

Jaroslav Hrabák

Ústav mikrobiologie, Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova

Název přednášky: Nové technologie v klinicko-mikrobiologické diagnostice se zvláštním zřetelem na detekci rezistence k antibiotikům

Souhrn: Klinicko-mikrobiologická diagnostika zažívá od přelomu tisíciletí významný metodologický posun. Běžná kultivační, mikroskopická a serologická vyšetření jsou stále častěji doplňována molekulárně-genetickými metodami, včetně sekvenace nukleových kyselin. Rovněž rutinní taxonomická identifikace mikrobů byla zrychlena a zpřesněna pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight). Obě zmiňované technologie umožňují široké spektrum aplikací v mikrobiologické diagnostice.

V přednášce budou představeny aplikace dvou moderních technologií, které již v řadě laboratoří zaujímají nepostradatelné místo. Jedná se o:

- 1) využití MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie pro funkční testy v klinické mikrobiologii, včetně detekce mechanismů antibiotické rezistence;
- 2) sekvenování nové generace, především s ohledem na molekulárně-epidemiologické analýzy infekčních agens.

V naší laboratoři se od roku 2010 zabýváme vývojem a aplikacemi nových diagnostických metod s využitím MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie, především v oblasti detekce klinicky významných β -laktamáz. V roce 2011 jsme vyvinuli metodu pro přímý průkaz karbapenemáz u příslušníků čeledi *Enterobacterales*. Metoda je založena na přímé detekci hydrolyzy molekuly karbapenemu. Čistá kultura podezřelého bakteriálního kmene je smíšena s puřem obsahujícím meropenem. Po inkubaci je u negativních vzorků ve výsledné směsi pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie detekována přítomnost nativní molekuly meropenemu. Zatímco u pozitivních vzorků jsou přítomny degradační produkty jeho hydrolyzy. Tato technika, používaná v řadě rutinních laboratoří, umožňuje získat informace o produkci klinicky a epidemiologicky závažných enzymů, karbapenemáz, během 3 hodin. V následném výzkumu jsme se zabývali vývojem dalších metod pro detekci markerů antibiotické rezistence. Podařilo se nám vyvinout a patentovat postup, který umožňuje detekovat proteiny periplasmového prostoru buněčné stěny u gramnegativních bakterií. V současné době pokračujeme ve vývoji dalších metod pro funkční mikrobiologickou diagnostiku.

Ve druhé části přednášky budou představeny metody sekvenování nukleových kyselin nové generace, které umožňují získat kompletní informace o bakteriálním genomu pro epidemiologické, ale i terapeutické účely. Budou uvedeny příklady využití celogenomové sekvenace u izolátů rezistentních k β -laktamovým antibiotikům (rezistence způsobená produkcí širokospektrých β -laktamáz a karbapenemáz) s cílem popsat epidemiologickou situaci v České republice.

Oba výše zmíněné metodologické přístupy lze efektivně zařadit do diagnostického procesu klinicko-mikrobiologické laboratoře. S jejich pomocí lze zkrátit čas pro uvolnění výsledku vyšetření citlivosti na antibiotika s ohledem na produkci β -laktamáz a sledovat mechanismy vzniku a cesty šíření antibiotické rezistence, včetně horizontálního přenosu genetické informace v bakteriálních populacích.

Vybrané publikace:

1. **Hrabák J.**, Walková R., Študentová V., Chudáčková E., Bergerová T. Carbapenemase Activity Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 2011: 3222–3227; DOI: 10.1128/JCM.00984-11, (IF 4,220, citací WoS: 184)
2. **Hrabák J.**, Chudackova E., Walkova R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: from Research to Routine Diagnosis. *Clinical Microbiology Reviews* 26, 2013: 103–114, DOI: 10.1128/CMR.00058-12 (IF 17,313, citací dle WoS: 156)
3. Skálová A, Chudějová K, Rotová V, Medvecký M, Študentová V, Chudáčková E, Lavicka P, Bergerova T, Jakubu V, Zemlickova H, Papagiannitsis CC, **Hrabák J.** Molecular characterization of OXA-48-like-producing Enterobacteriaceae in the Czech Republic: evidence for horizontal transfer of pOXA-48-like plasmids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 24;61(2). pii: e01889-16. doi: 10.1128/ AAC.01889-16. (IF 4,415, citací dle WoS: 27)