona* – gull, L. 6: *S. Agona* – gull, L. 7: *S. Agona* – gull, L. 8: *S. Agona* – gull.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 June 2015

Received in revised form 14 October 2015

Accepted 14 October 2015

Available online 28 October 2015

Editor: D. Barcelo

#### Keywords:

*Salmonella*

Antibiotic resistance

PFGE

### ABSTRACT

We investigated the presence and epidemiological relatedness of *Salmonella* isolates from a wastewater treatment plant (WWTP) in Brno, Czech Republic and from nestlings of black-headed gulls (*Chroicocephalus ridibundus*) at the Nove Mlyny waterworks, situated 35 km downstream from the WWTP. During 2012, we collected 37 wastewater samples and 284 gull cloacal swabs. From wastewater samples, we obtained 89 *Salmonella* isolates belonging to 19 serotypes. At least one resistant strain was contained in 89% of those samples. Ten different serotypes of *Salmonella* were detected in 38 young gulls, among which 14 (37%) were resistant to antimicrobials. Wastewater isolates were mostly resistant to sulphonamides and tetracycline, gull isolates to tetracycline and ampicillin. We detected the occurrence of *bla*<sub>TEM-1</sub>, *tet*(A), *tet*(B), *tet*(G), *sul1*, *sul2*, *sul3*, *floR* and *strA* resistance genes. For the first time, we identified a class 1 integron with the *dfrA12-orfF-aadA2* gene cassette in *S. Infantis*. Using pulsed-field gel electrophoresis, we confirmed the presence of identical clusters of *S. Agona*, *S.*

\* Corresponding author at: University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1/3, Brno 61242, Czech Republic.  
E-mail address: [masarikovam@vfu.cz](mailto:masarikovam@vfu.cz) (M. Masarikova).

## 1. Introduction

*Salmonella* is one of the most common causes of bacterial food-borne diseases worldwide (WHO, 2014), and it is one of the leading food-borne pathogen in causing death (Behraves et al., 2011). In the Czech Republic, non-typhoidal *Salmonella* serotypes cause an estimated 10,000 human salmonellosis cases annually (SZÚ, 2015). In general, the most frequently occurring serotypes responsible for human salmonellosis are S. Enteritidis and S. Typhimurium. In addition, the monophasic variant S. 4,[5],12:i:-, responsible for a number of human salmonellosis outbreaks, has appeared in many countries including the Czech Republic (Hopkins et al., 2010).

Antimicrobial drug resistance among *Salmonella* serotypes, especially in S. Typhimurium and S. 4,[5],12:i:-, manifests an increasing tendency and constitutes an even more serious health problem. The prevalence of resistant *Salmonella* is often connected with antimicrobial use in food animals (Crump et al., 2011), where treatment with tetracyclines and penicillins is most frequently seen, but the usage of quinolones in poultry is also considerable in the Czech Republic (Hera et al., 2012).

Wastewater treatment processes do not eliminate all pathogens and resistant bacteria (Szczepeanowski et al., 2009). Moreover, wastewater treatment plant (WWTP) environments provide an ideal ecosystem for transfer, evolution and spread of the resistance genes, as they offer good conditions in terms of pH, temperature, high nutrient concentration, and close contact of bacteria (Dolejska et al., 2011). Furthermore, the presence of antibiotics and their metabolites may promote the selection of antibiotic-resistant strains and horizontal transfer of antibiotic-resistance genes. These antibiotic-resistant bacteria and resistance genes may be spread into the natural environment, via surface water systems (Huang et al., 2012).

Gulls in urbanized areas are frequently colonized by bacteria of the family *Enterobacteriaceae*, and can be colonized also by *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and/or resistant to quinolones (Dolejska et al., 2009). These birds are considered to constitute an important reservoir and vector of these isolates in the environment. Other study have also detected resistant *Salmonella* isolates in wild black-headed gulls (*Chroicocephalus ridibundus*) in the Czech Republic (Čížek et al., 2007).

We therefore investigated the presence of *Salmonella*, including antibiotic-resistant strains, at a WWTP and associated gull colony and carried out an epidemiological comparison of these isolates to demonstrate the possibility of gull colonization by strains from WWTP effluents.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample collection

Treated wastewater was sampled at the outflow of a WWTP located at Brno, Czech Republic from which the effluents go directly into the Svratka River and further downstream into the Nove Mlyny waterworks. The water samples were taken weekly over a period between March and December 2012. We collected 37 wastewater samples using the Moore swab method (Moore, 1948). The cotton swabs were exposed to the water effluents for 7 days, after which the swabs were placed into a sterile flask and transported to the laboratory.

Black-headed gulls are the most common birds nesting on the Nove Mlyny waterworks (48° 53' N, 16° 36' E). The distance between their nesting colonies and the WWTP at Brno is 35 km. The WWTP and

colonies are directly connected by the Svratka River. In May 2012, we collected 284 samples of cloacal swabs from pre-flight nestlings (one sample per nestling).

### 2.2. *Salmonella* isolation and identification

Swabs from the WWTP and gulls were cultured in buffered peptone water (Oxoid, UK) at 37 °C for 24 h to resuscitate and multiply *Enterobacteriaceae* bacteria. Subsequently, 20 µl of pre-enriched samples were selectively enriched in modified semisolid Rappaport-Vassiliadis Agar (MSRVA) with novobiocin (Oxoid, UK) but no additional antibiotics and then incubated at 42 °C for 24 h. WWTP samples were cultured in parallel in MSRVA supplemented with one of the following antibiotics: tetracycline (8 mg·L<sup>-1</sup>), cefotaxime (2 mg·L<sup>-1</sup>) and ciprofloxacin (0.05 mg·L<sup>-1</sup>).

Samples which showed motility in MSRVA were sub-cultivated on Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar (Oxoid, UK) at 37 °C for 24 h. One presumptive *Salmonella* colony from each XLD agar was then cultured on Columbia blood agar (Oxoid, UK) and, after incubation for 24 h at 37 °C, identified by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Germany). Antigenic structure was determined by slide agglutination with commercial antisera (DenkaSeiken, Japan, and BioRad, France) and Kauffmann-White-LeMinor scheme (Grimont and Weill, 2007). Phage typing was performed according to the HPA Colindale protocol (Anderson et al., 1977; Ward et al., 1987). *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotypes Enteritidis PT1 and PT8; 4,[5],12:i:- DT193, DT208 and U302; and Typhimurium DT1 and DT27 were used as control strains (Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic).

### 2.3. Antimicrobial susceptibility testing

The antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates was tested by disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2010). Twelve antibacterial substances were tested, as described previously (Dolejska et al., 2007). Isolates with decreased susceptibility to quinolones in disk diffusion test were tested for minimum inhibitory concentration (MIC) to nalidixic acid and ciprofloxacin using the agar dilution method (CLSI, 2004).

### 2.4. Detection of antimicrobial resistance determinants and integrons and sequencing of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes

Isolates were tested for the presence of the *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, and *bla*<sub>PSE</sub> genes encoding resistance to beta-lactams; *catA1*, *cmlA*, and *floR* genes for chloramphenicol resistance; and plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6)-Ib*, *qepA*, *oqxA*, and *oqxB* genes by PCR. Isolates resistant to streptomycin were tested for the *strA* gene; those resistant to sulphonamides for the *sul1*, *sul2*, *sul3* genes; and those to tetracyclines for the *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)* genes. The presence of integrase genes *intI1* and *intI2*, variable regions of class 1 and class 2 integrons, and gene cassettes within class 1 and 2 integrons were detected (Literak et al., 2010). Integrons composition was verified by comparing restriction fragment length polymorphism patterns with those of control strains (Machado et al., 2005). Non-standard integrons and *bla*<sub>TEM</sub> genes were sequenced and the composition was determined using BLAST.

Isolates resistant to nalidixic acid and/or ciprofloxacin were tested for the presence of mutations in *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* genes. PCR

**Table 1**  
*Salmonella* isolates detected in wastewater and young black-headed gulls in the Czech Republic during 2012.

Serotype (phage type)	Resistance phenotype <sup>a</sup>	Detected genes, integrons and gene cassettes	Number of isolates		
			WWTP <sup>b</sup>	Gulls	Total
<i>S. Abony</i>	ND	–	0	1	1
<i>S. Agona</i>	ND	–	6(2)	10	16
	A	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	0	1	1
	Gn	<i>intI2</i> ; 12, 2.5 kb: <i>dfrA1/sat/aadA1</i>	1 <sup>cip</sup>	0	1
	S	–	0	1	1
	T	<i>tet(B)</i>	0	1	1
	Na, Su, T	<i>sul1, tet(A), intI1</i> ; 11, 1 kb: <i>aadA1</i>	1 <sup>cef</sup>	0	1
	A, Na, Su, T	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>sul1, sul2, sul3, tet(A), tet(B), intI1</i> ; 11, 1.5 kb: <i>dfr1/aadA1</i>	1 <sup>cip</sup>	0	1
	A, S, Su, T	<i>strA, sul1, tet(A), intI1</i> ; 11, 1 kb: <i>aadA2</i>	1 <sup>tet</sup>	0	1
	A, Su, Sxt, T	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>sul1, sul2, tet(A), intI1</i> ; 11, 1.5 kb: <i>dfr1/aadA1</i>	2 <sup>cip</sup> , 2 <sup>tet</sup>	0	4
	Na, S, Su, T	<i>strA, tet(A), sul1, intI1</i> ; 11, 1 kb: <i>aadA1</i>	1 <sup>cip</sup>	0	1
	A, S, Su, Sxt, T	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>strA, sul1, sul2, tet(A), intI1</i> ; 11, 1.5 kb: <i>dfr1/aadA1</i>	2 <sup>tet</sup>	0	2
<i>S. Altona</i>	A, Su	<i>sul2, sul3</i>	1 <sup>tet</sup>	0	1
<i>S. Braenderup</i>	A, S, Su, Sxt, T	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>strA, sul1, sul2, tet(A), intI1</i> ; 11, 1.5 kb: <i>dfr1/aadA1, intI2</i> ; 12, 2.5 kb: <i>dfrA1/sat/aadA1</i>	1 <sup>tet</sup>	0	1
<i>S. Derby</i>	ND	–	1	0	1
	T	<i>tet(B)</i>	0	1	1
<i>S. Enteritidis</i> (PT4b)	ND	–	0	1	1
	Na	–	0	1	1
<i>S. Enteritidis</i> (PT8)	ND	–	3(3)	5(5)	8
	Na	–	0	1	1
<i>S. Enteritidis</i> (PT12)	ND	–	0	1	1
<i>S. Infantis</i>	A	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	1 <sup>tet</sup>	0	1
	A, Ac, Caz	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	1	0	1
	Na, Su, T	<i>sul1, tet(A), intI1</i> ; 11, 1 kb: <i>aadA1</i>	3 <sup>cip</sup>	0	9
	Na, Su, T	<i>sul1, tet(A), intI1</i> ; 11, 1 kb: <i>adA1, intI2</i> ; 12, 2.5 kb: <i>dfrA1/sat/aadA1</i>	6 <sup>tet</sup> (4)	0	1
	Na, Su, T	<i>sul2, tet(A), intI1</i> ; 11, 1 kb: <i>aadA1</i>	1 <sup>tet</sup> (1)	0	1
	Na, Su, T	<i>sul1, sul2, tet(A), intI1</i> ; 11, 1 kb: <i>aadA1</i>	0	1(1)	1
	A, Su, Sxt, T	–	1 <sup>tet</sup> (1)	0	1
	A, Su, Sxt, T	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>sul1, sul2, tet(A), intI1</i> ; 11, 1.5 kb: <i>dfr1/aadA1</i>	1 <sup>tet</sup>	0	1
	Ac, Caz, Na, T	<i>tet(A)</i>	1 <sup>tet</sup>	0	1
	Kf, Na, Su, T	<i>sul1, intI1</i> ; 11, 1 kb: <i>aadA1</i>	1 <sup>cip</sup>	0	1
	Na, S, Su, T	<i>tet(A), intI1</i> ; 11, 1 kb: <i>aadA1</i>	1 <sup>cip</sup>	0	1
	Na, S, Su, T	<i>sul1, tet(A), intI1</i> ; 11, 1 kb: <i>aadA1</i>	2 <sup>cip</sup>	0	2
	Na, S, Su, T	<i>sul1, tet(A), intI1</i> ; 11, 1 kb: <i>aadA1</i>	1	0	1
	Na, Su, Sxt, T	<i>sul1, tet(A), intI1</i> ; 11, 0.75 kb: <i>dfrV</i>	1 <sup>tet</sup>	0	1
	Na, Su, Sxt, T	<i>sul1, tet(A), intI1</i> ; 11, 1 kb: <i>aadA1</i>	1 <sup>tet</sup>	0	1
	A, S, Su, Sxt, T	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	1 <sup>tet</sup>	0	1
	A, S, Su, Sxt, T	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>strA, sul1, sul2, tet(A), intI1</i> ; 11, 1.5 kb: <i>dfr1/aadA1</i>	3 <sup>tet</sup>	0	3
	A, Cn, Na, Su, Sxt, T	<i>sul1, tet(A), intI1</i> ; 11, 2 kb: <i>dfr12/orf/aadA2</i>	1 <sup>tet</sup>	0	1
	A, Cip, Na, S, Su, T	<i>sul1, tet(A), intI1</i> ; 11, 1 kb: <i>aadA1</i>	1 <sup>cip</sup>	0	1
	A, Na, S, Su, Sxt, T	<i>strA, sul1, tet(A), intI1</i> ; 11, 1 kb: <i>aadA1</i>	1 <sup>tet</sup>	0	1
	A, C, Cn, Cip, Na, S, Su, Sxt, T	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>cat, strA, sul2, tet(A), intI1</i> ; 11, 1 kb: <i>aadA1, intI2</i> ; 12, 2.5 kb: <i>dfrA1/sat/aadA1</i>	1 <sup>cip</sup>	0	1
<i>S. Kentucky</i>	A, Kf, Na	–	1 <sup>cip</sup>	0	1
	Na, S, Su, T	<i>strA, sul1, sul2, tet(A), intI1</i> ; 11, 1 kb: <i>aadA1, intI2</i> ; 12, 2.5 kb: <i>dfrA1/sat/aadA1</i>	1 <sup>cip</sup>	0	1
	A, Ac, Cip, Kf, Na, Su	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>sul1</i>	1 <sup>cip</sup>	0	1
	A, Ac, Cip, Cn, Kf, Na, Su, Sxt, T	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>sul1, sul2, tet(A), intI1</i> ; 11, 1.5 kb: <i>aac(3)-IId/aadA7</i>	1	0	1
<i>S. Mbandaka</i>	ND	–	7	0	7
<i>S. Mikawasima</i>	ND	–	1	0	1
<i>S. Montevideo</i>	ND	–	3	0	3
<i>S. Montevideo</i>	A, C, S, Su, T	<i>floR, strA, sul1, sul2, tet(A), intI1</i> ; 11, 1.2 kb: <i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> / <i>aadA2</i>	1 <sup>tet</sup>	0	1
<i>S. Muenchen</i>	ND	–	1	0	1
<i>S. Muenster</i>	ND	–	1	0	1
<i>S. Newport</i>	ND	–	0	3	3
<i>S. Ohio</i>	ND	–	3	0	3
<i>S. Ohio</i>	Caz	<i>intI1</i>	1	0	1
<i>S. Senftenberg</i>	ND	–	2(1), 2 <sup>tet</sup>	1(1)	5
<i>S. Senftenberg</i>	Su, Sxt	<i>sul1, sul2, intI1</i> ; 11, 1.3 kb: <i>dfr1</i>	1	0	1
<i>S. Stanley</i>	Na	–	1 <sup>cip</sup>	0	1
<i>S. Stanley</i>	Na	<i>intI1</i> ; 11, 1.5 kb: <i>dfr1/aadA1, intI2</i> ; 12, 2.5 kb: <i>dfrA1/sat/aadA1</i>	1 <sup>cip</sup>	0	1
<i>S. Tennessee</i>	ND	–	2	0	2
<i>S. Typhimurium</i> (DT85)	ND	–	0	1	1
<i>S. Typhimurium</i> (DT104)	A, C, Su, T	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>floR, sul1, sul2, tet(A), intI1</i> ; 11, 1.2 kb: <i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> / <i>aadA2</i>	1 <sup>tet</sup>	0	1
	A, C, Na, S, Su, T	<i>floR, sul2, tet(G), intI1</i> ; 11, 1.2 kb: <i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> / <i>aadA2</i>	0	1	1
	A, C, S	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>floR, strA</i>	0	1	1
<i>S. Typhimurium</i> (DT116)	ND	–	1	0	1
<i>S. Umbilo</i>	Na, T	<i>tet(A)</i>	1 <sup>cip</sup>	0	1
<i>S. Zanzibar</i>	A, S, T	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>strA, tet(A)</i>	1 <sup>tet</sup>	0	1
<i>S. 9,12:l,v:-</i>	ND	–	0	1	1
<i>S. 4,[5],12:i:-</i> (DT193)	A, S, Su, T	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>strA, sul2, tet(B)</i>	0	3	3
<i>S. 4,[5],12:i:-</i> (DT193)	A, S, Su, T	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>strA, sul1, sul2, tet(B)</i>	0	1	1

Table 1 (continued)

Serotype (phage type)	Resistance phenotype <sup>a</sup>	Detected genes, integrons and gene cassettes	Number of isolates		
			WWTP <sup>b</sup>	Gulls	Total
S. 4,[5],12:i:- (DT193)	A, S, Su, T, Na	<i>strA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>	0	1	1
Total			89	38	127

WWTP: wastewater treatment plant.

Numbers in brackets represent number of isolates selected for pulsed-field gel electrophoresis.

<sup>a</sup> A: ampicillin; Ac: amoxicillin/clavulanic acid; C: chloramphenicol; Caz: ceftazidime; Cf: cephalothin; Cip: ciprofloxacin; Gn: gentamicin; Na: nalidixic acid; S: streptomycin; Su: sulphonamides cp.; Sxt: sulfamethoxazole/trimethoprim; T: tetracycline; ND: resistance or resistance genes were not detected.

<sup>b</sup> Method of isolation through modified semisolid Rappaport-Vassiliadis Agar (MSRVA): cef – MSRVA with cefotaxime (2 mg·L<sup>-1</sup>); cip – MSRVA with ciprofloxacin (0.05 mg·L<sup>-1</sup>); tet – MSRVA with tetracycline (8 mg·L<sup>-1</sup>); without index: nonselective MSRVA.

fragments containing the quinolone-resistance determining region (QRDR) of the *gyr* and *par* genes were amplified using primers as shown in Supplementary material – Table S1.

### 2.5. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

XbaI-pulsed-field gel electrophoresis was carried out to analyze the relatedness of *Salmonella* isolates from WWTP and gulls. In total, 23 isolates of the same serotype, phage type and antibiotic-resistance phenotype were chosen for the comparison. Eight of these belonged to the *S. Enteritidis* PT8 serotype (3 WWTP + 5 gulls isolates), seven to *S. Infantis* (6 + 1), six to *S. Agona* serotype (2 + 4), and two each to *S. Senftenberg* (1 + 1). The one-day standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Salmonella* by PFGE was used, as recommended by PulseNetUSA (2004). Profiles were analyzed using BioNumerics 6.6 fingerprinting software (Applied Maths, Belgium). Cluster analysis of the Dice similarity indices was done to generate a dendrogram describing the relationships among PFGE profiles. Isolates were considered to be related and to belong to the same PFGE cluster if their Dice similarity index was  $\geq 85\%$ .

## 3. Results

### 3.1. *Salmonella* isolation and classification

We found *Salmonella* in all 37 wastewater samples, and 89 *Salmonella* isolates were isolated overall. Among these we identified 19 serotypes. The serotypes found most frequently were *S. Infantis* (35%, 31/89), *S. Agona* (19%, 17/89), *S. Mbandaka* (8%, 7/89) and *S. Senftenberg* (6%, 5/89). *Salmonella* was found in 38 (13%) of 284 young gulls. Among 10 different serotypes, the most common was *S. Agona* (34%, 13/38), followed by *S. Enteritidis* (24%, 9/38), *S. 4,[5],12:i:-* (13%, 5/38), and *S. Typhimurium* (8%, 3/38) (Table 1).

### 3.2. Antimicrobial resistance testing

Resistant *Salmonella* isolates were found in 33 (89%) out of 37 wastewater samples. Forty-eight isolates were resistant to three or more antimicrobials. Resistance to sulphonamide compounds and tetracycline (both 52%, 46/89), nalidixic acid (38%, 34/89) and ampicillin (31%, 28/89) was most frequent. Among 38 gull *Salmonella* isolates, 37% (14/38) were resistant to antimicrobials. Eight isolates displayed resistance to three or more antimicrobials. Most frequent was resistance to tetracycline (24%, 9/38), followed by ampicillin and streptomycin (both 21%, 8/38), and to sulphonamides (18%, 7/38). The quinolone resistance phenotype was detected in 33 wastewater isolates, all of which demonstrated nalidixic acid MIC  $\geq 256$  mg·L<sup>-1</sup>. Three of them showed resistance also to ciprofloxacin by disk diffusion test, with MIC to ciprofloxacin  $> 8$  mg·L<sup>-1</sup>. Five gull *Salmonella* isolates with the quinolone resistance phenotype demonstrated MIC to nalidixic acid from 4 mg·L<sup>-1</sup> to  $> 256$  mg·L<sup>-1</sup> with MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> value  $> 256$  mg·L<sup>-1</sup>. All isolates from gulls were susceptible to ciprofloxacin. All detected

resistance genes and integrons are shown in Table 1. For the first time, we identified class 1 integron with the *dfrA12-orfF-aadA2* gene cassette in *S. Infantis*.

The sequence analysis, performed in five *Salmonella* isolates resistant to nalidixic acid from gulls and in 33 isolates resistant to nalidixic acid or ciprofloxacin from the WWTP, revealing single nucleotide polymorphisms (SNPs) inducing amino acid substitutions only in the *gyrA* and *parC* genes. None of the isolates carried mutation in a *parE* or *gyrB* gene. All mutations are shown as Supporting information – Table S2.

### 3.3. Pulsed-field gel electrophoresis

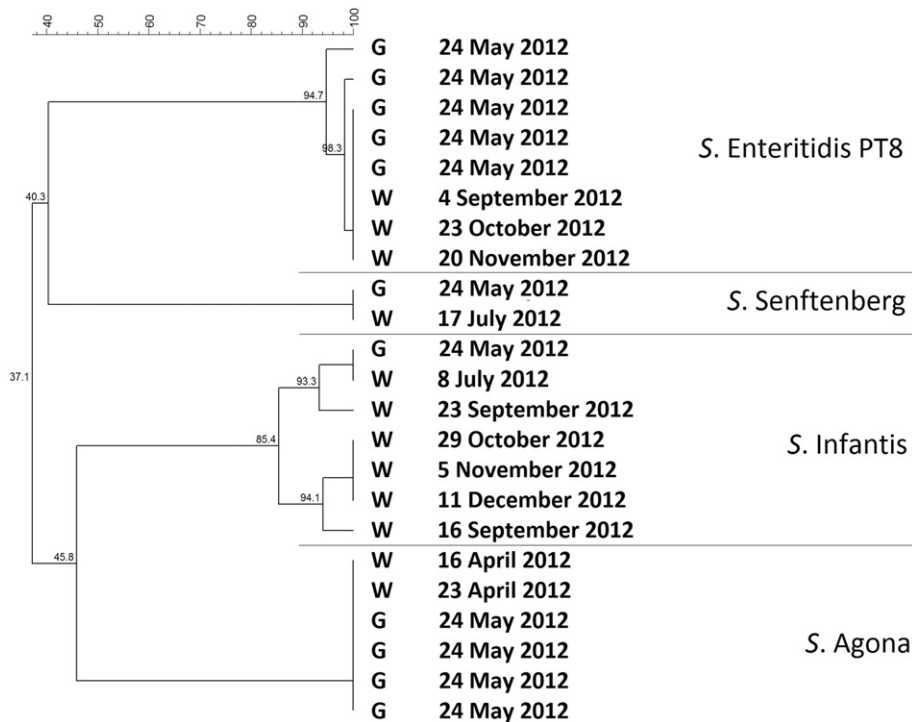
All tested *S. Agona* and *S. Senftenberg*, six *S. Enteritidis* PT8 and two *S. Infantis* isolates from the WWTP and from gulls had the same macrorestriction patterns within their serotypes. The remaining isolates were related and had a Dice coefficient of similarity greater than 85%. Hence, we demonstrated the clonal relatedness of these strains (Fig. 1, Graphical abstract).

## 4. Discussion

We documented the continuous presence of *Salmonella* in WWTP effluents and confirmed the occurrence of resistant *Salmonella* strains in 89% of samplings. Such a high proportion of resistant *Salmonella* isolated from wastewater points to a high risk for environmental contamination. Multi-resistant *Salmonella* isolates from wastewater have been observed also in other studies (Pignato et al., 2010; Oubrim et al., 2012), indicating the great importance of WWTP effluents and that these may constitute a risk for public health. Wastewater can play a role as a mixing vessel for pathogenic microorganisms originating from different sources (Tennstedt et al., 2003). In addition, significant risks consist in the possibility for horizontal transfer of resistance genes among these organisms together with the possibility of direct contact with antibiotic residues occurring in wastewaters (Dolejska et al., 2011). After the treatment process, wastewater drains into rivers, microbes are spread into the environment, and these may potentially colonize wildlife.

The serotype Enteritidis has long been the leading cause of human non-typhoid salmonellosis in the Czech Republic (SZÚ, 2015), and our isolates of this serotype may therefore be of human origin. Nevertheless, this serotype dominates also in poultry (Bzdil et al., 2012) and one of the wastewater contributors to the Brno WWTP is a poultry slaughterhouse. Therefore, we must also consider the possibility that these strains are of animal origin. It is surprising that we only rarely isolated such a common isolate. Moreover, the serotype Typhimurium, which often is isolated from pigs in the Czech Republic (Bzdil et al., 2012), comprised only a small percentage of our *Salmonella* isolates. We did not isolate the monophasic variant *S. 4,[5],12:i:-* from the wastewater at all, but this has been shown to occur repeatedly among *Salmonella* isolated from gulls. We could speculate about the ability of these serotypes to survive the treatment process. Similarly, Baudart et al. (2000) detected *S. Typhimurium* in WWTP effluents only sporadically in comparison





**Fig. 1.** XbaI-pulsed-field gel electrophoresis of 23 *Salmonella* isolates from WWTP and gulls. W: wastewater G: gull.

with other sampling sites, and they did not detect *S. Enteritidis* in WWTP effluents. By contrast, and similar to our study, *S. Agona* and *S. Infantis* occurred often in their WWTP effluents. On the other hand, we have demonstrated in wastewater the serotype Mikawasima, the incidence of which has significantly increased in Europe and in the Czech Republic during 2012–2013 (EFSA and ECDC, 2013; Myšková and Karpíšková, 2014), as well as the serotype Stanley, which was involved in epidemic outbreaks across Europe during 2011–2013 (Kinross et al., 2014). Based on the wide range of serotypes detected, we assume that the *Salmonella* isolates from the Brno WWTP were of both human and animal origins.

Human sewage is an important source of antibiotic-resistant bacteria, some of which survive the treatment process and are released into the environment (Dolejska et al., 2011). Therefore, we set out to document the occurrence of *Salmonella* in WWTP effluents and subsequently in young pre-flying gulls. We detected *Salmonella* isolates with the same macrorestriction profiles in the WWTP and in gulls. These results strongly support the assumption that antibiotic-resistant *Salmonella* is spreading from the WWTP to the water environment and then to wildlife, including migratory waterbirds. In addition to feed, water environment surrounding nesting colony is dominant source of (resistant) microorganisms, which can colonize nestlings (Čížek et al., 2007). We could hypothesize that young gulls have been colonized by bacteria via the feed collected by their parents directly in the area of WWTP Brno. However, this is unlikely, due to the distance between the colony and the WWTP (35 km). Adults search feed within a radius of 10 km from the colony during the nesting season (Hudec and Stastny, 2005).

We isolated *Salmonella* of ten different serotypes from 13% of gulls. This prevalence is lower than in other countries. In the USA, *Salmonella* was demonstrated in 17% of seagulls (Gruszynski et al., 2014), and in Chile even 51% of kelp gulls (*Larus dominicanus*) and 75% of Franklin's gulls (*Leucophaeus pipixcan*) were observed to carry *Salmonella* (Rodríguez et al., 2012). The prevalence of *Salmonella* in young black-headed gulls at Nove Mlýny has shown a decreasing tendency. Whereas 31% of young gulls had been found to be colonized by *Salmonella* in 1991, in 2005 only 9% of them carried *Salmonella* (Čížek et al., 2007).

Nevertheless, the prevalence of resistant *Salmonella* colonizing gulls at Nove Mlýny is increasing. While in 1991 resistant *Salmonella* had been detected among 1% of gulls (3/267) and in 2005 all *Salmonella* isolates were susceptible to the tested antibiotics (Čížek et al., 2007), in this study resistant *Salmonella* was detected in 5% of gulls from the same locality.

Integrations were present in *Salmonella* isolated from both wastewater and gulls, and more often in *Salmonella* cultivated via antibiotics-supplemented MRSVA. We detected integrations of class 1 and class 2 containing several types of gene cassettes. In Portugal, *Salmonella* isolated from wild boars and Bísaro pigs contained only integrations of class 1 (Caleja et al., 2011), and 14 isolates of *S. Rissen* contained gene cassettes *dfrA12-orfF-aadA2*. The gene cassette *dfrA12-orfF-aadA2* has also previously been described in different serotypes (Fernández et al., 2007; Hsu et al., 2013). We report here for the first time about the gene cassette *dfrA12-orfF-aadA2* in *S. Infantis*.

#### Acknowledgments

We would like to thank Marie Slavikova, Jana Hofirkova, Dalibor Pavlicek and Martina Janatova for their help in the field and laboratory.

This work was supported by the Central European Institute of Technology Project of the European Regional Development Fund [grant number CZ.1.05/1.1.00/02.0068]; by the Internal Grant Agency of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic [grant number IGA 74/2014/FVL]; by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under the NPU I program [grant number LO1218]; by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under the program OP VK [grant number CZ.1.07/2.3.00/30.0053]; and by Ministry of Health of the Czech Republic [grant number NT/14398].

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary tables.



## References

- Anderson, E.S., Ward, L.R., Saxe, M.J., de Sa, J.D., 1977. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella* Typhimurium. J. Hyg. (Lond.) 78 (2), 297–300.
- Baudart, J., Lemarchand, K., Brisabois, A., Lebaron, P., 2000. Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. Appl. Environ. Microbiol. 66 (4), 1544–1552.
- Behraves, C.B., Jones, T.F., Vugia, D.J., Long, C., Marcus, R., Smith, K., Thomas, S., Zansky, S., Fullerton, K.E., Henao, O.L., Scallan, E., FoodNet Working Group, 2011. Deaths associated with bacterial pathogens transmitted commonly through food: foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 1996–2005. J. Infect. Dis. 204 (2), 263–267.
- Bzdil, J., Hubíková-Kubičková, I., Kvapilová, M., 2012. Výskyt salmonel v klinických materiálech v humánní a veterinární sféře v letech 2006–2010 (Prevalence of *Salmonella* in clinical materials in human and veterinary sphere over the period of 2006 to 2010). Veterinářství 62, 625–629 (In Czech).
- Caleja, C., de Toro, M., Gonçalves, A., Themudo, P., Vieira-Pinto, M., Monteiro, D., Rodrigues, J., Sáenz, Y., Carvalho, C., Igrejas, G., Torres, C., Poeta, P., 2011. Antimicrobial resistance and class I integrons in *Salmonella enterica* isolates from wild boars and Bísaro pigs. Int. Microbiol. 14 (1), 19–24.
- Čížek, A., Dolejšká, M., Karpíšková, R., Dědičová, D., Literák, I., 2007. Wild black-headed gulls (*Larus ridibundus*) as an environmental reservoir of *Salmonella* strains resistant to antimicrobial drugs. Eur. J. Wildl. Res. 53 (1), 55–60.
- CLSI, 2004. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: Approved Standard M11-A6. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI, 2010. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard M02-A10 (Wayne, PA).
- Crump, J.A., Medalla, F.M., Joyce, K.W., Krueger, A.L., Hoekstra, R.M., Whichard, J.M., Barzilay, E.J., Emerging Infections Program NARMS Working Group, 2011. Antimicrobial resistance among invasive nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates in the United States: National Antimicrobial Resistance Monitoring System, 1996 to 2007. Antimicrob. Agents Chemother. 55 (3), 1148–1154.
- Dolejška, M., Cizek, A., Literak, I., 2007. High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from Black-headed Gulls in the Czech Republic. J. Appl. Microbiol. 103 (1), 11–19.
- Dolejšká, M., Bierošová, B., Kohoutová, L., Literák, I., Čížek, A., 2009. Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. J. Appl. Microbiol. 106 (6), 1941–1950.
- Dolejška, M., Frolkova, P., Florek, M., Jamborova, I., Purgertova, M., Kutilova, I., Cizek, A., Guenther, S., Literak, I., 2011. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. J. Antimicrob. Chemother. 66 (12), 2784–2790.
- EFSA, ECDC, 2013. Unusual increase of *Salmonella* Mikawasima infections in humans. <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/512e.pdf>.
- Fernández, A.G., Cloeckeaert, A., Bertini, A., Praud, K., Doublet, B., Weill, F.X., Carattoli, A., 2007. Comparative analysis of IncHI2 plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-2</sub> or *bla*<sub>CTX-M-9</sub> from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains isolated from poultry and humans. Antimicrob. Agents Chemother. 51 (11), 4177–4180.
- Grimont, P.A.D., Weill, F.X., 2007. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. 9th ed. <http://www.pasteur.fr/jp/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>.
- Gruszynski, K., Pao, S., Kim, C., Toney, D.M., Wright, K., Colón, A., Engelmeier, T., Levine, S.J., 2014. Evaluating gulls as potential vehicles of *Salmonella enterica* serotype Newport (JJPX01.0061) contamination of tomatoes grown on the eastern shore of Virginia. Appl. Environ. Microbiol. 80 (1), 235–238.
- Hera, A., Koutecká, L., Dorn, D., Pokludová, L., 2012. Consumption of antibiotics and antiparasitics in veterinary medicine in the Czech Republic: trends in consumptions of premixes in 2005–2011; detailed comparison of antimicrobial consumption in 2010–2011. [http://www.uskvbl.cz/attachments/665\\_ATB\\_spotreba\\_2003-2011\\_finalni\\_draft.pdf](http://www.uskvbl.cz/attachments/665_ATB_spotreba_2003-2011_finalni_draft.pdf) (In Czech).
- Hopkins, K.L., Kirchner, M., Guerra, B., Granier, S.A., Lucarelli, C., Porrero, M.C., Jakubczak, A., Threlfall, E.J., Mevius, D.J., 2010. Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? Euro. Surveill. 15 (22), 19580.
- Hsu, Y.M., Tang, C.Y., Lin, H., Chen, Y.H., Su, Y.H., Chen, D.S., Lin, J.H., Chang, C.C., 2013. Comparative study of class I integron, ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline (ACSSuT) and fluoroquinolone resistance in various *Salmonella* serovars from humans and animals. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 36 (1), 9–16.
- Huang, J.J., Hu, H.Y., Lu, S.Q., Li, Y., Tang, F., Lu, Y., Wei, B., 2012. Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. Environ. Int. 42, 31–36.
- Hudec, K., Stastny, K., 2005. *Larus ridibundus* Linnaeus. In: Hudec, K., Stastny, K. (Eds.), Ptáci – Aves fauna CR II/2 (Birds of the Czech Republic). Academia, Prague, pp. 759–769 (In Czech).
- Kinross, P., van Alphen, L., Martinez Urtaza, J., Struelens, M., Takkinen, J., Coulombier, D., Makela, P., Bertrand, S., Mattheus, W., Schmid, D., Kanitz, E., Rucker, V., Krisztalovics, K., Paszti, J., Szogyenyi, Z., Lancz, Z., Rabsch, W., Pfefferkorn, B., Hiller, P., Mooijman, K., Gossner, C., 2014. Multidisciplinary investigation of a multicountry outbreak of *Salmonella* Stanley infections associated with Turkey meat in the European Union, August 2011 to January 2013. Euro. Surveill. 19 (19), 20801.
- Literak, I., Dolejska, M., Janoszowska, D., Hrusakova, J., Meissner, W., Ryzska, H., Bzoma, S., Cizek, A., 2010. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. Appl. Environ. Microbiol. 76 (24), 8126–8134.
- Machado, E., Cantón, R., Baquero, F., Galán, J.C., Rollán, A., Peixe, L., Coque, T.M., 2005. Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. Antimicrob. Agents Chemother. 49 (5), 1823–1829.
- Moore, B., 1948. The detection of paratyphoid carriers in towns by means of sewage examination. Mon. Bull. Minist. Health. Public Health Lab. Serv. 7, 241–248.
- Myšková, P., Karpíšková, R., 2014. Unusual occurrence of *Salmonella* Mikawasima in 2012–2013 in the Czech Republic: part of a multistate outbreak? Pol. J. Microbiol. 63 (3), 355–357.
- Oubrim, N., Ennaji, M.M., Badri, S., Cohen, N., 2012. Removal of antibiotic-resistant *Salmonella* in sewage water from wastewater treatment plants in Settat and Soualem, Morocco. Eur. J. Sci. Res. 68 (4), 565–573.
- Pignato, S., Coniglio, M.A., Faro, G., Lefevre, M., Weill, F.X., Giammanco, G., 2010. Molecular epidemiology of ampicillin resistance in *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* from wastewater and clinical specimens. Foodborne Pathog. Dis. 7 (8), 945–951.
- PulseNetUSA, 2004. One-day (24–28 h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). PulseNet PFGE Manual 5.1–5.3 pp.1–13.
- Rodríguez, F., Moreno, J., Ortega, R., Mathieu, C., García, A., Cerda-Leal, F., González-Acuña, D., 2012. Evidence for Kelp Gulls (*Larus dominicanus*) and Franklin's Gulls (*Leucophaeus pipixcan*) as carriers of *Salmonella* by real-time polymerase chain reaction. J. Wildl. Dis. 48 (4), 1105–1108.
- Szczepanowski, R., Linke, B., Krahn, I., Gartemann, K.H., Gützkow, T., Eichler, W., Pühler, A., Schlüter, A., 2009. Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. Microbiology 155 (7), 2306–2319.
- SZÚ, 2015. Infections in Czech Republic – EPIDAT. <http://www.szu.cz/publikace/data/infekce-v-cr> (In Czech).
- Tennstedt, T., Szczepanowski, R., Braun, S., Pühler, A., Schlüter, A., 2003. Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. FEMS Microbiol. Ecol. 45 (3), 239–252.
- Ward, L.R., de Sa, J.D.H., Rowe, B., 1987. A phage-typing scheme for *Salmonella* Enteritidis. Epidemiol. Infect. 99 (2), 291–294.
- WHO, 2014. *Salmonella*. <http://www.who.int/topics/salmonella/en/>.

## Příloha 32

PAPAGIANNITSIS, C.C., DOLEJSKA, M., IZDEBSKI, R., GIAKKOUI, P., SKÁLOVÁ, A., CHUDĚJOVÁ, K., DOBIASOVA, H., VATOPOULOS, A.C., DERDE, L.P., BONTEN, M.J., GNIADKOWSKI, M., HRABÁK, J., 2016, Characterisation of IncA/C<sub>2</sub> plasmids carrying an In416-like integron with the *bla*<sub>VIM-19</sub> gene from *Klebsiella pneumoniae* ST383 of Greek origin. International Journal of Antimicrobial Agents: v. 47, p. 158-162.

### Souhrn

---

V rámci této studie byla sestavena primární nukleotidová sekvence tří multirezistentních IncA/C plazmidů z čeledi Enterobacteriaceae nesoucích gen karbapenemázy VIM-19. Bioinformatická analýza prokázala, že všechny tři plazmidy náležejí do linie IncA/C<sub>2</sub> a gen *bla*<sub>VIM-19</sub> je součástí integronu třídy 1 s identickou strukturou. V práci je nastíněna možná evoluce této skupiny plazmidů. Studie upozorňuje na význam této plazmidové linie na diseminaci In416 integronu mezi klinickými izoláty enterobakterií.





## Short Communication

# Characterisation of IncA/C<sub>2</sub> plasmids carrying an In416-like integron with the *bla*<sub>VIM-19</sub> gene from *Klebsiella pneumoniae* ST383 of Greek origin



Costas C. Papagiannitsis<sup>a,b,\*</sup>, Monika Dolejska<sup>c,d</sup>, Radosław Izdebski<sup>e</sup>, Panagiota Giakkoupi<sup>f</sup>, Anna Skálová<sup>a</sup>, Kateřina Chudějová<sup>a</sup>, Hana Dobiasova<sup>c,d</sup>, Alkiviadis C. Vatopoulos<sup>f</sup>, Lennie P.G. Derde<sup>g</sup>, Marc J.M. Bonten<sup>g</sup>, Marek Gniadkowski<sup>e</sup>, Jaroslav Hrabák<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Medicine and University Hospital in Plzeň, Charles University in Prague, Plzeň, Czech Republic

<sup>b</sup> Biomedical Center, Faculty of Medicine and University Hospital in Plzeň, Charles University in Prague, Plzeň, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic

<sup>d</sup> CEITEC, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic

<sup>e</sup> National Medicines Institute, Warsaw, Poland

<sup>f</sup> Department of Microbiology, National School of Public Health, Athens, Greece

<sup>g</sup> University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 August 2015

Accepted 1 December 2015

## Keywords:

IncA/C<sub>2</sub> plasmids

CMY

VIM

Class 1 integron

## ABSTRACT

The complete nucleotide sequences of three multidrug resistance (MDR) IncA/C-like plasmids from Enterobacteriaceae isolates carrying the VIM-type carbapenemase-encoding integrons In4863 (*bla*<sub>VIM-19</sub>-*aacA7*-*dfrA1*-*ΔaadA1*-*smr2*) or In4873 (*bla*<sub>VIM-1</sub>-*aacA7*-*dfrA1*-*ΔaadA1*-*smr2*) were determined, which are the first In416-like elements identified in Greece. Plasmids pKP-Gr642 and pKP-Gr8143 were from *Klebsiella pneumoniae* ST383 isolates, whereas plasmid pEcl-Gr4873 was from an *Enterobacter cloacae* ST88 isolate. Sequencing showed that pKP-Gr642 (162 787 bp) and pKP-Gr8143 (154 395 bp) consisted of the type 1 IncA/C<sub>2</sub> conserved backbone, the *bla*<sub>CMY-2</sub>-like gene-containing region, and the ARI-B (with the *sul2* gene) and ARI-A (with a class 1 integron) resistance islands, like the plasmid pUMNK88.161 from the USA. The third plasmid, pEcl-Gr4873 (153 958 bp), exhibited extensive similarity with the type 2 IncA/C<sub>2</sub> plasmid pR55 from France. pEcl-Gr4873 carried only one resistance island of a hybrid transposon structure inserted in a different location to ARI-A in type 1 A/C<sub>2</sub> plasmids. In all three plasmids, the In416-like integrons In4863 or In4873 were identified within non-identical class II transposon structures. All three In416-like-carrying regions presented significant similarities with the MDR region of the IncA/C<sub>2</sub> plasmid pCC416 from Italy, carrying the prototype In416 integron (*bla*<sub>VIM-4</sub>-*aacA7*-*dfrA1*-*ΔaadA1*-*smr2*). These findings provided the basis for speculations regarding the evolution of IncA/C<sub>2</sub> plasmids with In416-like integrons, and confirmed the rapid evolution of some IncA/C<sub>2</sub> plasmid lineages. Considering the broad host range of IncA/C<sub>2</sub> molecules, it seems that pKP-Gr642, pKP-Gr8143 and pEcl-Gr4873 plasmids might support the diffusion of In416-like integrons among Enterobacteriaceae.

© 2015 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

## 1. Introduction

In recent years there has been a growing interest in IncA/C-type multidrug resistance (MDR) plasmids, which are commonly identified among agricultural and clinical bacterial isolates in the USA, Europe and elsewhere. IncA/C plasmids share a conserved backbone into which resistance fragments are integrated at various positions, and they readily circulate in numerous species and

\* Corresponding author. Present address: Department of Microbiology, Faculty of Medicine and University Hospital in Plzeň, Alej Svobody 80, 304 60 Plzeň, Czech Republic. Tel.: +420 603 113 354; fax: +420 37 710 3250.

E-mail address: [c.papagiannitsis@gmail.com](mailto:c.papagiannitsis@gmail.com) (C.C. Papagiannitsis).

across taxonomic borders [1,2]. Among many resistance genes observed, the A/C plasmids have often been found to disseminate *bla*<sub>CMY-2</sub>-like cephalosporinase genes [1]; more recently, the spread of *bla*<sub>NDM</sub> carbapenemase genes has also been in part associated with such molecules [3]. Carattoli et al. [1] reported that *bla*<sub>CMY-2</sub>-like-carrying plasmids from the USA represented a new replicon variant, named *repA/C*<sub>2</sub> (IncA/C<sub>2</sub>), exhibiting 26 nucleotide substitutions with respect to the IncA/C reference plasmid pRA1 (IncA/C<sub>1</sub>) [4]. In addition, a comparison of IncA/C<sub>2</sub> plasmids from different geographic areas showed that those with the *bla*<sub>CMY-2</sub>-like region represent a unique phylogenetic lineage [5], increasingly spreading in bacterial populations [1,5]. The DNA segment containing the *bla*<sub>CMY-2</sub>-like gene is a part of an *ISEcp1* transposition unit (TU), which is always found in the same location. In some plasmids, the *bla*<sub>CMY-2</sub>-like gene has been duplicated and is associated both with complete and partial copies of *ISEcp1*. Along with *bla*<sub>CMY-2</sub>-like genes, this lineage also carries *sul2*- and class 1 integron-containing segments, the so-called resistance islands ARI-B and ARI-A, respectively [2,4,5]. A recent analysis of backbones of numerous complete A/C<sub>2</sub> plasmid sequences identified two distinct types (types 1 and 2) that diverged a long time ago [2]. The ARI-A island was found only in type 1 A/C<sub>2</sub> plasmids, whereas ARI-B was observed in both types [2]. Overall, the IncA/C<sub>2</sub> type 1 plasmid lineage that also possesses the *bla*<sub>CMY-2</sub>-like region is remarkable since it contains three resistance islands serving as hotspots for further plasmid evolution by in situ acquisition of resistance determinants.

VIM-type metallo-β-lactamase-producing Enterobacteriaceae have been observed in Greece since 2001 [6]. In 2002–2007, a variety of *Klebsiella pneumoniae* sequence types (STs) and other species expressing VIM-1 disseminated into hospitals throughout the country [7]. In most of these isolates, *bla*<sub>VIM-1</sub> was part of In-e541 (*bla*<sub>VIM-1</sub>-*aacA7*-*dfrA1*-*aadA1*)-like integrons [6,8] carried by self-transferable IncN plasmids [6,7], similar to the fully sequenced pNL194 [9]. Later, the In-e541-like elements have also been found on molecules with replicons W, R or FII<sub>k</sub>, multiple replicons R+FII<sub>k</sub> or R+A/C, non-typeable plasmids or in the chromosome [8]. Other *bla*<sub>VIM</sub>-type genes found in Enterobacteriaceae of Greek origin encoded the VIM-1 variants VIM-4, VIM-19, VIM-26, VIM-27 and VIM-39 [8,10–13] as well as the variant VIM-12, being a VIM-1/VIM-2 hybrid [14]. The *bla*<sub>VIM-26</sub>, *bla*<sub>VIM-27</sub> and *bla*<sub>VIM-39</sub> variants were identified in In-e541-like integrons [8,12,13], whilst the *bla*<sub>VIM-12</sub> gene was part of the class 1 integron In-h12 (*aacA7*-*bla*<sub>VIM-12</sub>-*aacA7*) [14]. A recent study showed that *bla*<sub>VIM-19</sub>, which is often linked with *K. pneumoniae* ST383 [8], occurred as the first cassette of In4863 (*bla*<sub>VIM-19</sub>-*aacA7*-*dfrA1*-*ΔaadA1*-*smr2*), being the first In416-like element identified in Greece [8]. Interestingly, in the same study, a second In416-like element, In4873 (*bla*<sub>VIM-1</sub>-*aacA7*-*dfrA1*-*ΔaadA1*-*smr2*), encoding VIM-1, was found in an *Enterobacter cloacae* ST88 isolate [8]. The original In416 element, reported in Italy, Russia and the United Arab Emirates [15–17], comprises *bla*<sub>VIM-4</sub>, *aacA7*, *dfrA1*, *ΔaadA1* and *smr2* gene cassettes [18], sharing the first four cassettes with the In-e541-like variants with the *aadA1* cassette truncated by 82 bp at the 5'-end (*ΔaadA1*). VIM-19 differs by a single amino acid substitution from VIM-4 (Asn215Lys) and by two substitutions from VIM-1 (Asn215Lys and Ser228Arg). In Italy, In416 was associated with transposons Tn1696 and Tn8802 [15]. In416-like integrons are usually present on IncA/C-type plasmids [8,15,17], like the CMY-4-encoding pCC416 from Italy [15].

In the present study, we describe the complete nucleotide sequences of two IncA/C-type plasmids carrying the In4863 integron from *K. pneumoniae* ST383. We have also sequenced the IncA/C-type plasmid carrying In4873 from *E. cloacae* ST88 in order to examine whether the same or different plasmid with In416-like integrons are spreading in different species of Enterobacteriaceae in Greece.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plasmids

Plasmid pKP-Gr642 was from a *K. pneumoniae* ST383 isolate (Kpn-642) recovered in the Czech Republic in 2011 from a patient who had been previously hospitalised in Northern Greece. Plasmids pKP-Gr8143 and pEcl-Gr4873 were from *K. pneumoniae* ST383 (Kpn-8143) and *E. cloacae* ST88 (Ecl-4873) isolates cultured in 2010 and 2009, respectively, from patients in different Athens hospitals and reported previously [8].

### 2.2. Plasmid sequencing

Plasmid DNA was extracted from *Escherichia coli* transconjugants or transformants and was sequenced using a 454 Genome Sequencer Junior System (Roche, Prague, Czech Republic) on a standard DNA fragment library. Reads were assembled using the GS De Novo Assembler software (Roche). Sequence gaps were filled by sequencing of PCR amplicons. The BLAST algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), IS Finder (<http://www-is.biotoul.fr/>) and open reading frame (ORF) Finder (<http://www.bioinformatics.org/sms/>) were used for data analysis.

### 2.3. Nucleotide sequence accession numbers

The nucleotide sequences of the plasmids pKP-Gr642, pKP-Gr8143 and pEcl-Gr4873 were deposited in GenBank under accession nos. KR559888, KR559889 and KR559890, respectively.

## 3. Results

Plasmids carrying In416-like integrons from three Enterobacteriaceae isolates of Greek origin were analysed. Sequencing of pKP-Gr642, pKP-Gr8143 and pEcl-Gr4873 confirmed that all of these plasmids belonged to the IncA/C group, subgroup IncA/C<sub>2</sub>. Furthermore, the backbones of the three plasmids were highly conserved (>99% identity). This finding is in agreement with previous studies documenting that core backbones of IncA/C plasmids are highly syntenic with no genetic rearrangements [4].

### 3.1. pKP-Gr642

The self-transferable plasmid pKP-Gr642 ( $10^{-6}$  transconjugants per donor cell) is a 162 787-bp molecule with a sequence closely related to the type 1 A/C<sub>2</sub> plasmids, like pUMNK88.161 (91% coverage, 99% identity) (Fig. 1) from the USA [5]. The pKP-Gr642 backbone was composed of regions responsible for replication (*repA* gene), conjugative transfer (Tra1 and Tra2 regions) and plasmid maintenance (*higBA* and *parAB* operons, and *xerD* and *kfrA*-like genes). Apart from the backbone, pKP-Gr642 carried the *bla*<sub>CMY-2</sub>-like-containing region, and the ARI-B and ARI-A resistance islands, as previously described in other type 1 A/C<sub>2</sub> MDR plasmids [2,4,5]. In pKP-Gr642, the *bla*<sub>CMY-2</sub>-like-containing region resembled the type II structure, which includes a single copy of the *bla*<sub>CMY-2</sub>-like gene. This region was inserted into the Tra1 region, 99 bp downstream of *traA*, and consisted of an *ISEcp1* TU with *bla*<sub>CMY-4</sub>, *blc*, *sugE* and *ΔecnR* genes of *Citrobacter freundii* origin. The *ISEcp1* TU was flanked by direct repeats of 5 bp (ATTTC; DR1) and differed only in the *bla*<sub>CMY</sub> sequence (*bla*<sub>CMY-4</sub> vs. *bla*<sub>CMY-2</sub>) from the respective regions of other type 1 A/C<sub>2</sub> plasmids. The ARI-B with two copies of IS26, an ISCR2 element, and the *floR*, *tetA(A)*, *strA*, *strB* and *sul2* genes (resistance to phenicol, tetracyclines, aminoglycosides and sulfonamides) occurred upstream of Tra1 and was identical to the respective part of pUMNK88.161 as well as other type 1 A/C<sub>2</sub>



plasmids. Similar to other type 1 A/C<sub>2</sub> plasmids, a 10984-bp segment of the plasmid backbone (nucleotides [nts] 19 083–30 066 in pRMH760 [2]) was probably deleted due to insertion of the ARI-B resistance island.

The ARI-A resistance island has a complex mosaic structure composed of a class 1 integron and multiple transposons included within a class II transposon structure that is flanked by 5-bp direct repeats of the target (TTGTA; DR2). The ARI-A resistance island was inserted upstream of *Tra2*, in exactly the same position as in pUMNK88.161 and all other type 1 A/C<sub>2</sub> MDR plasmids. The islands exhibited identical extremities but harboured significantly different class 1 integrons, insertion sequences, transposons and resistance genes (Fig. 1). The ARI-A of pKP-Gr642 included the *In416*-like integron *In4863*, encoding VIM-19 [8]. The IRI of *In4863* was located between *resI* and *resII* sites of the *Tn1696* module, in precisely the same position as *In4* in *Tn1696*. Similar to *In416* in the plasmid pCC416 from Italy [15], the *ISPa21* element was inserted into the *attC* site of the *smr2* cassette, and *In4863* lacked the 3'CS. The *ISPa21* left inverted repeat (IRL) was deleted probably due to insertion of *Tn8082* carrying an arsenic resistance operon (*ars*) [15], but in contrast to pCC416 the *Tn8082 tnpR* gene lacked 70 bp of its 5' end due to IS26 insertion (IS26-3). A segment including a 142-bp fragment of *Tn21* and a mercury resistance operon (*mer*), previously found in pDU1358 [18], was identified upstream of IS26-3. The IR of the *Tn1696 tnp* module and the IR of the pDU *mer* module, at the boundaries of the plasmid backbone, were disrupted by IS5075 and IS4321, respectively. IS5075 is an isoform of IS4321 (93% homology), shown previously to target the IRs of *Tn21*-like transposons [19].

Notably, two mobile elements, an *ISEc23* element and a novel insertion sequence *ISVpa4* (IS3 family), were inserted into the *IncA/C<sub>2</sub>* backbone of pKP-Gr642. Target site duplications of 8 bp (GAATATTG; DR3) and 3 bp (GTC; DR4) at boundaries of the latter IS elements indicated insertions by transposition. These elements are absent in pUMNK88.161.

### 3.2. pKP-Gr8143

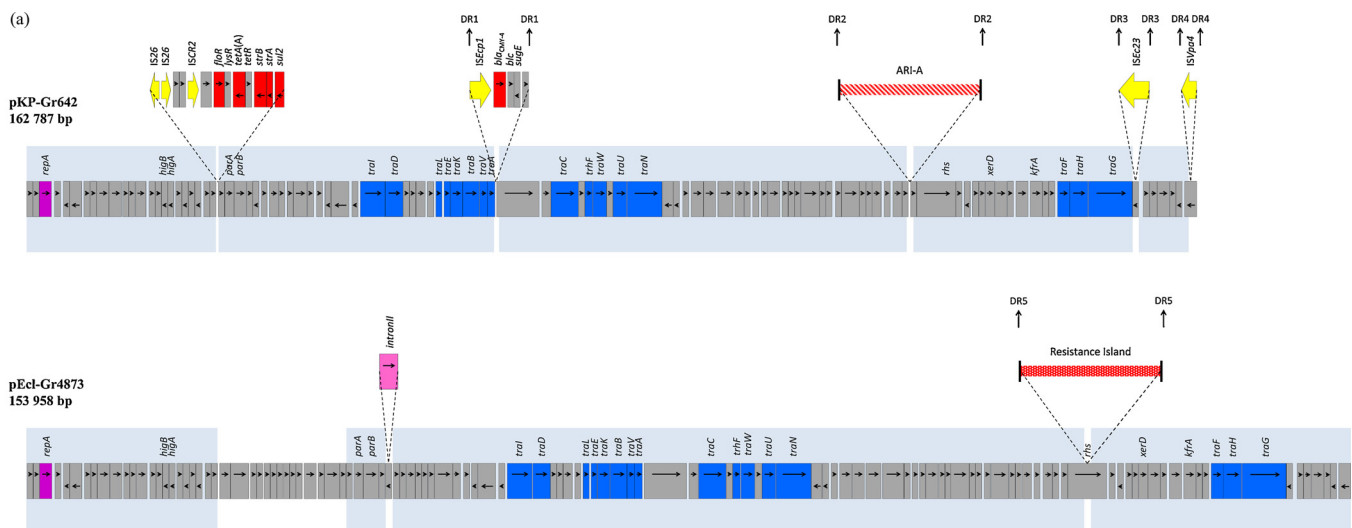
The non-self-transferable plasmid pKP-Gr8143 is 154 395 bp in size and sequence analysis demonstrated that it is a derivative of

pKP-Gr642 (100% coverage, 100% identity). Only two differences between the two plasmids were observed. An 8392-bp segment (nts 125 372–133 763 in pKP-Gr642), including the right boundary of the ARI-A resistance island (pDU *mer* module) and a part of the plasmid backbone (1611 bp) (Fig. 1), was not present in pKP-Gr8143. In addition, the insertion sequence *ISEc23* was inserted into the *traN* gene of pKP-Gr8143, probably explaining the inability of the plasmid to conjugate. Transposition of *ISEc23* into *traN* of pKP-Gr8143 was indicated by the 8-bp target site duplication (AGAGTATG).

### 3.3. pEcl-Gr4873

pEcl-Gr4873 is a self-transferable plasmid ( $7 \times 10^{-4}$  transconjugants per donor cell) carrying the *In416*-like integron *In4873*, coding for VIM-1. Its sequence comprised 153 958 bp sharing extensive similarity with the sequence of type 2 A/C<sub>2</sub> plasmid pR55 (95% coverage, 99% identity) (Fig. 1) from France [20]. The similarity with pKP-Gr642 was lower (84% coverage, 99% identity). As in the above plasmids, the *IncA/C<sub>2</sub>* backbone of pEcl-Gr4873 carried all of the genes implicated in replication, conjugative transfer and maintenance. Of note, an intact group II intron (1389 bp; nts 33 810–35 198) was identified within the pEcl-Gr4873 backbone, between *repA* and the *Tra1* region.

As other type 2 A/C<sub>2</sub> plasmids, pEcl-Gr4873 carried none of the *bla<sub>CMY-2</sub>*-like, ARI-B and ARI-A regions. However, it had another resistance island, a hybrid transposon structure inserted into the *rhsD* gene (2647 bp downstream the *rhsD* start codon). Interestingly, the same insertion position (RI position 4) was previously identified for resistance islands of the type 2 A/C<sub>2</sub> plasmids pKOX-86d, pTC2 and p1643\_10 [2]. The resistance island of pEcl-Gr4873 contained *In4873* [8], located in the *Tn1696* module, in the same configuration previously described in *In4*. Similar to *In4863* in pKP-Gr642, the *ISPa21* was inserted into the *attC* site of *smr2*. However, unlike in pKP-Gr642, an intact 3'CS was found upstream of *ISPa21* in pEcl-Gr4873 (Fig. 1). Furthermore, a *Tn21* fragment consisting of *IS1326*, *tniBΔ1*, *tniA* and the *mer* operon was found next to the 3'CS, 108 bp downstream of *orf5*, as in *In2*-like integrons. The resistance island of pEcl-Gr4873 was flanked by the IR<sub>tnp</sub> and IR<sub>mer</sub> of



**Fig. 1.** (a) Linear maps of the *IncA/C<sub>2</sub>* plasmids pKP-Gr642 and pEcl-Gr4873. (b) Detailed comparison of the ARI-A resistance islands of the *IncA/C<sub>2</sub>* plasmids pKP-Gr642, pKP-Gr8143 and pUMNK88.161 [5] and of the class II transposon structures found in the *IncA/C<sub>2</sub>* plasmids pEcl-Gr4873 and pCC416 [15]. Open reading frames (ORFs) are shown as rectangles (arrows within rectangles indicate the direction of transcription). Intact insertion sequences (IS) elements appear as rectangles. Replicons of the plasmids are indicated as purple rectangles. Resistance genes, IS elements and transposases are shown in red, yellow and green, respectively. Orange rectangles indicate integrases; the group II intron is shown in pink. The remaining genes, including plasmid scaffold regions, are indicated as grey rectangles. The blue shades correspond to highly similar sequences among all plasmids, whilst the yellow shades show highly similar sequences found only in type 1 A/C<sub>2</sub> plasmids. Highly similar sequences, found only in plasmids carrying *In416*-like integrons, are indicated by pink shades. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

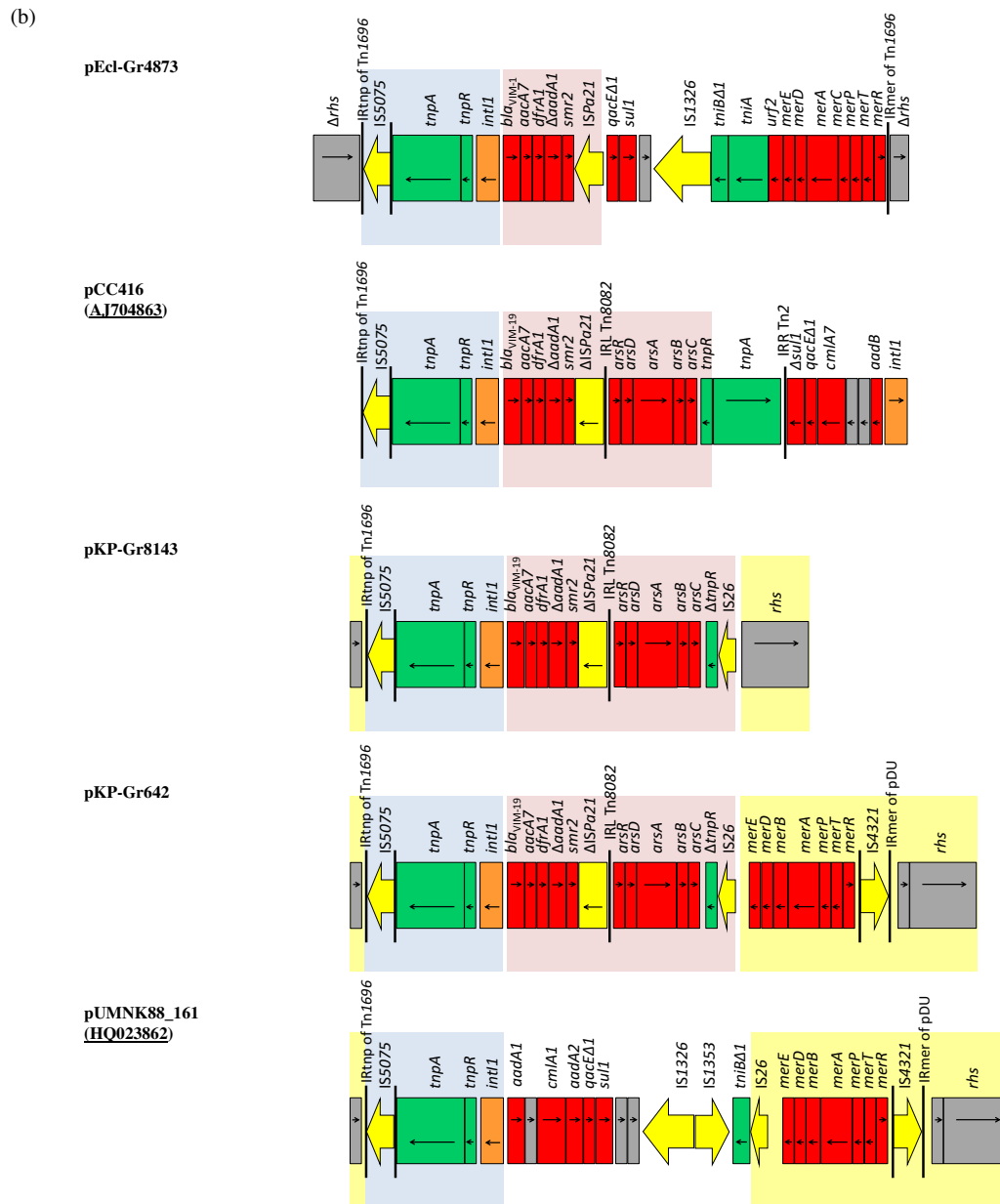


Fig. 1. (Continued))

Tn1696, with IRtnp disrupted by IS5075, whilst IRmer being intact. Direct repeats of 5 bp (AATCT; DR5) were found at the boundaries of Tn1696, suggesting its transposition into the pEcl-Gr4873 backbone.

#### 4. Discussion

This is the first report on complete nucleotide sequences of IncA/C<sub>2</sub> plasmids carrying In416-like integrons, observed in Italy, the United Arab Emirates and Greece [8,15,17]. Of note, plasmid analysis did not justify the hypothesis that the same type of IncA/C<sub>2</sub> plasmids carrying In416-like elements circulate among different species. However, sequencing revealed that pKP-Gr642 and pKP-Gr8143 of *K. pneumoniae* ST383, encoding VIM-19 and CMY-4 β-lactamases, are very similar to each other and probably are close derivatives of the previously described and partially sequenced pCC416 from Italy [15]. In addition, the complete sequence of pKP-Gr642 suggested that a common progenitor of the pCC416-like

plasmids might be a type 1 IncA/C<sub>2</sub> plasmid, having the bla<sub>CMY-2</sub>-like, ARI-B and ARI-A resistance islands, like pUMNK88.161 [5]. At a certain step, a pUMNK88.161-like molecule has evolved via in situ gain and/or loss of transposons, insertion sequences and resistance genes, including a bla<sub>VIM</sub>-like gene cassette. The pCC416-like plasmids evolved further through rearrangements facilitated by mobile elements such as IS26.

On the other hand, pEcl-Gr4873, encoding VIM-1 only, carried none of the bla<sub>CMY-2</sub>-like, ARI-B and ARI-A regions. In addition, the plasmid backbone of pEcl-Gr4873 showed extensive similarity to type 2 IncA/C<sub>2</sub> MDR plasmids [2], like pR55 [20]. Considering also the different insertion sites of the resistance island in pEcl-Gr4873 and of the ARI-A in pCC416-like molecules, it is clear that the In416-like-carrying regions appeared in the two distinct IncA/C<sub>2</sub> lineages by two different acquisition events. Of note, the presence of the intact 3'CS upstream of ISPa21 suggested that In4873 might be a forerunner of In416-like integrons found in pCC416-like plasmids.



These findings, in addition to recent reports describing the epidemic emergence of the *bla*<sub>NDM-1</sub> carbapenemase gene in Enterobacteriaceae associated with IncA/C<sub>2</sub> plasmids [2,3], underscore the rapid evolution of these molecules. Being of broad host range and serving as reservoirs of various resistance genes, they will likely create challenges to human and animal health by limiting therapeutic options in cases of infection with a carrier organism.

### Acknowledgments

The authors are very grateful to H. Giamarellou (Attikon General Hospital, Athens, Greece) and G.L. Petrikos (Laikon General Hospital, University of Athens, Athens, Greece) for their participation in the EU project MOSAR, during which the Kpn-8143 and Ecl-4873 isolates were identified [8]. The authors thank A. Baraniak, J. Fiett and M. Herda (National Medicines Institute, Warsaw, Poland) for their assistance. The authors also thank the curator team of the Institute Pasteur (Paris, France) for curating the MLST data of *K. pneumoniae* and making them publicly available.

**Funding:** This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic [grant 15-28663A], the Czech Ministry of Education [grant LQ1601], the Czech Science Foundation [grant 15-14683Y/P502] and the Charles University Research Fund [grant P36].

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** Not required.

### References

- [1] Carattoli A, Miriagou V, Bertini A, Loli A, Colinson C, Villa L, et al. Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer  $\beta$ -lactams. *Emerg Infect Dis* 2007;12:1145–8.
- [2] Harmer CJ, Hall RM. The A to Z of A/C plasmids. *Plasmid* 2015;80:63–82.
- [3] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010;10:597–602.
- [4] Fricke WF, Welch EJ, McDermott PF, Mammel MK, LeClerc JE, White DG, et al. Comparative genomics of the IncA/C multidrug resistance plasmid family. *J Bacteriol* 2009;191:4750–7.
- [5] Fernández-Alarcón C, Singer RS, Johnson TJ. Comparative genomics of multidrug resistance-encoding IncA/C plasmids from commensal and pathogenic *Escherichia coli* from multiple animal sources. *PLoS ONE* 2011;6:e23415.
- [6] Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, Tzouveleki LS. *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo- $\beta$ -lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:395–7.
- [7] Psychogiou M, Tassios PT, Avlami A, Stefanou I, Kosmidis C, Platsouka E, et al. Ongoing epidemic of *bla*<sub>VIM-1</sub>-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:59–63.
- [8] Papagiannitsis CC, Izdebski R, Baraniak A, Fiett J, Herda M, Hrabák J, et al. Survey of metallo- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae colonizing patients in European ICUs and rehabilitation units, 2008–11. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:1981–8.
- [9] Miriagou V, Papagiannitsis CC, Kotsakis SD, Loli A, Tzelepi E, Legakis NJ, et al. Sequence of pNL194, a 79.3-kilobase IncN plasmid carrying the *bla*<sub>VIM-1</sub> metallo- $\beta$ -lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4497–502.
- [10] Ikonomidis A, Spanakis N, Poulou A, Pournaras S, Markou F, Tsakris A. Emergence of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* carrying VIM-4 metallo- $\beta$ -lactamase and SHV-2a extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a conjugative plasmid. *Microb Drug Resist* 2007;13:221–6.
- [11] Pournaras S, Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Kristo I, Tsakris A. Detection of the new metallo- $\beta$ -lactamase VIM-19 along with KPC-2, CMY-2 and CTX-M-15 in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1604–7.
- [12] Samuelsen Ø, Toleman MA, Hasseltvedt V, Fuursted K, Leegaard TM, Walsh TR, et al. Molecular characterization of VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Scandinavia reveals genetic relatedness with international clonal complexes encoding transferable multidrug resistance. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1811–6.
- [13] Papagiannitsis CC, Kotsakis SD, Petinaki E, Vatopoulos AC, Tzelepi E, Miriagou V, et al. Characterization of metallo- $\beta$ -lactamase VIM-27, an A57S mutant of VIM-1 associated with *Klebsiella pneumoniae* ST147. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:3570–2.
- [14] Pournaras S, Ikonomidis A, Tzouveleki LS, Tokatlidou D, Spanakis N, Maniatis AN, et al. VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo- $\beta$ -lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/VIM-2 hybrid. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:5153–6.
- [15] Colinson C, Miriagou V, Carattoli A, Luzzaro F, Rossolini GM. Characterization of the IncA/C plasmid pCC416 encoding VIM-4 and CMY-4  $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:258–62.
- [16] Shevchenko OV, Mudrak DY, Skleenova EY, Kozyreva VK, Ilina EN, Ikryannikova LN, et al. First detection of VIM-4 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Russia. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:E214–7.
- [17] Sonnevend Á, Ghazawi A, Yahfoufi N, Al-Baloushi A, Hashmey R, Mathew M, et al. VIM-4 carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* in the United Arab Emirates. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:E494–6.
- [18] Griffin HG, Foster TJ, Silver S, Misra TK. Cloning and sequence of the mercuric- and organomercurial-resistance determinants of plasmid pDU1358. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:3112–6.
- [19] Partridge SR, Hall RM. The IS1111 family members IS4321 and IS5075 have subterminal inverted repeats of Tn21 family transposons. *J Bacteriol* 2003;185:6371–84.
- [20] Doublet B, Boyd D, Douard G, Praud K, Cloeckaert A, Mulvey MR. Complete nucleotide sequence of the multidrug resistance IncA/C plasmid pR55 from *Klebsiella pneumoniae* isolated in 1969. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2354–60.



## Příloha 33

DOBIASOVA, H., KUTILOVA, I., PIACKOVA, V., VESELY, T., CIZEK, A., DOLEJSKA, M., 2014, Ornamental fish as a source of plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic resistance plasmids: *Veterinary Microbiology*, v. 171, p. 413-421.

### Souhrn

---

Izoláty *Aeromonas* spp. z okrasných ryb importovaných do ČR ze zahraničí a z koi kaprů chovaných v ČR byly vyšetřeny na přítomnost plazmidově determinované rezistence k chinolonům. Izoláty s prokázaným výskytem PMQR genu byly podrobeny kompletní analýze fenotypu i genotypu a byl testován horizontální přenos PMQR genů a jejich vazba na MGE. Geny PMQR byly detekovány u obou skupin izolátů, přičemž rozdíly v prevalenci nebyly statisticky významné. V porovnání s izoláty z koi kaprů vykazovaly izoláty z okrasných ryb z dovozu vyšší hodnoty MIC k chinolonům, byly multirezistentní a spektrum genů rezistence a integronů bylo rovněž vyšší. Studie upozorňuje na rizika spojená s chovem a dovozem okrasných ryb v šíření multirezistentních bakterií do prostředí a ke člověku.





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

# Veterinary Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)

## Ornamental fish as a source of plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic resistance plasmids



Hana Dobiasova<sup>a,b</sup>, Iva Kutilova<sup>a</sup>, Veronika Piackova<sup>c</sup>, Tomas Vesely<sup>d</sup>,  
Alois Cizek<sup>b,e</sup>, Monika Dolejska<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

<sup>b</sup> CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

<sup>c</sup> South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Zatisi 728/II, 389 25 Vodnany, Czech Republic

<sup>d</sup> Veterinary Research Institute, Hudcova 296/70, 621 00 Brno, Czech Republic

<sup>e</sup> Department of Infectious Diseases and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Aeromonas*  
Ornamental fish  
Quinolone resistance  
Plasmids

### ABSTRACT

Growing ornamental fish industry is associated with public health concerns including extensive antibiotic use accompanied by increasing antibiotic resistance. The aim of this study was to analyze *Aeromonas* isolates from imported tropical ornamental fish and coldwater koi carps bred in the Czech Republic to assess the potential risk of ornamental fish as a source of plasmid-mediated quinolone resistance genes (PMQR) and antibiotic resistance plasmids. A collection of *Aeromonas* spp. with reduced susceptibility to ciprofloxacin (MIC  $\geq$  0.05 mg/L) was selected for the detection of PMQR genes. Isolates harbouring PMQR genes were further analyzed for the additional antibiotic resistance, integron content, clonality, biofilm production and transferability of PMQR genes by conjugation and transformation.

Comparative analysis of plasmids carrying PMQR genes was performed. Fifteen (19%,  $n = 80$ ) isolates from koi carps and 18 (24%,  $n = 76$ ) isolates from imported ornamental fish were positive for *qnrS2*, *aac(6′)-Ib-cr* or *qnrB17* genes. PMQR-positive isolates from imported ornamental fish showed higher MIC levels to quinolones, multiresistance and diverse content of antibiotic resistance genes and integrons compared to the isolates from the carps. Related IncU plasmids harbouring *qnrS2* and *aac(6′)-Ib-cr* genes were found in *Aeromonas* spp. from imported ornamental fish and koi carps from various geographical areas. Ornamental fish may represent a potential source of multiresistant bacteria and mobile genetic elements for the environment and for humans.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author at: Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic. Tel.: +420 541 562 643; fax: +420 541 562 631.

E-mail address: [m.dolejska@centrum.cz](mailto:m.dolejska@centrum.cz) (M. Dolejska).

### 1. Introduction

Intensive fish farming has resulted in increasing problems of bacterial diseases leading to the subsequent heavy use of antibiotics (Cabello et al., 2013). Over 1 billion ornamental fish are traded globally each year (Whittington and Chong, 2007). Several public health concerns have

been associated with the ornamental fish industry such as the transmission of zoonotic pathogens to humans and terrestrial animals, antimicrobial use practices and antibiotic resistance (Lupo et al., 2012; Weir et al., 2012). The ornamental fish producers tend to administer antibiotics for a prophylactic or preventive treatment in order to decrease the bacterial disease outbreaks while fish are recovering from harvesting and handling and to increase their survival during shipment. Excessive or incorrect use of a prophylactic treatment can increase selection and facilitate the spread of antibiotic-resistant bacteria (Weir et al., 2012). Specific antibiotics as nitrofurans, quinolones and oxytetracycline are commonly used in the ornamental fish trade.

Quinolones are broad-spectrum antimicrobial agents widely used in both human and veterinary medicine and they are among the most widely used antibiotics in the aquacultures (Smith, 2008). Their extensive use has been associated with worldwide increasing quinolone resistance. Resistance to quinolones is mediated by specific chromosomal mutations or by plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes that play an important role in dissemination of quinolone resistance via horizontal gene transfer (HGT; Strahilevitz et al., 2009). PMQR determinants include Qnr proteins, *aac(6′)-Ib-cr* and efflux pumps and confer high level of resistance to nalidixic acid and low level fluoroquinolone resistance in bacteria according to CLSI breakpoints. However, the presence of PMQR can facilitate the emergence of high level fluoroquinolone resistance via mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV genes *gyrA* and *parC* (Cattoir et al., 2008; Verner-Jeffreys et al., 2009; Han et al., 2012a,b).

Aeromonads are suitable indicator bacteria for studying the incidence and development of antibiotic resistance in aquacultures (Naviner et al., 2011). These bacteria are interconnected within the water ecosystem, colonize fish and can cause various infections. Antibiotic resistance in *Aeromonas* spp. from imported ornamental fish is of high concern for public health (Verner-Jeffreys et al., 2009; Sreedharan et al., 2012). *Aeromonas* spp. have been proven to cause human infections (Parker and Shaw, 2011).

The greatest potential public health risk linked with extensive antimicrobial use in aquaculture is the development of reservoirs of antibiotic resistance genes in aquatic ecosystems from where such genes can be spread by HGT to other bacteria including human pathogens (Lupo et al., 2012). There is limited information on mobile genetic elements transferring quinolone-resistance genes in *Aeromonas* from ornamental fish (Verner-Jeffreys et al., 2009; Han et al., 2012a,b). The aim of this study was to analyze *Aeromonas* isolates from imported tropical ornamental fish and coldwater koi carps bred in the Czech Republic to assess the potential risk of ornamental fish as a source of plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic resistance plasmids.

## 2. Material and methods

### 2.1. Bacterial isolates

A collection of 156 *Aeromonas* spp. isolates originating from tropical freshwater ornamental fish (76 isolates) and

coldwater ornamental (koi) carps (80 isolates) was analyzed in this study. Koi carp isolates were gained from gills and skin swabs of euthanized healthy fish on 7 farms in 2005 and 2006 (Cizek et al., 2010). Tropical freshwater ornamental fish were sampled in a wholesale distributor (Hodonin, Czech Republic) during their health inspection after they arrived to the Czech Republic from Vietnam, Thailand, China, Slovakia, Brazil and Peru between 2005 and 2007. Fish were kept and transported in their original carriage water in sealed bags in polystyrene boxes. The samples were obtained from skin, gills and body cavity swabs of diseased fish. All samples were cultivated on Columbia agar (CM331; Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) supplemented with 5% sheep blood and suspect *Aeromonas* cultures were identified as described elsewhere (Cizek et al., 2010). Susceptibility to ciprofloxacin (0.015–128 mg/L) of all *Aeromonas* isolates was determined by agar dilution method in accordance with Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2006, 2008). Quality control was done using reference strains *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* ATCC 33658.

### 2.2. Detection of PMQR genes and characterization of PMQR-positive isolates

Isolates with minimum inhibitory concentration (MIC) to ciprofloxacin  $\geq 0.05$  mg/L were selected for the detection of PMQR genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6′)-Ib-cr*, *qepA*, *oqxAB*) using PCR followed by sequencing (Literak et al., 2012). Isolates positive for PMQR genes were further characterized. Susceptibility to 8 antibiotics (chloramphenicol, gentamicin, nitrofurantoin, florfenicol, oxytetracycline, sulfonamides cp., sulfamethoxazole/trimethoprim, trimethoprim) was determined by disc diffusion method (CLSI, 2006). The selection of the tested antibiotics is based on their approved common use (e.g. tetracycline) or off-label use (e.g. chloramphenicol) in food or ornamental fish farming. The isolates were tested for tetracycline resistance genes *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, chloramphenicol resistance genes *catA1*, *cmlA* and *floR*, sulfonamide resistance genes *sul1*, *sul2*, *sul3*, beta-lactamase gene *bla<sub>OXA-1</sub>*, the class 1 and class 2 integrase genes *intI1* and *intI2*, respectively, the variable region of class 1 integrons and gene cassettes inside the integron structure (Wilkerson et al., 2004; Dolejska et al., 2007). Clonality of the isolates was examined by *XbaI* digestion and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Restriction profiles were analyzed using BioNumerics fingerprinting software (Applied Maths, Belgium). Cluster analysis of the dice similarity indices was done to generate a dendrogram describing the relationships among PFGE profiles. Isolates were considered to be related and to belong to the same PFGE cluster if their Dice similarity indices were  $\geq 85\%$ . Letters were used to discriminate PFGE patterns assigned to the same cluster. Biofilm production was tested using crystal violet biofilm assay (Genevaux et al., 1996) and all tested isolates were assigned to one of the four categories based on their adherence capabilities (non-adherent, weakly, moderately and strongly adherent strains) according to Stepanović et al. (2000). MICs to nalidixic acid (NA), oxolinic acid (OA), flumequine (UB) and enrofloxacin (ENR) were determined by agar dilution method (CLSI, 2006, 2008).

### 2.3. Transferability of PMQR genes

Conjugative transfer of plasmids carrying PMQR genes was tested. Plate-mating experiments were performed using plasmid-free, rifampicin- and sodium azide-resistant *E. coli* and *Aeromonas* sp. recipient strains at 28 °C and 37 °C. Plasmid DNA from *Aeromonas* strains was isolated by the alkaline extraction procedure and introduced to competent *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen, USA) by chemical transformation followed by selection of transformants on Luria Bertani agar (Difco, USA) supplemented with ciprofloxacin (0.05 mg/L). The presence of the relevant PMQR gene in transformants was confirmed by PCR. Co-transfer of other antibiotic resistance genes and integrons was tested. The sizes of plasmids carrying PMQR genes in donors and transformants were determined by S1 nuclease-PFGE.

### 2.4. Analysis of plasmids harbouring PMQR genes

Only PMQR-positive transformants carrying a single plasmid were further analyzed. Plasmids were replicon-typed (Carattoli et al., 2005; Cattoir et al., 2008). Plasmid DNA from transformants was transferred to a positively charged nylon membrane (Biodyne<sup>®</sup> B, Pall Corporation, USA) by Southern blot and hybridized with *qnrS2*, *aac(6')-Ib-cr* and *IncU rep* gene probes labelled with DIG-11-dUTP by PCR using PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Germany). Detection of hybridizations was performed using the DIG Wash and Block Buffer Set (Roche Diagnostics). All plasmids were analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) using the *HincII* (Takara, Otsu, Japan) or *AluI* (Takara) restriction enzymes. Digested fragments were separated by electrophoresis in a 1% agarose gel for 14 h at 67 V/cm. Letters were used to discriminate RFLP patterns. Restricted plasmids belonging to *IncU* were transferred by Southern blot and hybridized with *qnrS2*, *aac(6')-Ib-cr* and *IncU rep* gene probes. PCR screening and sequencing were used to determine the surrounding region of the *qnrS2* gene using primers targeting *qnrS* (*qnrS* FW 5'-GCAAGTTCATTGAACAGGGT-3'; *qnrS* RV 5'-TCTAAACCGTC-GAGTTCGGCG-3') and a putative zinc-metalloprotease gene *mpR* (*mpR* FW 5'-CTTACGACGAACTACAGCGG-3'; *mpR* RV 5'-CATCCAAGTATCCGATAGTC-3'). *IncU* plasmid P2G1 (GenBank accession no. HE616910) from *Aeromonas* spp. harbouring *qnrS2* was used as a reference sequence to design the primers targeting the *mpR* gene.

### 2.5. Data analysis

The results obtained were statistically evaluated by chi-square test using MS Excel software with the Analyze-it module. Differences with  $p \leq 0.05$  were considered as significant.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Antimicrobials in ornamental fish farming

The use of antibiotics in aquacultures in developed countries has been restricted to avoid potential selection

of human pathogens resistant to antimicrobials effective in clinical practices (Cabello, 2006). In the Czech Republic oxytetracycline and flumequine are permitted for therapeutic usage in aquacultures. However, the situation is more problematic in countries where such regulations are less stringent or even missing and various antimicrobial substances are used in aquacultures in uncontrolled manner. Some of these countries include important world producers of ornamental fish. The Czech Republic imports live ornamental fish from sources as diverse as Vietnam, Indonesia, Malaysia, China, Singapore, Thailand, Nigeria and Peru. Given the stress during air transport, antimicrobials and chemical additives are routinely added to the transport water to prevent the growth of potential pathogens (Cole et al., 1999). Considering the widespread use of quinolones in aquacultures and their importance for human health, *Aeromonas* spp. harbouring plasmid-mediated quinolone resistance originated from imported ornamental fish and koi carps bred in the Czech Republic were the focus of this study.

### 3.2. *Aeromonas* from ornamental fish shows high prevalence of *qnrS2* gene

Thirty-six (45%,  $n = 80$ ) *Aeromonas* isolates from koi carps and 76 ( $n = 76$ , 100%) from imported ornamental fish showed decreased susceptibility to ciprofloxacin ( $MIC \geq 0.05$  mg/L). These isolates were selected for detection of PMQR genes using PCR followed by sequencing. Fifteen (19%,  $n = 80$ ) isolates from koi carps and 18 (24%,  $n = 76$ ) isolates from imported ornamental fish were positive for at least one PMQR gene. The gene *qnrS2* was the most prevalent followed by *aac(6')-Ib-cr* and *qnrB17* (Table 1). Twelve isolates contained two or three PMQR genes and the combination of *qnrS2* + *aac(6')-Ib-cr* was frequently observed. No significant difference in prevalence of PMQR genes between carps and imported ornamental fish was observed ( $p \geq 0.05$ ). All PMQR-positive isolates were identified as species complexes based on phenotypic testing criteria (Cizek et al., 2010): *Aeromonas hydrophila* (17 isolates), *Aeromonas sobria* (15) and one isolate belonged to *A. hydrophila/sobria*. Clonal relatedness of all 33 *Aeromonas* isolates carrying PMQR genes was tested by *XbaI*-PFGE. The isolates were divided into 5 clusters (A–E) based on their restriction profiles. Clonally related isolates from tropical ornamental fish and koi carps were found (Table 1).

The gene *qnrS2* in quinolone-resistant *Aeromonas* isolates from ornamental fish has been identified previously (Han et al., 2012a,b; Verner-Jeffreys et al., 2009). High (37%) prevalence of *qnrS2* gene was reported in *Aeromonas* spp. from imported cold- and warmwater ornamental fish and their carriage water in UK (Verner-Jeffreys et al., 2009). *Aeromonas* harbouring *qnrS2* is isolated from diverse aquatic environment (Cattoir et al., 2008; Picão et al., 2008) but also from human infections (Arias et al., 2010) indicating the wide distribution of this gene in population of aeromonads in different sources and geographical areas.



**Table 1**  
*Aeromonas* isolates from imported tropical ornamental fish and koi carps harbouring PMQR genes.

	Isolate	Species complex <sup>a</sup>	Origin <sup>b</sup>	PFGE <sup>c</sup>	PMQR genes	MIC (μg/mL) <sup>d</sup>					Antibiotic resistance phenotype <sup>e</sup>	Additional antibiotic resistance genes	Integron size (kb) <sup>f</sup>	Gene cassettes	TF <sup>g</sup>
						NA	UB	OA	ENR	CIP					
Tropical fish	N42	<i>A. sobria</i>	Vietnam	NT	<i>qnrS2, aac(6′)-Ib-cr</i>	512	128	64	64	>128	C, CN, OT, S3, SXT, T	<i>sul1, tet(B)</i>	–	<i>dfrA12-aadA2</i>	+
	CH10	<i>A. sobria</i>	Vietnam	D <sub>2</sub>	<i>qnrS2, aac(6′)-Ib-cr</i>	512	128	64	>64	>128	C, FFC, OT, S3, SXT, T	<i>sul1, sul2, tet(B), floR</i>	–	<i>dfrA12-aadA2</i>	+
	CH11	<i>A. sobria</i>	Vietnam	D <sub>1</sub>	<i>qnrS2, aac(6′)-Ib-cr</i>	512	128	128	>64	>128	C, FFC, OT, S3, SXT, T	<i>sul1, sul2, tet(B), floR</i>	–	<i>dfrA12-aadA2</i>	+
	CH12	<i>A. sobria</i>	Thailand	D <sub>1</sub>	<i>qnrS2, aac(6′)-Ib-cr</i>	512	128	128	>64	>128	C, FFC, OT, S3, SXT, T	<i>sul1, sul2, tet(B), floR</i>	–	<i>dfrA12-aadA2</i>	+
	CH13	<i>A. sobria</i>	Thailand	NT	<i>qnrS2, aac(6′)-Ib-cr</i>	256	128	32	64	128	C, FFC, OT, S3, SXT, T	<i>sul1, tet(B), floR, bla<sub>OXA-1</sub></i>	–	<i>dfrA12-aadA2</i>	+
	CH20	<i>A. sobria</i>	Vietnam	NT	<i>qnrS2, qnrB17, aac(6′)-Ib-cr</i>	256	128	32	64	128	C, FFC, OT, S3, SXT, T	<i>sul1, sul2, tet(B), floR</i>	–	<i>dfrA12-aadA2</i>	–
	CH21	<i>A. sobria</i>	Thailand	NT	<i>qnrS2</i>	512	128	32	32	64	C, CN, OT, S3, SXT, T	<i>sul1, tet(B)</i>	0.75; –	<i>dfrA22; dfrA12-aadA2</i>	+
	CH26/1	<i>A. hydrophila</i>	Thailand	A <sub>1</sub>	<i>qnrS2</i>	512	128	32	32	64	C, CN, FFC, OT, S3, SXT, T	<i>sul1, tet(D), floR</i>	2	<i>dfrA12-aadA2</i>	+
	CH31	<i>A. hydrophila</i>	Vietnam	A <sub>1</sub>	<i>qnrS2</i>	512	128	32	32	64	C, CN, FFC, OT, S3, SXT, T	<i>sul1, tet(D), floR</i>	2	<i>dfrA12-aadA2</i>	+
	CH36	<i>A. hydrophila/sobria</i>	Vietnam	A <sub>2</sub>	<i>qnrS2</i>	>512	>256	>128	>64	>128	C, FFC, S3, SXT, T	<i>sul1, tet(D), floR</i>	2.4	<i>arr3-aacA4-dfrA1-orf</i>	+
	CH38	<i>A. hydrophila</i>	Vietnam	A <sub>3</sub>	<i>qnrS2</i>	512	256	>128	>64	>128	OT	<i>tet(E)</i>	–	–	+
	CH39	<i>A. hydrophila</i>	Vietnam	A <sub>3</sub>	<i>qnrS2</i>	512	256	128	>64	>128	C, FFC, OT, S3, SXT, T	<i>sul1</i>	–	–	+
	CH40	<i>A. hydrophila</i>	Vietnam	B <sub>2</sub>	<i>qnrS2</i>	>512	256	>128	>64	>128	C, FFC, OT, S3, SXT, T	<i>sul1, tet(B), floR</i>	2; 2.4	<i>dfrA12-aadA2; arr3-aacA4-dfrA1-orf</i>	–
	CH44	<i>A. hydrophila</i>	Vietnam	B <sub>1</sub>	<i>qnrS2</i>	>512	256	>128	>64	>128	C, FFC, OT, S3, SXT, T	<i>sul1, tet(B), floR</i>	2; 2.4	<i>dfrA12-aadA2; arr3-aacA4-dfrA1-orf</i>	–
	CH45	<i>A. hydrophila</i>	Vietnam	B <sub>1</sub>	<i>qnrS2</i>	>512	256	>128	>64	>128	C, FFC, OT, S3, SXT, T	<i>sul1, tet(B), floR</i>	2; 2.4	<i>dfrA12-aadA2; arr3-aacA4-dfrA1-orf</i>	–
	CH47	<i>A. hydrophila</i>	Slovakia	B <sub>1</sub>	<i>qnrS2</i>	>512	256	>128	>64	>128	OT, S3, SXT, T	<i>sul1, tet(B), tet(E), floR</i>	–; 1.3	<i>dfrA12-aadA2; arr3-dfrA27</i>	–
	CH48	<i>A. hydrophila</i>	Slovakia	D <sub>3</sub>	<i>qnrS2</i>	256	64	32	16	32	OT, S3, SXT, T	<i>sul1, sul2, tet(B), floR</i>	2	<i>orf-aadA1</i>	–
	CH59	<i>A. sobria</i>	Singapore	NT	<i>qnrS2, aac(6′)-Ib-cr</i>	256	128	64	64	>128	C, FFC, OT, S3, SXT, T	<i>sul1, tet(B), bla<sub>OXA-1</sub></i>	–	<i>dfrA12-aadA2</i>	–

Koi carps	4	<i>A. hydrophila</i>	A (2005)	A <sub>5</sub>	<i>qnrS2, aac(6')-Ib-cr</i>	128	32	16	4	8	-	-	-	-	+
	6	<i>A. hydrophila</i>	A (2005)	A <sub>4</sub>	<i>qnrS2, aac(6')-Ib-cr</i>	128	64	16	4	8	-	-	-	-	+
	7	<i>A. hydrophila</i>	A (2005)	A <sub>4</sub>	<i>qnrS2, aac(6')-Ib-cr</i>	128	32	16	4	8	-	-	-	-	+
	10	<i>A. hydrophila</i>	A (2005)	A <sub>5</sub>	<i>qnrS2, aac(6')-Ib-cr</i>	128	32	16	4	4	-	-	-	-	+
	93	<i>A. sobria</i>	C (2005)	NT	<i>qnrS2</i>	128	4	4	1	0.25	OT	<i>tet(B)</i>	-	-	+
	224	<i>A. sobria</i>	A (2006)	NT	<i>qnrS2</i>	128	32	8	4	4	S3	<i>sul1, tet(A)</i>	1	<i>qacD2-orf</i>	+
	225	<i>A. hydrophila</i>	A (2006)	NT	<i>qnrS2</i>	256	32	8	16	8	-	-	-	-	+
	227	<i>A. hydrophila</i>	A (2006)	E	<i>qnrS2</i>	512	64	16	16	8	C, OT	<i>tet(E)</i>	-	-	+
	228	<i>A. sobria</i>	A (2006)	C <sub>3</sub>	<i>qnrS2</i>	512	32	8	4	4	OT	<i>tet(E)</i>	-	-	+
	231	<i>A. sobria</i>	A (2006)	C <sub>2</sub>	<i>qnrS2</i>	128	32	8	2	4	OT, S3, SXT	<i>tet(E)</i>	-	-	+
	232	<i>A. sobria</i>	A (2006)	C <sub>1</sub>	<i>qnrS2</i>	512	64	16	16	4	OT, S3, SXT, T	<i>sul1, tet(D)</i>	2	<i>dfrA12-aadA2</i>	+
	233	<i>A. sobria</i>	A (2006)	C <sub>1</sub>	<i>qnrS2</i>	512	64	16	16	4	OT, S3, SXT, T	<i>sul1, tet(D)</i>	2	<i>dfrA12-aadA2</i>	+
	236	<i>A. sobria</i>	A (2006)	C <sub>4</sub>	<i>qnrS2</i>	512	32	64	16	8	C, OT, S3, SXT, T	<i>sul1, tet(E)</i>	1.6	<i>dfrB1-aadA1</i>	+
	240	<i>A. hydrophila</i>	B (2006)	C <sub>5</sub>	<i>qnrS2</i>	512	32	8	4	4	OT	-	-	-	+
	250	<i>A. hydrophila</i>	B (2006)	A <sub>6</sub>	<i>qnrS2, aac(6')-Ib-cr</i>	256	32	16	1	1	-	-	-	-	+

<sup>a</sup> Identification as species complexes based on phenotypic testing criteria (Cizek et al., 2010).

<sup>b</sup> *Aeromonas* isolates originated from 7 koi carp farms in the Czech Republic designed as A-G. Isolates positive for PMQR genes were found only in three farms A, B and C. The year of the isolation is indicated in brackets.

<sup>c</sup> Isolates were considered to be related and to belong to the same PFGE cluster designed by letter A-E if their Dice similarity indices were  $\geq 85\%$ . Isolates that belonged to the same cluster but showed one or more band differences in PFGE pattern were distinguished by numbers (e.g. A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, etc.). NT, isolates non-typeable by *Xba*I-PFGE.

<sup>d</sup> MIC, minimal inhibitory concentration; NA, nalidixic acid; UB, flumequine; OA, oxolinic acid; ENR, enrofloxacin; CIP, ciprofloxacin.

<sup>e</sup> C, chloramphenicol; CN, gentamicin; FFC, florfenicol; OT, oxytetracycline; S3, sulfonamides cp.; SXT, sulfamethoxazole/trimethoprim; T, trimethoprim.

<sup>f</sup> Size of variable region amplified using primers 5'CS and 3'CS (Dolejska et al., 2007) targeting 5'- and 3'-conservative region of class 1 integrons is indicated in kb. Some class 1 integrons showed negative results of PCR amplification but PCR mapping using primers targeting 5'-conservative region and variable region (gene cassettes *dfrA12* and *aadA2*) was positive. -, conservative region of class 1 integron was not detected by PCR using 5'CS and 3'CS primers.

<sup>g</sup> TF, transfer of PMQR genes to *E. coli* recipients using chemical transformation; +, positive; -, negative.

### 3.3. Multiresistance and diverse integrons in *Aeromonas* from imported ornamental fish

Isolates showed variable MIC levels to ciprofloxacin (0.25 – >128 mg/L); those from tropical ornamental fish showed higher MIC levels (64 – >128 mg/L) than isolates from koi carps (0.25–8 mg/L). These MIC levels exceeding CLSI breakpoints might indicate the presence of chromosomal mutations in topoisomerase genes (Strahilevitz et al., 2009). PMQR-positive *Aeromonas* spp. from imported ornamental fish showed higher MIC levels to all tested quinolones, multiresistance phenotypes, more diverse set of antibiotic resistance genes and integrons in contrast to koi carp isolates (Table 1). The results may indicate that various antibiotics in more extensive manner are used in imported ornamental fish than koi carps that were bred in the Czech Republic and therefore subjected to antibiotic use restriction applied in this country. Additional resistance to chloramphenicol, florfenicol, oxytetracycline, sulfamethoxazole and trimethoprim was common in isolates from imported ornamental fish which are antimicrobials commonly used in fish farming, especially in developing countries. Relevant genes conferring resistance to these antimicrobials were detected (Table 1).

Most (89%) isolates from imported tropical ornamental fish contained a variable set of class 1 integrons with antibiotic resistance gene cassettes and five of them harboured two different types of class 1 integrons (Table 1). Similarly, Verner-Jeffreys et al. (2009) have demonstrated that 50% *Aeromonas* isolates from imported ornamental fish in UK possessed class 1 integrons. In our study, all integron-positive isolates contained sulfonamide resistance gene *sul1* as an

essential part of class 1 integrons. Gene cassettes *dfrA12* and *aadA2* were the most prevalent and were identified in 16 isolates. These gene cassettes are commonly reported in *Aeromonas* from aquatic environments but also from humans (Lee et al., 2008; Lukkana et al., 2012). In nine isolates positive for *dfrA12* and *aadA2* genes PCR reaction using primers targeting 5' and 3' conservative region of class 1 integron (5'CS and 3'CS primers) was negative. PCRs using combination of primers targeting 5' conservative region of class 1 integron with *dfrA12* or *aadA2* gene cassettes were positive. The results indicate a mutation in 3' region of these integrons. Such atypical integrons have been previously reported in aeromonads from ornamental fish in Thailand (Lukkana et al., 2012). Integrons with unusual structure harbouring rifampicin resistance gene *arr3* along with aminoglycoside and trimethoprim resistance gene cassettes *aacA4* and *dfrA1*, respectively, were identified in isolates from imported ornamental fish. These integrons showed ≥99% homology to an integron described in *Vibrio cholerae* (AB219236). Rifampicin is commonly used for the treatment of mycobacterial infections in humans including the cases of *Mycobacterium marinum* infection associated with ornamental fish exposure (Tigges et al., 2009). The presence of rifampicin resistance genes in ornamental fish may represent a possible risk for public health.

### 3.4. Biofilm formation and the role of horizontal gene transfer in aquatic environments

All *Aeromonas* isolates carrying PMQR genes from both imported ornamental fish and koi carps examined in our study showed ability to form biofilm. According to the

**Table 2**

Characterization of PMQR-harboring plasmids in transformants from *Aeromonas* isolates originating from imported tropical ornamental fish and koi carps.

Isolate	Species complex <sup>a</sup>	Origin <sup>b</sup>	PFGE <sup>c</sup>	Location of PMQR and AR genes <sup>d</sup>	RFLP <sup>e</sup>
N42	<i>A. sobria</i>	Tropical fish (Vietnam)	NT	IncU (20 kb): <i>qnrS2</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	a
CH10	<i>A. sobria</i>	Tropical fish (Vietnam)	D <sub>2</sub>	IncU (20 kb): <i>qnrS2</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	a
CH11	<i>A. sobria</i>	Tropical fish (Vietnam)	D <sub>1</sub>	IncU (20 kb): <i>qnrS2</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	a
CH12	<i>A. sobria</i>	Tropical fish (Thailand)	D <sub>1</sub>	IncU (20 kb): <i>qnrS2</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	a
4	<i>A. hydrophila</i>	Koi carp (farm A)	A <sub>5</sub>	IncU (20 kb): <i>qnrS2</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	a
6	<i>A. hydrophila</i>	Koi carp (farm A)	A <sub>4</sub>	IncU (20 kb): <i>qnrS2</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	a
7	<i>A. hydrophila</i>	Koi carp (farm A)	A <sub>4</sub>	IncU (20 kb): <i>qnrS2</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	a
10	<i>A. hydrophila</i>	Koi carp (farm A)	A <sub>5</sub>	IncU (20 kb): <i>qnrS2</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	a
CH21	<i>A. sobria</i>	Tropical fish (Thailand)	NT	IncU (35 kb): <i>qnrS2</i> , <i>sul1</i> , Int 0.75 kb: <i>dfrA22</i>	b
227	<i>A. hydrophila</i>	Koi carp (farm A)	E	IncU (40 kb): <i>qnrS2</i>	c
CH31	<i>A. hydrophila</i>	Tropical fish (Vietnam)	A <sub>1</sub>	NT (<20 kb): <i>qnrS2</i>	d
CH36	<i>A. hydrophila/sobria</i>	Tropical fish (Vietnam)	A <sub>2</sub>	NT (<20 kb): <i>qnrS2</i>	e
CH26/1	<i>A. hydrophila</i>	Tropical fish (Thailand)	A <sub>1</sub>	NT (<20 kb): <i>qnrS2</i>	e
CH38	<i>A. hydrophila</i>	Tropical fish (Vietnam)	A <sub>3</sub>	NT (<20 kb): <i>qnrS2</i>	f
CH39	<i>A. hydrophila</i>	Tropical fish (Vietnam)	A <sub>3</sub>	NT (<20 kb): <i>qnrS2</i>	g
93	<i>A. sobria</i>	Koi carp (farm C)	NT	NT (<20 kb): <i>qnrS2</i>	h
224	<i>A. sobria</i>	Koi carp (farm A)	NT	NT (<20 kb): <i>qnrS2</i>	i

<sup>a</sup> Identification as species complexes based on phenotypic testing criteria (Cizek et al., 2010).

<sup>b</sup> Isolates were obtained from Tropical fish (country of origin is given in the brackets) and Koi carp farm A and C in the Czech Republic.

<sup>c</sup> Isolates were considered to be related and to belong to the same PFGE cluster designed by letter A-E if their Dice similarity indices were ≥85%. Isolates that belonged to the same cluster but showed one or more band differences in PFGE pattern were distinguished by numbers (e.g. A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, etc.). NT, isolates non-typeable by XbaI-PFGE.

<sup>d</sup> PMQR and other antibiotic resistance genes were located on IncU and non-typeable plasmids. Size of plasmids (in kb) is shown in the brackets; AR, antibiotic resistance; Int, class 1 integron including the size of variable region and a gene cassette.

<sup>e</sup> RFLP, restriction fragment length polymorphism profiles of plasmid DNA obtained by HincII (IncU plasmids) and AluI (NT, non-typeable plasmids) digestion. Identical RFLP patterns of IncU plasmids are indicated by letters a–c. RFLP profiles of non-typeable plasmids are differentiated by letters d–i.

classification proposed by Stepanović et al. (2000), 48% ( $n = 16$ ) and 52% ( $n = 17$ ) *Aeromonas* isolates were weakly and moderately adherent, respectively. Biofilm matrix with high density of bacteria concentrated in a limited place may represent a suitable environment for HGT processes in aquatic ecosystems (Lupo et al., 2012). HGT and recombination of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements between different bacterial species are promoted under selective pressure including residual and subinhibitory antimicrobial concentrations of tetracyclines and quinolones in sediments (Kruse and Sørum, 1994). Quinolones are slowly degraded and are well-known inducers of mutagenesis and antimicrobial tolerance (Blazquez et al., 2012). In our study, PMQR genes from 79% *Aeromonas* isolates were transferred to recipient *E. coli* cells by chemical transformation. Despite the method used, Huddleston et al. (2013) demonstrated that *Aeromonas* spp. belong to naturally transformable bacteria and 73% and 100% of tested aeromonads could act as a recipients and donors of DNA, respectively. *Aeromonas* may play an important role in the dissemination of antibiotic resistance genes and resistance plasmids in aquatic environment. Conjugative transfer to recipient cells of *Aeromonas* spp. and *E. coli* was not successful. Low conjugative ability of *Aeromonas* plasmids has been demonstrated (Cattoir et al., 2008).

### 3.5. IncU plasmids as vectors of quinolone resistance in aquatic environment

A total of 17 transformants harbouring a single plasmid were obtained for further comparative analyses (Table 2). In seven transformants the gene *qnrS2* was presented on small plasmids of different RFLP profiles designed as untypeable by the methods used. Small IncQ and ColE-type plasmids have been demonstrated to be involved in the dissemination of *qnrS2* gene in *Aeromonas* isolates in aquatic environments (Han et al., 2012a,b). However, any PCR-based typing scheme for IncQ and ColE plasmids from aquatic bacteria has not been proposed up to now. In most transformants PMQR genes were found to be associated with plasmids of IncU family. IncU plasmids of 20 kb in size harbouring *qnrS2* and *aac(6')-Ib-cr* genes showing identical RFLP patterns were identified in *Aeromonas* strains from both koi carps from the Czech Republic and ornamental fish imported from Vietnam and Thailand (Table 2, Fig. 1). Hybridization experiments of these plasmids showed the location of *qnrS2*, *aac(6')-Ib-cr* and IncU *rep* gene on particular DNA fragments. Two strains (CH21, 227) contained 35 and 40 kb IncU plasmids that showed differences in PMQR gene content, RFLP patterns and location of IncU *rep* and *qnrS2* gene compared to the 20-kb IncU plasmids (Table 2, Fig. 1). PCR mapping of the *qnrS2* surrounding regions was performed in all transformants harbouring IncU plasmids. The gene *qnrS2* in isolates was inserted within the *mpR* gene encoding a putative zinc-metalloprotease as found in p37 and p42 IncU plasmids from *Aeromonas punctata* (EU439940) and *Aeromonas media* (EU439941), respectively. In transformants of tropical ornamental fish and koi carp (isolates no. CH21 and 227) the *qnrS2* region showed 100% identity to the

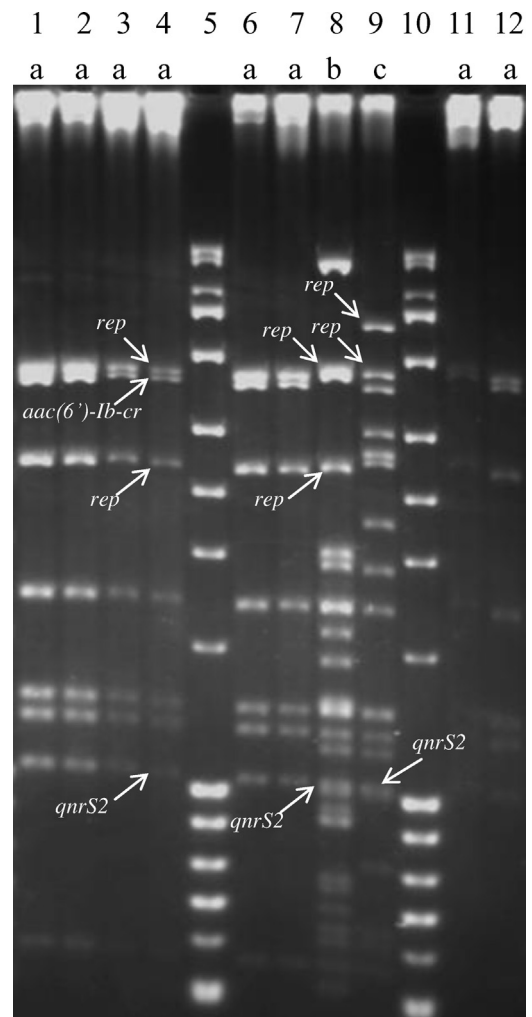


Fig. 1. *HincII* restriction profiles of IncU plasmids. Letters used at the heading of the picture represent particular RFLP patterns of IncU plasmids (a–c). Plasmids showing identical RFLP patterns are designed by the same letter. Restriction fragments identified by DIG-11-dUTP-labelled probes used for hybridization experiments are indicated with arrows in representative plasmids showing different RFLP patterns a–c. Probes targeted sequences of *qnrS2*, *aac(6')-Ib-cr* and IncU *rep* genes. Two restriction fragments were expected for the hybridization with IncU *rep* probe, since this gene contains an internal *HincII* restriction site. Plasmid DNA of *E. coli* transformants of respective *Aeromonas* isolates on the gel: lane 1, N42; lane 2, CH10; lane 3, CH11; lane 4, CH12; lane 6, 6; lane 7, 7; lane 8, CH21; lane 9, 227; lane 11, 4; lane 12, 10. Lanes 5, 10, HighRanger Plus 100 bp DNA ladder (Norgen Biotek).

reference sequences p37 and p42. In the remaining IncU plasmids, PCR mapping of the region flanking the 5' end of the *qnrS2* failed while the region surrounding the *qnrS2* at 3' end showed 100% homology to p37 and p42. The results indicate a different structure of *qnrS2* upstream region in these plasmids such as an insertion of other genes separating *qnrS2* from 5' end of *mpR* gene and resulting in failure of PCR amplification.

Members of the IncU plasmid group are implicated particularly in the dissemination of antibiotic resistance in *Aeromonas* strains associated with fish and aquatic environments (Sørum et al., 2003; Cattoir et al., 2008).

*Aeromonas* isolates harbouring *qnrS2* and/or *aac(6′)-Ib-cr* genes on IncU plasmids have been reported in river and lake water (Cattoir et al., 2008; Picão et al., 2008). In our study, restriction and hybridization analysis of IncU plasmids suggested that transfer of related *qnrS2* – *aac(6′)-Ib-cr*-harbouring plasmids may have occurred between *Aeromonas* species in various aquatic environments and geographical locations. We demonstrate that IncU plasmids are important vectors of clinical relevant quinolone resistance in ornamental fish with the ability to be transferred and replicated in *E. coli*. It has been described that treatment of *A. hydrophila* infection in ornamental fish with ineffective concentrations of quinolones or the ineffective antimicrobials such as tetracycline and trimethoprim strongly induced expression of genes mediating conjugative transfer of the IncU plasmid (Cantas et al., 2012).

#### 4. Conclusion

Multiresistant phenotype, diverse antibiotic resistance genes and integrons were identified in quinolone-resistant aeromonads associated with ornamental fish. Related IncU plasmids carrying PMQR genes were found in *Aeromonas* spp. from various geographical areas. More studies including whole plasmid sequencing need to be done to understand the epidemiology and evolution of plasmids disseminating quinolone resistance in aquatic environments. Considering the rapid growth of aquaculture industry, efforts are needed to prevent development and spread of antimicrobial resistance in aquaculture to reduce the risk for human health.

#### Conflict of interest

Nothing to declare.

#### Acknowledgements

This study was funded by National Agency for Agricultural Research (project no. QJ1210237), Ministry of Agriculture of the Czech Republic (MZE 0002716202) and ‘CEITEC – Central European Institute of Technology’ (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) of the European Regional Development Fund. The study was partially supported by CENAKVA (CZ.1.05/2.1.00/01.0024) and The Project LO1205 with a financial support from the MEYS of the Czech Republic under the NPU I program. Monika Dolejska was supported by the Operational Programme ‘Education for Competitiveness’ (CZ.1.07/2.3.00/30.0014) from the European Social Fund. We thank to Marie Slavikova, Jana Kucerova and Dagmar Tausova for excellent laboratory work.

#### References

Arias, A., Seral, C., Gude, M.J., Castillo, F.J., 2010. Molecular mechanisms of quinolone resistance in clinical isolates of *Aeromonas caviae* and *Aeromonas veronii* bv *sobria*. *Int. Microbiol.* 13, 135–141.

Blazquez, J., Couce, A., Rodriguez-Beltran, J., Rodriguez-Rojas, A., 2012. Antimicrobials as promoters of genetic variation. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 561–569.

Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8, 1137–1144.

Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., Buschmann, A.H., 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ. Microbiol.* 15, 1917–1942.

Cantas, L., Midtlyng, P.J., Sorum, H., 2012. Impact of antibiotic treatments on the expression of the R plasmid *tra* genes and on the host innate immune activity during pRAS1 bearing *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish (*Danio rerio*). *BMC Microbiol.* 12, 37.

Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L., Threlfall, E.J., 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* 63, 219–228.

Cattoir, V., Poirel, L., Aubert, C., Soussy, C.J., Nordmann, P., 2008. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 231–237.

Cizek, A., Dolejska, M., Sochorova, R., Strachotova, K., Piackova, V., Vesely, T., 2010. Antimicrobial resistance and its genetic determinants in aeromonads isolated in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Vet. Microbiol.* 142, 435–439.

CLSI, 2006. Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. In: Approved Guideline M42-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.

CLSI, 2008. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.

Cole, B., Tamaru, C.S., Bailey, R., 1999. Shipping Practices in the Ornamental Fish Industry. Center for Tropical and Subtropical Aquaculture, USA, pp. 25 Publication No. 131.

Dolejska, M., Cizek, A., Literak, I., 2007. High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from Black-headed gulls in the Czech Republic. *J. Appl. Microbiol.* 103, 11–19.

Genevaux, P., Muller, S., Bauda, P., 1996. A rapid screening procedure to identify mini-*Tn10* insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties. *FEMS Microbiol. Lett.* 142, 27–30.

Han, J.E., Kim, J.H., Choresca Jr., C.H., Shin, S.P., Jun, J.W., Chai, J.Y., Park, S.C., 2012a. A small IncQ-type plasmid carrying the quinolone resistance (*qnrS2*) gene from *Aeromonas hydrophila*. *Lett. Appl. Microbiol.* 54, 374–376.

Han, J.E., Kim, J.H., Choresca Jr., C.H., Shin, S.P., Jun, J.W., Chai, J.Y., Park, S.C., 2012b. First description of ColE-type plasmid in *Aeromonas* spp. carrying quinolone resistance (*qnrS2*) gene. *Lett. Appl. Microbiol.* 55, 290–294.

Huddleston, J.R., Brokaw, J.M., Zak, J.C., Jeter, R.M., 2013. Natural transformation as a mechanism of horizontal gene transfer among environmental *Aeromonas* species. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 224–234.

Kruse, H., Sørum, H., 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4015–4021.

Lee, M.F., Peng, C.F., Lin, Y.H., Lin, S.R., Chen, Y.H., 2008. Molecular diversity of class 1 integrons in human isolates of *Aeromonas* spp. from Southern Taiwan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61, 343–349.

Literak, I., Mícuđova, M., Tausova, D., Cizek, A., Dolejska, M., Papousek, I., Prochazka, J., Vojtech, J., Borleis, F., Guardone, L., Guenther, S., Hordowski, J., Lejas, C., Meissner, W., Marcos, B.F., Tucakov, M., 2012. Plasmid-mediated quinolone resistance genes in fecal bacteria from rooks commonly wintering throughout Europe. *Microb. Drug Resist.* 18, 567–573.

Lukkana, M., Wongtavatchai, J., Chuanchuen, R., 2012. Class 1 integrons in *Aeromonas hydrophila* isolates from farmed Nile tilapia (*Oreochromis nilotica*). *J. Vet. Med. Sci.* 74, 435–440.

Lupo, A., Coyne, S., Berendonk, T.U., 2012. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Front. Microbiol.* 3, 18.

Naviner, M., Gordon, L., Giraud, E., Denis, M., Mangion, C., Le Bris, H., Ganiere, J.P., 2011. Antimicrobial resistance of *Aeromonas* spp. isolated from the growth pond to the commercial product in a rainbow trout farm following a flumequine treatment. *Aquaculture* 315, 236–241.

Parker, J.L., Shaw, J.G., 2011. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. *J. Infect.* 62, 109–118.

Picão, R.C., Poirel, L., Demarta, A., Silva, C.S., Corvaglia, A.R., Petrini, O., Nordmann, P., 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 948–950.

Smith, P., 2008. Antimicrobial resistance in aquaculture. *Rev. Sci. Tech.* 27, 243–264.

- Sørum, H., L'Abée-Lund, T.M., Solberg, A., Wold, A., 2003. Integron-containing IncU R plasmids pRAS1 and pAr-32 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1285–1290.
- Sreedharan, K., Philip, R., Singh, I.S., 2012. Virulence potential and antibiotic susceptibility pattern of motile aeromonads associated with freshwater ornamental fish culture systems: a possible threat to public health. *Braz. J. Microbiol.* 43, 754–765.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Svabić-Vlahović, M., 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 40, 175–179.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., Robicsek, A., 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 664–689.
- Tigges, F., Bauer, A., Hochauf, K., Meurer, M., 2009. Sporotrichoid atypical cutaneous infection caused by *Mycobacterium marinum*. *Acta Dermatovenerol. Alp. Panonica Adriat.* 18, 31–34.
- Verner-Jeffreys, D.W., Welch, T.J., Schwarz, T., Pond, M.J., Woodward, M.J., Haig, S.J., Rimmer, G.S.E., Roberts, E., Morrison, V., Baker-Austin, C., 2009. High prevalence of multidrug-tolerant bacteria and associated antimicrobial resistance genes isolated from ornamental fish and their carriage water. *PLoS ONE* 4, e8388.
- Weir, M., Rajić, A., Dutil, L., Cernicchiaro, N., Uhland, F.C., Mercier, B., Tuševljak, N., 2012. Zoonotic bacteria, antimicrobial use and antimicrobial resistance in ornamental fish: a systematic review of the existing research and survey of aquaculture-allied professionals. *Epidemiol. Infect.* 140, 192–206.
- Whittington, R.J., Chong, R., 2007. Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: the case for revised import risk analysis and management strategies. *Prev. Vet. Med.* 81, 92–116.
- Wilkerson, C., Samadpour, M., van Kirk, N., Roberts, M.C., 2004. Antibiotic resistance and distribution of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* O157:H7 isolates from human and bovines. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1066–1067.





## Příloha 34

DOBIASOVA, H., DOLEJSKA, M., 2016, Prevalence and diversity of IncX plasmids carrying fluoroquinolone and  $\beta$ -lactam resistance genes in *Escherichia coli* originating from diverse sources and geographical areas: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v tisku.

### Souhrn

---

Cílem studie bylo popsat prevalenci a diverzitu IncX plazmidů ve sbírce rezistentních izolátů čeledi Enterobacteriaceae z různých zdrojů (člověk, zvířata, prostředí) a geografických oblastí. U izolátů nesoucích IncX plazmid byl stanoven profil rezistence a jejich příbuznost byla vyšetřena analýzou makrorestrikčních profilů genomové DNA. IncX plazmidy byly podrobeny komparativní analýze s cílem identifikovat dominantní rozšířené linie plazmidů. Plazmidy podskupiny IncX1 nesoucí geny *qnrS1* a *bla<sub>TEM-135</sub>* byly identifikovány u *E. coli* z různých zdrojů a oblastí. Druhou nejčastěji skupinou byly IncX2 plazmidy s geny *qnrS1* a *tet(A)* rozšířené zejména u vodních ptáků v Evropě. Studie upozorňuje na šíření IncX plazmidů v prostředí a jejich sdružení s geny rezistence k fluorochinolonům.



# Prevalence and diversity of IncX plasmids carrying fluoroquinolone and $\beta$ -lactam resistance genes in *Escherichia coli* originating from diverse sources and geographical areas

Hana Dobiasova<sup>1\*</sup> and Monika Dolejska<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic; <sup>2</sup>Central European Institute of Technology - University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno (CEITEC VFU), Palackeho tr. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic

\*Corresponding author. Tel: +420-541-562-647; E-mail: dobiasova.hanka@gmail.com

Received 15 September 2015; returned 17 December 2015; revised 9 March 2016; accepted 28 March 2016

**Objectives:** Aim of the study was to describe the prevalence and diversity of IncX plasmids with antibiotic resistance genes in Enterobacteriaceae and to identify the most disseminated lineages of the plasmid family.

**Methods:** IncX plasmids were screened in 1894 Enterobacteriaceae isolates resistant to cefotaxime (2 mg/L) or with reduced susceptibility to ciprofloxacin (0.05 mg/L) obtained from various sources in five continents using PCR. IncX plasmid-harboring isolates were identified using MALDI-TOF or biochemical tests, and screened for antibiotic resistance genes using PCR and sequencing; their clonality was determined by PFGE. Horizontal transfer of plasmids was tested using transformation and conjugation. IncX plasmids were characterized by S1-nuclease and PFGE, restriction fragment length polymorphism and hybridization.

**Results:** A total of 164 *Escherichia coli* isolates (8.7%,  $n=1894$ ) carried at least one IncX subgroup. Seven isolates harboured two distinct subgroups. IncX1 subgroup was found in 93 isolates, followed by IncX2 (35 isolates), IncX4 (28) and IncX3 (15). IncX4 plasmids were not transferred horizontally as single plasmids and therefore excluded from further analysis. The most disseminated lineages of IncX plasmids included IncX1 harbouring *qnrS1* and *bla*<sub>TEM-1,-135</sub> found in 36 *E. coli* from different sources in Europe and Australia and IncX2 carrying *qnrS1* and *tet(A)* detected in nine *E. coli* from wildlife in Europe. IncX3 plasmids harboured predominantly *bla*<sub>SHV-12</sub> and *qnrS1* or *qnrB7*.

**Conclusions:** IncX plasmids were widely distributed in *E. coli* from wildlife in Europe and were predominantly associated with fluoroquinolone resistance genes. Plasmids showing indistinguishable restriction profiles were identified in *E. coli* from different sources and countries suggesting wide dissemination of certain plasmid lineages.

## Introduction

Horizontal transfer of antibiotic resistance genes mediated by plasmids belong to the most crucial means of antibiotic resistance dissemination in Gram-negative bacteria.<sup>1</sup> In Enterobacteriaceae, IncF, IncA/C, IncL/M, IncI1, IncHI2 and IncN plasmids belong to predominant plasmid families promoting worldwide spread of carbapenemase, ESBL, AmpC cephalosporinase and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes.<sup>1,2</sup> In this context, IncX plasmids belonged to rather rare plasmid families predominantly associated with PMQR genes.<sup>1</sup> However, the low prevalence of IncX plasmids was associated with limitations of a standard method used for identification of major plasmid families, PCR-based replicon typing.<sup>3</sup>

IncX plasmids were detected in *Salmonella* and *Klebsiella* isolates from the pre-antibiotic era.<sup>4</sup> The most studied IncX plasmid

R6K is a multicopy self-transferable iteron-containing plasmid with theta replication controlled by molecular interactions of two minimal replicon components,  $\gamma$  *oriV* and Rep ( $\pi$  protein).<sup>5</sup> The host range of the R6K plasmid was supposed to be narrow comprising several Enterobacteriaceae genera. Nevertheless, WT R6K minimal replicon establishment was demonstrated in *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae* and *Zoogloea ramigera*.<sup>5,6</sup>

The first division of the IncX plasmid family into two subgroups, IncX1 and IncX2, was based on restriction analysis.<sup>4</sup> Johnson *et al.*<sup>3</sup> proposed expansion of the plasmid family to IncX3 and IncX4 subgroups based on phylogeny inferred from polymorphisms within conserved regions of 18 sequenced IncX plasmids. Shortly after, Chen *et al.*<sup>7</sup> found *K. pneumoniae* ST429 isolate with *bla*<sub>KPC-5</sub>-harbouring plasmid assigned to IncX5 subgroup. To date, IncX plasmids were found to carry various antibiotic resistance genes, e.g. PMQR genes (*qnrS1*, *oqxAB*), ESBL genes

(*bla*<sub>TEM-52</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>), carbapenemase genes (*bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>KPC-2,-5</sub>) and others.<sup>3,7-9</sup> All these findings highlight the great diversity of the IncX family and potentially underestimated role of the plasmids in dissemination of antibiotic resistance genes in Enterobacteriaceae.

The aim of our study was to determine the prevalence and diversity of IncX plasmids harbouring fluoroquinolone and β-lactam resistance genes in a large collection of Enterobacteriaceae isolates from various sources and widely separated areas and to identify the most disseminated lineages of the plasmids with respect to their resistance gene content and restriction profile.

## Materials and methods

### Bacterial isolates

A collection of 1894 Enterobacteriaceae isolates consisting of 963 (50.8%) and 931 (49.2%) isolates was obtained on MacConkey agar (MCA; Oxoid) with ciprofloxacin (0.05 mg/L; Fluka, China) or cefotaxime (2 mg/L; Sigma, China) after overnight cultivation at 37°C, respectively. Isolates were identified using API 20E (bioMérieux, France) or MALDI-TOF (Microflex LT, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). MALDI-TOF mass spectra were analysed using FlexControl-microflex v 3.3 (Bruker Daltonics) and MALDI Biotyper v 3.1 (Bruker Daltonics) software. Of 18 Enterobacteriaceae species in the collection, the most prevalent species included *Escherichia coli* (1471 isolates, 77.7%, *n* = 1894), *Klebsiella pneumoniae* (165 isolates, 8.7%) and *Citrobacter freundii* (130 isolates, 6.9%), 128 isolates (6.8%) were assigned to other Enterobacteriaceae species including 15 samples of pooled DNA extracted from different colonies grown on MCA with ciprofloxacin. These Enterobacteriaceae isolates were obtained from wildlife (1252 isolates, 66.1%), municipal wastewater (438, 23.1%), domestic animals (117, 6.2%), humans (52, 2.7%), food-producing animals (34, 1.8%) and captive animals (1, 0.1%) in Europe (904, 47.7%), Australia [New South Wales (700, 37.0%)], Africa (193, 10.2%), North America (85, 4.5%) and South America [Paraguay (12, 0.6%)] during 2009–2012 (Table S1, available as Supplementary data at JAC Online). A total of 368 isolates were drawn from previous studies lacking IncX plasmid analysis and 696 Enterobacteriaceae isolates originating from silver gulls (Australia) were obtained via subcultivation on MCA with cefotaxime or ciprofloxacin.<sup>10-17</sup> Furthermore, 19 IncX plasmids from 18 *E. coli* and one *Enterobacter cloacae* that were characterized in previous studies were also included in comparative analysis of IncX plasmids.<sup>18-25</sup>

### Screening of IncX plasmids and β-lactamase and PMQR genes

IncX1–IncX4 subgroups were tested in 1894 Enterobacteriaceae isolates using PCR targeting *taxC*.<sup>3</sup> IncX-positive isolates grown on MCA with cefotaxime were tested for ESBL (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>), carbapenemase (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>OXA-48-like</sub>) and AmpC (*bla*<sub>CMY-2-like</sub>) genes using PCR and sequencing.<sup>16,24,26,27</sup> Isolates grown on MCA with ciprofloxacin were tested for PMQR genes [*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6′)-Ib-cr*, *qepA*, *oqxAB*] using PCR and sequencing as described previously.<sup>14,21,24,28</sup> All primers used are listed in (Table S2).

### Horizontal transfer of IncX plasmids and their sizing

Plasmid DNA extracted from all IncX-carrying Enterobacteriaceae isolates using alkaline lysis was transferred via heat-shock transformation of plasmid-free *E. coli* DH5α or Top10 recipient cells. Transformants (TFs) were selected on LB agar (Difco, France) containing cefotaxime (2 mg/L) or ciprofloxacin (0.05 mg/L) based on the medium used for selective isolation of the corresponding donor Enterobacteriaceae isolates.<sup>24</sup>

Conjugation was tested using filter-mating method with plasmid-free rifampicin (Rf)-resistant and sodium azide (SA)-resistant recipient cells of *E. coli* MT102RfSA and *Salmonella* Typhimurium SL5325RfSA or *Salmonella* Enteritidis Fa8065RfSA. IncX-positive isolates and recipients were cultivated to exponential growth phase in brain heart infusion broth (Oxoid, UK) with shaking at 37°C and then mixed in 1:1 ratio. The mixtures were cultivated on bacteriological filters placed on non-selective Columbia Blood Agar Base (Oxoid) overnight at 37°C. Transconjugants (TCs) were selected on LB agar containing 25 mg/L rifampicin, 100 mg/L sodium azide and 2 mg/L cefotaxime or 0.05 mg/L ciprofloxacin based on the medium used for selective isolation of the corresponding donor Enterobacteriaceae isolates.<sup>24</sup> Successful horizontal transfer of IncX plasmids was confirmed using PCR.<sup>3</sup> If no TFs or TCs carrying IncX plasmids were obtained on LB agar with cefotaxime, conjugation was repeated and TCs were selected on LB agar containing ciprofloxacin. Likewise, if no TFs or TCs with IncX plasmids were obtained on LB agar with ciprofloxacin, TCs were selected on LB agar containing cefotaxime. Number and size of successfully transferred plasmids were estimated using S1-nuclease and PFGE along with plasmid DNA extraction followed by standard gel electrophoresis. In TCs harbouring IncX plasmids of different size compared with donor isolates, PCR-based replicon typing was performed (Table S2).<sup>29</sup> Plasmids were further characterized only in TFs or TCs harbouring a single IncX plasmid.

### Clonality of IncX-harboring isolates

Relatedness of donor isolates with successfully transferred IncX plasmids was determined using XbaI digestion (Takara, Japan) and PFGE<sup>30</sup> and assessed using UPGMA cluster analysis in BioNumerics (Applied Maths, Belgium). IncX plasmid analysis was performed only from isolates showing unique macrorestriction profiles.

### Susceptibility and antibiotic resistance gene testing

Susceptibility of donor isolates to 12 antibiotics (10 μg ampicillin, 20 + 10 μg amoxicillin/clavulanate, 30 μg cefalotin, 30 μg ceftazidime, 30 μg chloramphenicol, 5 μg ciprofloxacin, 10 μg gentamicin, 30 μg nalidixic acid, 10 μg streptomycin, 300 μg sulphonamides cp, 1.25 + 23.75 μg trimethoprim/sulfamethoxazole, 30 μg tetracycline; Oxoid) was tested using a disc diffusion method.<sup>31</sup> Donor isolates, TCs or TFs were tested for relevant antibiotic resistance genes including class 1 and 2 integrons using PCR.<sup>24</sup> If amplification of the whole variable region of the class 1 integron failed, the partial structure of the variable region was determined using primers targeting conserved segments and relevant gene cassettes (Table S2).

### Relatedness of IncX plasmids

Plasmid DNA was isolated using alkaline extraction or a PureLink® HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen, Life Technologies, Germany). IncX and IncX2–IncX11 plasmids were compared using HincII (Thermo-Scientific, USA) or PstI (Takara, Japan) digestion under conditions as recommended by the suppliers, respectively, and DNA fragments were separated in 1% agarose gel at 6 V/cm for 5 h. IncX plasmids were divided into clusters based on Dice coefficient ≥85% of similarity of their restriction profiles assessed using UPGMA cluster analysis in BioNumerics (Applied Maths). With respect to each subgroup, restriction profiles were designated with letters (e.g. A, a, α) based on the Dice coefficient ≥85%. Band differences in related restriction profiles were distinguished using numbers (e.g. A1, b1). DNA fragments of IncX plasmids were transferred to positively charged nylon membrane (Biodyne B; Pall Corporation, USA) using Southern blot.<sup>32</sup> DIG-11-dUTP-labelled probes targeting the *taxC* gene of IncX1–IncX3 subgroups, RNAI of IncX11, *qnrS1*, *qnrS2*, *qnrB7*, *qnrB19*, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV-12</sub> were prepared using a PCR DIG Probe

**Table 1.** Prevalence of IncX plasmids in Enterobacteriaceae isolates regarding their source, origin and antibiotic used for their selective isolation

Enterobacteriaceae isolates	No. of isolates			P <sup>a</sup>
	IncX-positive (%)	IncX-negative (%)	total	
<b>Source</b>				
captive animals	1 (100)	0 (0)	1	ND
domestic animals	8 (6.8)	109 (93.2)	117	0.47
food-producing animals	2 (5.9)	32 (94.1)	34	0.56
municipal wastewater	16 (3.7)	422 (96.3)	438	<b>&lt;0.001</b>
humans	0 (0)	52 (100)	52	<b>0.02</b>
wildlife	137 (10.9)	1115 (89.1)	1252	<b>&lt;0.001</b>
total no. of isolates	164	1730	1894	—
<b>Origin</b>				
Africa	1 (0.5)	192 (99.5)	193	<b>&lt;0.001</b>
Australia	38 (5.4)	662 (94.6)	700	<b>&lt;0.001</b>
Europe	117 (12.9)	787 (87.1)	904	<b>&lt;0.001</b>
North America	6 (7.1)	79 (92.9)	85	0.59
South America	2 (16.7)	10 (83.3)	12	0.32
total no. of isolates	164	1730	1894	—
<b>Selective isolation</b>				
ciprofloxacin	98 (10.2)	865 (89.8)	963	<b>0.02</b>
cefotaxime	66 (7.1)	865 (92.9)	931	<b>0.02</b>
total no. of isolates	164	1730	1894	—

ND, not determined (P value of the  $\chi^2$  test was not determined due to small number of isolates).

<sup>a</sup>P ≤ 0.05 (bold) was considered statistically significant.

Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Germany). Hybridization results were detected using a DIG Wash and Block Buffer Set (Roche Diagnostics).

### Statistical analysis

To assess the statistical significance of obtained data, the  $\chi^2$  test was performed using MS Excel. P ≤ 0.05 was considered statistically significant.

## Results and discussion

### Prevalence and hosts of IncX plasmids

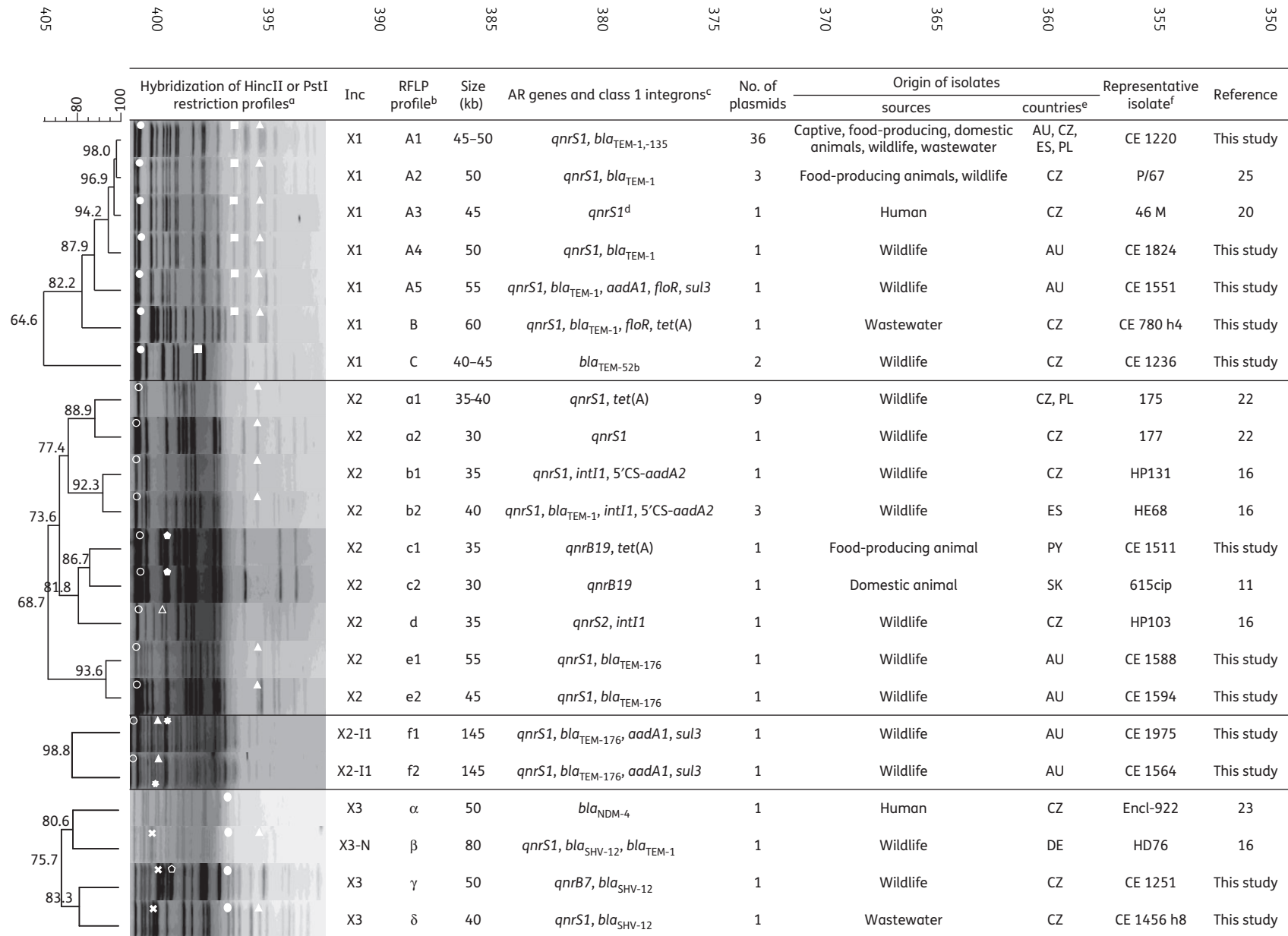
IncX plasmids were found in 164 *E. coli* isolates (8.7%, n = 1894) originating from all of the continents and sources but humans. Despite the previous detection of the plasmids in different Enterobacteriaceae species,<sup>3,4,7,9</sup> no IncX plasmids were found in isolates belonging to any other Enterobacteriaceae species from the tested collection.

Statistically significant (P = 0.02) high occurrence of IncX plasmids was found in isolates with reduced susceptibility to fluoroquinolones (98 isolates, 10.2%, n = 963). Despite most of the test isolates originating from wildlife and from Europe, a statistically significant (P < 0.001) high occurrence of IncX plasmids was detected in *E. coli* from wildlife (137 isolates, 10.9%, n<sub>wildlife</sub> = 1252) among the sources tested and from Europe (117, 12.9%, n<sub>Europe</sub> = 904) among the continents tested. A statistically significant (P < 0.001) low distribution of IncX plasmids was found in isolates from municipal wastewater (16 isolates, 3.7%, n<sub>wastewater</sub> = 438) among the sources tested, from Africa (1 isolate, 0.5%, n<sub>Africa</sub> = 193) and Australia (38, 5.4%,

n<sub>Australia</sub> = 700) among all continents tested (Table 1). Of note, no IncX plasmids were found in 52 isolates from humans. However, IncX plasmids harbouring resistance genes have been already reported from Enterobacteriaceae from hospitalized patients and community.<sup>7-9,20,33</sup> Absence of IncX plasmids in Enterobacteriaceae isolates from humans was most likely associated with a small number of these isolates and possibly with the low prevalence of IncX plasmids found in African isolates as all human isolates originated from Africa.

Isolates (95.7%, n<sub>IncX-positive E. coli</sub> = 164) harboured a single IncX subgroup. In six and one isolates, IncX4 along with IncX1 or IncX2 subgroups were detected, respectively. An IncX1 and IncX4 combination was observed also in *Salmonella* Heidelberg isolated from food in the USA.<sup>34</sup> Division of the plasmid family into four subgroups was based on overall phylogeny of the IncX plasmid backbones and stable propagation of distinct IncX plasmid subgroups in one cell line has not been addressed yet.<sup>3</sup> However, Norman *et al.*<sup>35</sup> described partial incompatibility of IncX1 and IncX2 plasmids attributed to sequence divergence within genes coding for partitioning. Similarly, Bielak *et al.*<sup>36</sup> observed stable propagation of two distinct IncX1 plasmids in one cell line ascribed to low amino acid sequence homology of corresponding Rep proteins. Further studies are warranted to assess the in-/compatibility of these plasmids among and within IncX subgroups.

The IncX1 subgroup was found in 93 isolates (54.4%, n<sub>IncX subgroups</sub> = 171), followed by the IncX2 subgroup (35 isolates, 20.5%), the IncX4 subgroup (28, 16.4%) and the IncX3 subgroup (15, 8.8%). Intriguingly, the IncX1 subgroup was predominant



**Figure 1.** Characteristics of IncX plasmids. AR, antibiotic resistance; Inc, incompatibility group; RFLP, restriction fragment length polymorphism. <sup>a</sup>Restriction profiles of IncX and mosaic IncX2–Inc1 plasmids were obtained using HincII and PstI digestion, respectively. DNA fragments bound to probes are marked as follows: filled circle, open circle and filled oval, *taxC* of IncX1, IncX2 and IncX3 subgroup, respectively; filled square, *bla*<sub>TEM</sub>; filled triangle, *qnrS1*; open triangle, *qnrS2*; filled pentagon, *qnrB19*; open pentagon, *qnrB7*; asterisk, RNAI of Inc11; and cross, *bla*<sub>SHV-12</sub>. <sup>b</sup>Plasmids were divided into clusters of related plasmids if the Dice coefficient of their restriction profiles was ≥85%. Clusters of related plasmids were designated as follows: IncX1, three clusters (A–C); IncX2 and IncX2–Inc1, six clusters (a–f); and IncX3 and IncX3–IncN, four clusters (α–δ). Band differences in related restriction profiles were differentiated using numbers (e.g. A1, A2; b1, b2). <sup>c</sup>Whole variable region of class 1 integrons was determined using primers targeting 5'- and 3'-conserved segments. If amplification of the whole variable region failed, the partial structure of the variable region was determined using PCR mapping with primers complementary to conserved segments and relevant gene cassettes (Table S2). <sup>d</sup>*bla*<sub>TEM</sub> on IncX1 plasmid of *E. coli* 46 M could be detected using only hybridization. <sup>e</sup>AU, Australia; CZ, Czech Republic; DE, Germany; ES, Spain; PL, Poland; PY, Paraguay; SK, Slovakia. <sup>f</sup>Representative isolate was randomly chosen from isolates harbouring the IncX plasmid of a particular restriction profile.



in IncX-harbouring Enterobacteriaceae isolates from the pre-antibiotic era (1920s–1940s) and antibiotic-resistant IncX-positive Enterobacteriaceae isolated during the 1960s–1980s.<sup>4</sup>

IncX plasmids that were successfully transferred via transformation or conjugation as single plasmids were further characterized. In our study, the comparative analysis of 70 IncX1–IncX3 plasmids included 51 plasmids from *E. coli* isolates obtained in this study, 18 and 1 plasmids from *E. coli* and *E. cloacae* characterized in previous studies.<sup>18–25</sup> All the 70 IncX1–IncX3 plasmids were obtained from donor isolates showing unique macrorestriction profiles (Figures S1 to S4). IncX4 plasmids could not be analysed in our study because they were not transferred horizontally as single plasmids.

### IncX1 plasmids as widely disseminated vectors of *qnrS1*

A total of 43 and 2 IncX1 plasmids (40–60 kb) carried *qnrS1* or *bla*<sub>TEM-52b</sub>, respectively. Forty-two *qnrS1*-positive IncX1 plasmids harboured *bla*<sub>TEM-1,-135</sub>. Additional resistance genes were found on two IncX1 plasmids derived from *E. coli* CE 1551 from a silver gull (Australia) and *E. coli* CE 780 h4 from municipal wastewater (Czech Republic). Based on restriction profile analysis, 42 *qnrS1*-carrying IncX1 plasmids comprised a cluster of related plasmids designated 'A' containing five subgroups (A1–A5; Figure 1). The A1 subgroup covering 36 identical IncX1 plasmids was found in *E. coli* from captive, food-producing and domestic animals, wildlife and municipal wastewater in Australia, Czech Republic, Poland and Spain indicating wide distribution of the plasmid lineage. Hybridization results demonstrated a high degree of conservation of IncX1 plasmids as probes targeting *taxC*, *qnrS1* and *bla*<sub>TEM</sub> were bound to identical DNA fragments of 'A' and 'B' restriction profiles (Figure S5). The two identical *bla*<sub>TEM-52b</sub>-harbouring plasmids found in *E. coli* from a wild boar and a gull in the Czech Republic comprised a 'C' cluster (Figure 1). Similar *bla*<sub>TEM-52b</sub>-harbouring IncX1 plasmids (pE001, pDKX1-TEM-52, pYM4) were found in *E. coli*, *Salmonella* Manhattan and *Salmonella* Infantis from poultry and beef meat in Denmark and Japan.<sup>3,36,37</sup>

### IncX2 plasmids are associated with different fluoroquinolone resistance genes

Despite IncX2 subgroup constituted the second largest group containing 21 plasmids in our study, their occurrence is reported only rarely.<sup>4,22</sup> IncX2 (30–55 kb) and IncX2–IncI1 (145 kb) plasmids harboured *qnrS1* (18 plasmids), *qnrB19* (2) or *qnrS2* (1). IncX2 plasmids were divided into five clusters (a–e) ranging from 68.7% to 81.8% of their restriction profile similarity. Two closely related IncX2–IncI1 plasmids comprised an 'f' cluster (Figure 1). The most disseminated IncX2 lineage (a1) harbouring *qnrS1* and *tet(A)* was recovered from nine *E. coli* from wild birds in central Europe. Characteristics of the 'a1' lineage corresponded to the IncX2 plasmid pEBG1 found in *E. coli* from a human in Nigeria.<sup>33</sup> The second largest group of IncX2 plasmids (b) was found in four *E. coli* isolates from rooks in Spain and the Czech Republic. Plasmids of the 'b' lineage carried *qnrS1* and an incomplete class 1 integron and differed in the presence of *bla*<sub>TEM-1</sub>. Characteristics of the 'b2' lineage corresponded to the IncX2 plasmid pNGX2-QnrS1 identified in *E. coli* from a Nigerian chicken.<sup>3</sup> IncX2 plasmids with *qnrS1* and *bla*<sub>TEM-176</sub> ('e' cluster) from

Australian *E. coli* shared 68.7% similarity with plasmids from Europe likely indicating the independent evolution of the plasmid lineage. IncX2 plasmid of *E. coli* (HP103) from a rook (Czech Republic) carried *qnrS2*. To our knowledge, this is the first report documenting *qnrS2* on IncX2 plasmid as the gene is usually found on IncU plasmids in *Aeromonas* spp.<sup>38</sup> Two related *qnrB19*-harbouring plasmids ('c' cluster) were found in *E. coli* from a broiler (Paraguay) and a dog (Slovakia). A 33 kb IncX plasmid harbouring *qnrB19* was identified also in Tunisia.<sup>39</sup> Hybridization results showed a high degree of conservation within each cluster of related IncX2 plasmids except for IncX2–IncI1 plasmids as a probe targeting RNAI of IncI1 was bound to different fragments (Figure 1).

### IncX3 plasmids showing the highest diversity among studied IncX plasmids

Although IncX3 plasmids comprised the smallest group including only four plasmids in our study, this plasmid subgroup harbouring carbapenemase genes is currently frequently reported.<sup>8,9,40</sup> Three IncX3 (40–50 kb) and one IncX3–IncN (80 kb) plasmids showed unrelated restriction profiles. Two IncX3 and one IncX3–IncN plasmids from *E. coli* from wild birds and municipal wastewater (central Europe) carried *bla*<sub>SHV-12</sub> and *qnrS1* or *qnrB7*. To our knowledge, co-localization of these resistance genes on IncX3 plasmid has not been reported so far. Nevertheless, *bla*<sub>SHV-12</sub> has been detected along with *bla*<sub>KPC-2</sub> or *bla*<sub>NDM-1</sub> on IncX3 plasmids.<sup>8,9,40</sup> Recently, a large number of IncX3 plasmids with *bla*<sub>NDM-4</sub>-like variants were recovered from human clinical Enterobacteriaceae isolates including IncX3 plasmid (Encl-922) with *bla*<sub>NDM-4</sub> added to our study.<sup>9,23,40</sup> IncX3 plasmids were suggested to play a substantial role in emergence, development and dissemination of *bla*<sub>NDM-4</sub>-like alleles.<sup>40</sup> In our study, hybridization identified differences in *bla*<sub>SHV-12</sub> localization on IncX3 plasmids (Figure 1).

### Conclusions

In conclusion, our study showed wide distribution of IncX plasmids in *E. coli* from wildlife in Europe and their association with PMQR genes, particularly *qnrS*. In the present study, we have identified several IncX1 and IncX2 plasmid lineages widely distributed in non-related *E. coli* from various sources and geographical areas indicating the role of these plasmids in the dissemination of different antibiotic resistance genes. However, additional study the concerning prevalence and diversity of IncX3–IncX5 plasmids is warranted, as a limited number of IncX3, no IncX4 and IncX5 plasmids were characterized in our study. Another issue concerning in-/compatibility of plasmids among and within particular IncX family subgroups also needs to be clarified in the future.

### Acknowledgements

Part of this work was presented at the following conferences: Fifth Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE) 2013 (P056); Fifth Congress of European Microbiologists (FEMS) 2013 (1856); Fifty-third Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) 2013 (C2-1129); European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology (ESCAIDE) 2014 (20142072); European Congress of Clinical Microbiology and Infectious



Diseases (ECCMID) 2015 (EV0190); and Fourth ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens (ASM) 2015 (S3:3).

We would like to thank A. Cizek, I. Literak, I. Jamborova, K. Albrechtova, D. Tausova, M. Janatova, D. Halova, J. Hrabak and C. Papagiannitsis for providing the test isolates. We thank M. Masarikova, J. Hofirkova, E. Suchanova, M. Sevcikova, J. Vojtech, K. Rodova, P. Miskova, V. Dubska, M. Brutovska, V. Oravcova, L. Zurek, A. Townsend, A. B. Clark, J. C. Ellis, N. Janecko, M. Phinney, M. Elderkin, S. McBurney, N. Carlile, M. Havlicek and D. Priddel for their help in the laboratory and in the field. We thank G. Jacoby (Lahey Clinic Inc., Burlington, MA, USA), L. Cavaco, H. Hasman (National Food Institute, Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, Denmark) and A. Carattoli (Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy) for providing positive control strains.

## Funding

**Q3** This work was supported by: the [Internal Grant Agency of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno \(13/2014/FVHE\)](#); the [Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic \(NT14398\)](#); the [Czech Science Foundation \(15-14683Y/P502\)](#); and [CEITEC 2020—Central European Institute of Technology \(LQ1601\)](#) from the [Czech Ministry of Education, Youth and Sports within the National Programme for Sustainability II](#).

## Transparency declarations

None to declare.

## Supplementary data

Tables S1 and S2 and Figures S1 to S5 are available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org>).

## References

- Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol* 2013; **303**: 298–304.
- Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 2227–38.
- Johnson TJ, Bielak EM, Fortini D *et al.* Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant Enterobacteriaceae. *Plasmid* 2012; **68**: 43–50.
- Jones CS, Osborne DJ, Stanley J. Molecular comparison of the IncX plasmids allows division into IncX1 and IncX2 subgroups. *J Gen Microbiol* 1993; **139**: 735–41.
- Grudniak AM, Kraczkiewicz-Dowjat A, Wolska KI *et al.* Conjugal transfer of plasmid R6K  $\gamma$  ori minireplicon derivatives from *Escherichia coli* to various genera of pathogenic bacteria. *Curr Microbiol* 2007; **55**: 549–53.
- Wild J, Czyz A, Rakowski SA *et al.*  $\gamma$  Origin plasmids of R6K lineage replicate in diverse genera of Gram-negative bacteria. *Ann Microbiol* 2004; **54**: 471–80.
- Chen L, Chavda KD, Fraimow HS *et al.* Complete nucleotide sequences of *bla*<sub>KPC-4</sub> and *bla*<sub>KPC-5</sub>-harboring IncN and IncX plasmids from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in New Jersey. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 269–76.
- Kassis-Chikhani N, Frangeul L, Drieux L *et al.* Complete nucleotide sequence of the first KPC-2- and SHV-12-encoding IncX Plasmid, pKpS90, from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 618–20.

- Du XX, Wang JF, Fu Y *et al.* Genetic characteristics of *bla*<sub>NDM-1</sub>-positive plasmid in *Citrobacter freundii* isolate separated from a clinical infectious patient. *J Med Microbiol* 2013; **62**: 1332–7.
- Albrechtova K, Dolejska M, Cizek A *et al.* Dogs of nomadic pastoralists in northern Kenya are reservoirs of plasmid-mediated cephalosporin- and quinolone-resistant *Escherichia coli*, including pandemic clone B2-O25-ST131. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 4013–7.
- Albrechtová K, Literák I, Čížek A. Výskyt izolátů *Escherichia coli* s produkcí širokospektrých  $\beta$ -laktamáz a plazmidově přenášenou rezistencí k fluorochinolonům u definovaných souborů psů a koček v České a Slovenské republice. *Veterinářství* 2014; **64**: 277–82. [Article in Czech].
- Albrechtova K, Kubelova M, Mazancova J *et al.* High prevalence and variability of CTX-M-15-producing and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* observed in stray dogs in rural Angola. *Microb Drug Resist* 2014; **20**: 372–5.
- Albrechtova K, Papousek I, De Nys H *et al.* Low rates of antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae in wildlife in Tai National Park, Cote d'Ivoire, surrounded by villages with high prevalence of multiresistant ESBL-producing *Escherichia coli* in people and domestic animals. *PLoS One* 2014; **9**: e113548.
- Halova D, Papousek I, Jamborova I *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance genes in Enterobacteriaceae from American crows: high prevalence of bacteria with variable *qnrB* genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 1257–8.
- Janatova M, Albrechtova K, Petrzekova KJ *et al.* Antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae from humans and wildlife in Dzanga-Sangha Protected Area, Central African Republic. *Vet Microbiol* 2014; **171**: 422–31.
- Jamborova I, Dolejska M, Vojtech J *et al.* Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and fluoroquinolones in various *Escherichia coli* sequence types isolated from rooks wintering in Europe. *Appl Environ Microbiol* 2015; **81**: 648–57.
- Dolejska M, Masarikova M, Dobiasova H *et al.* High prevalence of *Salmonella* and IMP-4-producing Enterobacteriaceae in the silver gull on Five Islands, Australia. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 63–70.
- Literak I, Dolejska M, Radimersky T *et al.* Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in wild boars. *J Appl Microbiol* 2010; **108**: 1702–11.
- Literak I, Dolejska M, Janoszowska D *et al.* Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea coast of Poland. *Appl Environ Microbiol* 2010; **76**: 8126–34.
- Literak I, Petro R, Dolejska M *et al.* Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy urban children of two age groups in relation to their antibiotic therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 3005–7.
- Dolejska M, Duskova E, Rybarikova J *et al.* Plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 757–64.
- Tausova D, Dolejska M, Cizek A *et al.* *Escherichia coli* with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 1103–7.
- Papagiannitsis CC, Studentova V, Chudackova E *et al.* Identification of a New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-4 (NDM-4)-producing *Enterobacter cloacae* from a Czech patient previously hospitalized in Sri Lanka. *Folia Microbiol* 2013; **58**: 547–9.
- Dobiasova H, Dolejska M, Jamborova I *et al.* Extended spectrum  $\beta$ -lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among

*Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic. *FEMS Microbiol Ecol* 2013; **85**: 604–11.

**25** Literak I, Reitschmied T, Bujnakova D *et al.* Broilers as a source of quinolone-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in the Czech Republic. *Microb Drug Resist* 2013; **19**: 57–63.

**26** Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V *et al.* Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; **70**: 119–23.

**27** Agerso Y, Aarestrup FM, Pedersen K *et al.* Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 582–8.

**28** Literak I, Micudova M, Tausova D *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance genes in fecal bacteria from rooks commonly wintering throughout Europe. *Microb Drug Resist* 2012; **18**: 567–73.

**29** Carattoli A, Bertini A, Villa L *et al.* Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; **63**: 219–28.

**30** CDC. *One-Day (24–28 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of Escherichia coli O157:H7, Non-Typhoidal Salmonella serotypes, and Shigella sonnei by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)*. CDC, Atlanta, GA, USA: The National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance, 2004. [http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli\\_salmonella\\_shigella\\_protocols.pdf](http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli_salmonella_shigella_protocols.pdf).

**31** Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement M100-S21*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2011.

**32** Brown T. *Southern Blotting (00:IV:2.9A:2.9.1–2.9.20)*. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., 2001.

**33** Sumrall ET, Gallo EB, Aboderin AO *et al.* Dissemination of the transmissible quinolone-resistance gene *qnrS1* by IncX plasmids in Nigeria. *PLoS One* 2014; **9**: e110279.

**34** Hoffmann M, Zhao S, Pettengill J *et al.* Comparative genomic analysis and virulence differences in closely related *Salmonella enterica* serotype Heidelberg isolates from humans, retail meats, and animals. *Genome Biol Evol* 2014; **6**: 1046–68.

**35** Norman A, Hansen LH, She QX *et al.* Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid* 2008; **60**: 59–74.

**36** Bielak E, Bergenholtz RD, Jorgensen MS *et al.* Investigation of diversity of plasmids carrying the *bla*<sub>TEM-52</sub> gene. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 2465–74.

**37** Matsumoto Y, Izumiya H, Sekizuka T *et al.* Characterization of *bla*<sub>TEM-52</sub>-carrying plasmids of extended-spectrum-β-lactamase-producing *Salmonella enterica* isolates from chicken meat with a common supplier in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 7545–7.

**38** Cattoir V, Poirel L, Aubert C *et al.* Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg Infect Dis* 2008; **14**: 231–7.

**39** Ben Sallem R, Ben Slama K, Rojo-Bezares B *et al.* IncI1 plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> or *bla*<sub>CMY-2</sub> genes in *Escherichia coli* from healthy humans and animals in Tunisia. *Microb Drug Resist* 2014; **20**: 495–500.

**40** Espedido BA, Dimitrijević B, van Hal SJ *et al.* The use of whole-genome sequencing for molecular epidemiology and antimicrobial surveillance: identifying the role of IncX3 plasmids and the spread of *bla*<sub>NDM-4-like</sub> genes in the Enterobacteriaceae. *J Clin Pathol* 2015; **68**: 835–8.

700

705

710

715

720

725

730

735

740

745

750

755

760

765

770

775

780

785

790

795

800

805

810