

Výskyt antibiotické rezistence u kmenů *E. coli* izolovaných z potravin

Bc. Jana Rozumková

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana ROZUMKOVÁ**
Osobní číslo: **T08816**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Výskyt antibiotické rezistence u kmenů E.coli izolovaných z potravin.**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Definice antibiotik a mechanismus jejich účinku.
2. Definice rezistence a mechanismy rezistence na antibiotika.
3. Charakteristika E. coli.
4. Metody stanovení citlivosti na antibiotika.

II. Praktická část

1. Izolace E. coli z potravin.
2. Stanovení citlivosti E. coli k vybraným antibiotikům diskovou difúzní metodou.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] LOCHMANN, O. Základy antimikrobní terapie, TRITON, Praha 1999.

[2] GÖRNER, F. VALÍK, L. Aplikovaná mikrobiologie požívatin, 1. vydání, Malé centrum, Bratislava 2004.

[3] <http://med.muni.cz/dokumenty/pdf/atb.pdf>.

[4] DEMNEROVÁ, K. a kol. Laboratorní cvičení z mikrobiologie, 3. vydání, VŠCHT, Praha 2001.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

4. ledna 2010

Termín odevzdání diplomové práce:

19. ledna 2010

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Bozumková Jovana

Obor: THEVP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 5.5.2010

Jana Bozumková

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přiměřeně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Escherichia coli je bakterie, která slouží jako indikátor fekálního znečištění nejen v potravinářství. Bohužel je také bakterií, která přispívá k šíření rezistence vůči antibiotikům. Antibiotická rezistence je jedním z vedlejších efektů chybného používání antibiotik. Rezistence mikroorganismů k antibiotikům je natolik vysoká, že se běžná antibiotika stávají prakticky nepoužitelná pro léčbu infekcí. Tato práce byla zaměřena na kmeny *E. coli* izolované z chlazené drůbeže a jejich identifikaci. Hlavním cílem práce bylo zjistit citlivost těchto kmenů *E. coli* ke 20 antibiotikům diskovou difúzní metodou. Jako doplněk byla u některých antibiotik stanovena minimální inhibiční koncentrace. Z výsledků vyplývá, že z 51 izolovaných kmenů bylo alespoň k jednomu antibiotiku rezistentních 5 % izolátů. 65 % kmenů vykazovalo rezistenci současně k pěti druhům antibiotik. U 5 % kmenů byla zaznamenána dokonce rezistence u 8 antibiotik najednou.

Klíčová slova: *Escherichia coli*, antibiotika, rezistence

ABSTRACT

Escherichia coli are bacteria, which are used as indicator of faecal contamination, not only in food-processing industry. However, they are also bacteria, which are supporting spreading of resistance against antibiotics. Microorganism resistance to antibiotics is starting to be un-usable for common infection treatment. The aim of this work was to isolate *E. coli* strains from chilled poultry and to identify them by different methods. The main goal of this work was to observe sensitivity of these strains *E. coli* to 20 antibiotics by disc diffusion method. As a supplement, minimum inhibitory concentrations of chosen antibiotics were determined. Results showed that from 51 isolated strains were 5% resistant to at least one antibiotic. 65% of strains showed resistance to 5 types of antibiotics. In 5% of strains were determined antibiotic resistance to 8 antibiotics.

Key words: *Escherichia coli*, antibiotics, resistance

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D., za rady, odborné vedení a zodpovězené dotazy týkající se dané problematiky.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 ANTIBIOTIKA	12
1.1 DEFINICE ANTIBIOTIK	12
1.2 MECHANIZMUS ÚČINKŮ ANTIBIOTIK	12
1.2.1 Inhibice syntézy buněčné stěny	12
1.2.2 Poškození syntézy plazmatické membrány	13
1.2.3 Inhibice proteosyntézy	13
1.2.4 Porucha syntézy nukleových kyselin	14
1.2.5 Inhibitory intermediárního metabolismu (kompetitivní inhibice)	15
2 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE	16
2.1 DEFINICE REZISTENCE	16
2.2 MECHANIZMUS REZISTENCE	16
2.2.1 Změna v místě působení antibiotika	16
2.2.2 Impermeabilita	17
2.2.3 Aktivní vypuzování antibiotika (eflux)	17
2.2.4 Produkce inaktivačních enzymů	17
3 ROZDĚLENÍ ANTIBIOTIK	19
3.1 BETA – LAKTAMOVÁ ANTIBIOTIKA	19
3.1.1 Peniciliny	19
3.1.2 Cefalosporiny	21
3.1.3 Monobaktamy a karbapenemy	22
3.2 AMFENIKOLY	22
3.3 TETRACYKLINY	22
3.4 MAKROLIDY	23
3.5 LINKOSAMINDY	24
3.6 AMINOGLYKOSIDY	24
3.7 PEPTIDY	25
3.8 GLYKOPEPTIDY	26
3.9 ANSAMYCINY	26
3.10 ANTIMIKROBNÍ CHEMOTERAPEUTIKA	26
3.10.1 Sulfonamidy	26
3.10.2 Chinolony	27
3.10.3 Ostatní	28
3.11 ANTITUBERKOLITIKA	29
3.12 ANTIMYKOTIKA, ANTIVIROTIKA A ANTIPARAZITIKA	29
4 METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI NA ANTIBIOTIKA	31

4.1	DIFÚZNÍ TESTY	31
4.1.1	Kvalitativní difúzní test.....	31
4.1.2	Kvantitativní difúzní test (Epsilon test).....	32
4.2	DILUČNÍ TESTY.....	33
5	CHARAKTERISTIKA <i>E. COLI</i>	35
II	PRAKTICKÁ ČÁST.....	39
6	CÍL PRÁCE.....	40
7	MATERIÁL A METODIKA.....	41
7.1	POMŮCKY A POUŽITÉ PŘÍSTROJE	41
7.2	PŮDY	42
7.3	METODY	43
7.3.1	Izolace kmenů <i>E.coli</i>	43
7.3.2	Identifikace <i>E.coli</i> pomocí biochemických mikrotestů	43
7.3.3	Identifikace <i>E. coli</i> metodou polymerázové řetězové reakce.....	44
7.3.4	Zjištění citlivosti kmenů <i>E. coli</i> na antibiotika diskovou difúzní metodou	47
7.3.5	Zjištění minimální inhibiční koncentrace antibiotik na vybrané kmeny <i>E.coli</i> pomocí mikrotitračních destiček Micronaut – S.....	48
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	50
8.1	IZOLACE KMENŮ <i>E.COLI</i>	50
8.2	IDENTIFIKACE <i>E. COLI</i> METODOU PCR	51
8.3	ZJIŠTĚNÍ CITLIVOSTI DISKOVOU DIFÚZNÍ METODOU.....	51
8.4	URČENÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE	57
	ZÁVĚR	60
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	61
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	66
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	67
	SEZNAM TABULEK	68

ÚVOD

Antibiotika jsou přirozené látky převážně produkované mikroorganismy potlačující nebo zcela inhibující růst jiných organismů. Antibiotika se v určité formě používala už ve starém Egyptě a Nubii. Jejich rozvoj nastal až po objevení penicilinu (látku vylučována plísní *Penicillium notatum*) skotským bakteriologem Alexandrem Flemingem v roce 1929. V současné době je známo přes 6000 látek s antimikrobním účinkem a jen kolem 70 z nich si našlo uplatnění v humánní a veterinární medicíně. Ostatní látky mají příliš velké nežádoucí účinky nebo jsou pro organismus toxické.

V roce 1940 byl popsán první enzym schopný destrukce penicilinu u kmenů *E. coli*. Tento poznatek byl prvním důkazem o existenci antibiotické rezistence a byl přehodnocen přístup k používání antibiotik. V následujících letech se problematika antibiotické rezistence stala vážným problémem v rozvojových i vyspělých zemích. Následně byly vypracovány zásady antibiotické terapie a omezeno používání antibiotik jako růstových stimulátorů. I přes tato opatření se ve světě pozoruje neustálé zvyšování rezistentních bakterií k antibiotikům, což představuje problém v epidemiologické praxi a při léčbě infekčních onemocnění. V některých případech je míra antibiotické rezistence mezi mikroorganismy natolik vysoká, že běžná antibiotika jsou pro léčbu infekcí prakticky nepoužitelná. To vede k častějšímu použití nových a dražších sloučenin, což vzápětí může vést k dalšímu vzniku rezistence na tyto nové léky a k nekončící snaze vyvinout nová a odlišná antibiotika pro udržení předstihu před infekcemi [43].

Kromě uváženého používání antibiotik je možné problém stále rostoucí antibiotické rezistence řešit především sledováním výskytu a rozšířením rezistentních bakterií.

Nejprve se hlavní zájem soustředil na patogenní bakterie. V současnosti se studium zaměřuje na šíření genů rezistence mezi nepatogenními střevními mikroorganismy, protože právě střevní trakt je hlavním zásobníkem rezistentních bakterií. Proto sledování antibiotické rezistence u indikátorových bakterií jako je *E. coli* mohou sloužit jako vhodné ukazatele vzniklé v důsledku podávání antibiotik.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ANTIBIOTIKA

1.1 Definice antibiotik

Slovo antibiotika pochází z řeckého „anti“, které znamená „proti“ a „bios“, což znamená „život“ [1]. Antibiotika jsou látky, které inhibují růst (množení) mikroorganismů (navozují bakteriostázu), nebo je usmrcují (působí baktericidně) [2]. Jiná definice uvádí, že antibiotika jsou látky produkované jedním mikroorganizmem selektivně inhibující růst jiného mikroorganismu [3]. Účinné jsou i syntetické nebo semisyntetické deriváty antibiotik. Ze širšího hlediska se k nim řadí i jiné antimikrobiální látky, tj. chemoterapeutika, což jsou syntetické substance [3].

1.2 Mechanismus účinků antibiotik

Mechanismus působení antimikrobních látek na bakteriální buňku vzhledem k jejich rozdílné chemické struktuře může být na různé úrovni a proto je můžeme rozdělit podle místa působení do čtyř skupin.

1.2.1 Inhibice syntézy buněčné stěny

Buněčná stěna je nezbytně nutná pro přežití mikroorganismů. Udržuje jeho tvar a zabezpečuje optimální nitrobuněčné prostředí. Její poškození (např. lysolem, detergenty) nebo inhibice tvorby některé z komponent vede k poruše její funkce až k lyzi buňky. To je možné zejména u grampozitivních bakterií [1]. Antibiotika se naváží na enzymy, které se podílejí na syntéze buněčné stěny bakteriální buňky a tím se bakteriální buňka přestane dělit [4].

Buněčná stěna bakterií nemá obdobu u buněk lidských tkání, a proto všechny látky, které ji poškozují, ničí, či zabraňují její tvorbě, mají obvykle vysoký stupeň toxicity. Pro člověka je proto většina těchto antibiotik málo toxických [5].

K antibiotikům vyvolávajícím inhibici buněčné stěny patří: bacitracin, cefalosporiny, cykloserin, peniciliny a vankomycin. Peniciliny a cefalosporiny (beta-laktamy) vazbou na PBP (penicilin vázající protein) blokují tvorbu peptidoglykanu [6]. Glykopeptidová antibiotika inhibují syntézu stěnového pentapeptidu. Bacitracin inhibuje přenos hotového stavebního bloku do buněčné stěny [4]. Cykloserin účinkuje v časně fázi syntézy buněčné

stěny. Cykloserin ovlivňuje syntézu buněčné stěny jednak tím, že kompetitivně inhibuje příslušné enzymy a kromě toho i tím, že je strukturálním analogem D-alaninu [5].

1.2.2 Poškození syntézy plazmatické membrány

Plazmatická membrána izoluje vnitřní prostředí buňky od vnějšího a má polopropustné vlastnosti [7]. Tvoří především osmotickou bariéru buňky. Ionty a metabolicky potřebné látky, jako jsou např. aminokyseliny, puriny, pyrimidiny a další, jsou pomocí této membrány koncentrovány uvnitř buňky [5].

Antibiotika poškozující syntézu plazmatické membrány mění permeabilitu buněčné stěny a tím způsobují ztrátu její osmotické celistvosti. Tato antibiotika obsahují hydrofilní a lipofilní oblasti. Vážou se na lipofilní součásti bakteriální buněčné stěny. Vodou, kterou s sebou nesou zvětšují povrch buňky dokud se membrána nezhroutí. Jejich efektivita závisí na množství fosfolipidů v buněčné membráně a jejich schopnosti pronikat stěnou buňky [4].

K preparátům vyvolávajícím poškození plazmatické membrány patří: peptidy (polymyxin, colistin a bacitracin) a antifugální polyenová antibiotika (amfotericin B a nystatin). Peptidy se váží na fosfolipidovou část plazmatické membrány gramnegativních bakterií, čímž dochází letálnímu zvýšení permeability. Bacitracin se váže na plazmatickou membránu grampozitivních bakterií a enormě zvyšuje únik iontů. Antifungální polyenová antibiotika se váží na steroly, které jsou přítomné pouze v membránách kvasinkovitých organismů a plísní [5].

1.2.3 Inhibice proteosyntézy

V aparátu proteosyntézy buněk bakteriálních a lidských tkání existují sice bazální podobnosti, ale také jisté odlišnosti, které jsou výchozím bodem selektivního působení. Tak např. bakteriální ribozomy mají sedimentační konstantu 70S a disociují na podjednotky 30S a 50S. Buňky vyšších organismů mají sedimentační konstantu 80S a podjednotky 40S a 60S [5]. Blokový ribozom se chybně uplatňuje v proteosyntéze – ukončení stavby proteinu, nebo se vytvoří chybná bílkovina (enzym). Účinek je tudíž bakteriostatický [6].

Mezi látky působící na syntézu bílkovin patří řada antibiotik s rozdílnou chemickou strukturou. Např. aminoglykosidy, chloramfenikol, tetracykliny, makrolidy a linkosamidy [8].

Aminoglykosidy (streptomycin, chloramfenikol, kanamycin, neomycin, gentamicin a další) se váží po průniku do bakteriální buňky na ribozomální 30S podjednotku. Bílkoviny vznikající pod vlivem aminoglykosydů jsou defektní, avšak vždy jen přesunutím jediné aminokyseliny. Efekt aminoglykosidů je relativně pomalý, což souvisí s tím, že musí dojít ke značné kumulaci nesprávného proteinu, než jsou zastaveny buněčné funkce.

Chloramfenikol se váže na 50S ribozomální podjednotku a blokuje enzym, který přenáší rostoucí peptidový řetězec k příští aminokyselině, jež má být připojena.

Tetracykliny se váží na 30S ribozomální podjednotku a blokují postup aminokyselin k ribozomům, kde tímto zásahem nedochází k jejich spojování [5].

Makrolidy (erytromycin, spiramycin) a linkosamidy (linkomycin a klindamycin) se váží na 50S ribozomální podjednotku a zabraňují interakci velké podjednotky s iniciačním komplexem a pravděpodobně také inhibují peptidyltransferázovou reakci [8].

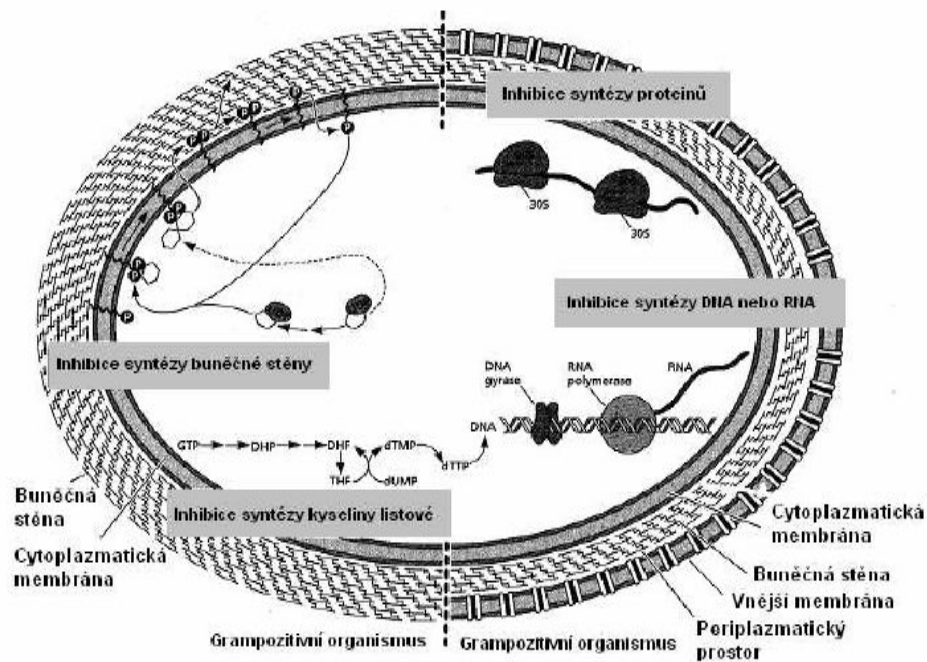
1.2.4 Porucha syntézy nukleových kyselin

Některé preparáty mohou narušovat syntézu nukleových kyselin v různých fázích jejich výstavby [5]. Zasahují do replikace nebo transkripce DNA [4]. Vzhledem k tomu, že tyto procesy jsou jen minimálně odlišné od buněk bakteriálních a vyšších organismů, mají tyto preparáty poměrně velkou toxicitu.

K těmto preparátům řadíme: rifampicin, kyselinu nalidixovou a oxolinovou, fluorochinolony (ofloxacin, ciproflaxim), trimetoprim, antivirové preparáty a protinádorová chemoterapeutika [5]. Chinolová antibiotika inhibují DNA gyrázu a tím potlačují rozvolnění DNA během replikace [4]. Rifampicin blokuje iniciaci transkripce tím, že se váže na RNA - polymerázu [8].

1.2.5 Inhibitory intermediárního metabolismu (kompetitivní inhibice)

Kyselina paraaminobenzoová (PABA) tvoří nezbytnou součást koenzymu kyseliny listové. Vyšší organismy nedovedou syntetizovat kyselinu listovou a jsou závislé na jejím přísunu zvenčí, zatímco bakterie ji syntetizují [5]. Bakteriální syntézu kyseliny listové inhibují sulfonamidy [4]. Bakterie které nesyntetizují kyselinu listovou, nejsou inhibovány sulfonamidy a jsou tedy primárně rezistentní [5].



Obrázek 1: Mechanizmy účinku antibiotik [18].

2 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE

2.1 Definice rezistence

Rezistenci bakterie k antimikrobnímu přípravku lze definovat jako schopnost bakteriální populace přežít účinek inhibiční koncentrace příslušného antibiotika [16]. Světová zdravotnická organizace definuje rezistenci jako schopnost bakteriální populace přežít účinek inhibiční koncentrace příslušného antimikrobního preparátu [16].

Rozlišujeme dva základní typy rezistence:

Rezistence primární odpovídá geneticky podmíněné necitlivosti bakterií na dané antibiotikum bez ohledu na předchozí kontakt s antibiotikem (aminoglykosidy v monoterapii nepůsobí na anaerobní infekce) [2].

Rezistence sekundární je daleko závažnějším medicínským problémem. Znamená, že původně citlivá bakteriální populace se během léčby antibiotikem stane vůči tomuto preparátu rezistentní. Vzniká nejčastěji při dlouhodobé a nekontrolované léčbě antibiotiky nebo při nevhodné antibiotické profylaxi [5].

Sekundární rezistence má dva typy:

- a) penicilinový typ (multiple step mutation) vzniká po dlouhodobém podávání některých antibiotik - např. penicilinu, chloramfenikolu, bacitracinu;
- b) streptomycinový typ (one step mutation), s rychlým vznikem vysoce rezistentních kmenů je znám u streptomycinu, erytromycinu, linkomycinu, rifampicinu [2].

2.2 Mechanismus rezistence

2.2.1 Změna v místě působení antibiotika

Většina antibiotik působí na metabolické pochody tím, že se vážou na proteiny bakteriální buňky. V těchto případech zcela postačí změny v lokusu nukleové kyseliny, na které dochází k vazbě antibiotika. Receptorové místo je tudíž pozměněné, což má za následek rezistenci k příslušnému antibiotickému preparátu [5].

2.2.2 Impermeabilita

Antibiotikum se může transportovat do bakteriální buňky pomocí přenašeče. Změnou molekul takového přenašeče se zabrání průniku antibiotika do buňky. Při aktivním transportu je potřeba značné energie. Mutací nebo plazmidy může být ovlivněna tvorba ATP, což má za následek snížení až úplné zastavení transportu antibiotik do buňky. V případě, že nedojde k transportu antibiotika do buňky, může dojít naopak k eliminaci. Předpokládá se, že v buňce dochází k enzymatické reakci, která způsobuje inhibici antibiotika. Tato reakce je blokována rezistentními izoenzymy [5].

2.2.3 Aktivní vypuzování antibiotika (efflux)

U rezistentních bakterií je rychlá exkrece antibiotika spojena s produkcí membránových bílkovin. To platí např. pro bílkoviny nazývané Tet, které vypuzují antibiotikum z buňky. K tomu typu rezistence náleží rezistence vůči tetracyklinu, některým chinolonům, ale i některým dezinfekčním prostředkům a těžkým kovům. Zdá se, že tento typ rezistence je mnohem častější, než se původně předpokládalo [17].

2.2.4 Produkce inaktivačních enzymů

Rezistentní kmeny produkují enzymy, které buď štěpí, nebo substituují molekuly antibiotika a činí je neúčinnými. K nejvíce prostudovaným enzymům patří beta-laktamázy. Jde o enzymy, které jsou nejčastěji odpovědné za rezistenci vůči betalaktamovým antibiotikům, u kterých vyvolávají hydrolyzu betalaktamového kruhu. Jsou produkovány jak gram pozitivními, tak i gram negativními mikroorganismy. Většinou jsou umístěny na R-plazmidech, ale i na chromozomu [5].

Tabulka 1: Přehled mechanismů rezistence na nejčastěji používaná antibiotika [1].

Antibiotikum	Mechanismy rezistence
beta-laktamová	produkce beta-laktamáz ↓ permeability buněčné stěny změna penicilin-vazebných proteinů
aminoglykosidy a makrolidy	snížená vazebnost na ribozómy

	↓ permeability buněčné stěny produkce inaktivujících enzymů
chloramfenikol	↓ vazebnosti na cílové ribozómy ↓ permeability buněčné stěny ↑ aktivity chloramfenikol-acetyltransferázy
tetracykliny	↓ transport k ribozómům aktivní buněčný eflux (vylučování antibiotika z buňky)
chinolony	rezistence DNA-gyrázy ↓ permeability buněčné stěny aktivní buněčný eflux
sulfonamidy trimetoprim	rezistence syntetázy kyseliny listové rezistence reduktázy kyseliny dihydrolistové ↓ permeability buněčné stěny

Zkřížená rezistence znamená současnou necitlivost mikroorganismů na antibiotika, která mají podobnou chemickou strukturu a stejný mechanismus účinku. Při oboustranně zkříženém typu rezistence na jedno antibiotikum znamená rezistenci i na antibiotikum druhé (penicilin G a V nebo tetracykliny navzájem). Při jednostranně zkříženém typu rezistence může být citlivost bakterií vůči jednomu z antibiotik zachována (meticilin a penicilin G – stafylokoky rezistentní na penicilin G nemusí být rezistentní na meticilin; meticilin-rezistentní stafylokoky jsou zcela určitě rezistentní na penicilin G) [15].

3 ROZDĚLENÍ ANTIBIOTIK

V dnešní době existuje již mnoho druhů antimikrobních preparátů, které je možno použít v klinické praxi. Z praktického hlediska se zdá být nejjednodušší rozdělit je podle chemické příbuznosti, protože antimikrobní preparáty téže nebo podobné chemické struktury mívají:

- a) obdobné spektrum účinnosti;
- b) zkříženou rezistenci (úplnou nebo částečnou);
- c) shodný výskyt nežádoucích účinků [2].

3.1 Beta – laktamová antibiotika

Charakteristickým strukturním rysem těchto antibiotik je beta–laktamový kruh kondenzovaný s heterocyklem – např. thiazolidinem (peniciliny), dihydrothiazinem (cefalosporiny a cefamyciny) a thiazolinem (penemy) [12]. V terapeutických koncentracích je účinek baktericidní [2].

Mechanismus poškození buněčné stěny:

1. připojení na penicilin-vazebné proteiny (PBP);
2. inhibice syntézy buněčné stěny přerušением transpeptidace peptidoglykanu (peptidoglykan je polymer, dodávající bakteriím jejich tvar a tuhost);
3. aktivace enzymů působících lyticky na buněčnou stěnu [14].

3.1.1 Peniciliny

Účinkují na buněčnou stěnu pouze ve stádiu růstu. Čím rychlejší růst bakterií, tím lépe účinkují. Proto je vhodné léčbu těmito antibiotiky zahájit co nejrychleji po nástupu klinických příznaků. Naopak u chronických infekcí, kdy se buňky původce téměř nemnoží, může dojít k jejich přežití [14].

Penicilin G (benzylpenicilin)

Získává se kultivací plísně *Penicillium chrysogenum* ve vhodné tekuté půdě. Poněvadž je jako kyselina nestabilní, docíljuje se stability při výrobě převedením do sodné či draselné soli. V kyselém prostředí ztrácí rychle stabilitu [5]. Je lékem první volby v léčbě infekcí způsobených: pneumokoky, streptokoky, meningokoky, gonokoky a stafylokoky

neprodukující beta-laktamázu, *Bacillus anthracis* a jiné grampozitivní mikroorganismy, *Treponema pallidum* a jiné spirochety, klostridia, *Actinomyces*, *Listeria monocytogenes* a *Bacteroides* (s výjimkou *B. fragilis*), některé borelie. Citlivé jsou i některé anaeroby [2].

Je rovněž rychle rozkládán enzymem betalaktamázu – penicilinázou, který je produkován některými bakteriemi, především stafylokoky, ale i některými druhy *Proteus*, dále *E.coli*, *P. aeruginosa* a *M. tuberculosis* [5].

Penicilin G je dostupný ve třech formách. Jako vodný roztok krystalického benzylpenicilinu. Dále jako prokain-benzylpenicilin suspenze. Prokain zvyšuje velikost molekuly a tím prodlužuje absorpci i přetrvávání plazmatických koncentrací. A nakonec jako benzatin-benzylpenicilin suspenze s velmi nízkou rozpustností ve vodě. Velmi pomalu se absorbuje, dosahuje nízkých plazmatických koncentrací, které dlouho přetrvávají (až 10 dní). Je vhodný k doléčení akutní nazofaryngitidy způsobené beta-hemolytickými streptokoky, a to jako prevence revmatické horečky [2].

Penicilin V (fenoxymetylpenicilin)

Penicilin V má prakticky shodné antimikrobní spektrum s penicilinem G [2]. Je to orální preparát odolávající kyselině chlorovodíkové v žaludku [5].

Antistafylokokové peniciliny

Jsou odolné vůči stafylokokovým betalaktamázám. Jako první byl do praxe zaveden meticilin (použitelný pouze parenterálně, byl tradičně využit laboratorně k průkazu rezistence stafylokoků), byl nahrazen acidorezistentními izoxazolyl deriváty. Mezi ně patří oxacilin, cloxacilin, dicloxacilin. Podávají se perorálně u méně závažných stafylokokových infekcí [2].

Širokospektré peniciliny

Řadíme mezi ně aminopeniciliny (ampicilin, amoxicilin), protistafylokokové (oxacilin, methicilin), karboxypeniciliny (carbenicilin, ticarcilin), acylureidopeniciliny (azlocilin, piperacilin) [4]. Ampicilin je jedno z nejdéle používaných antibiotik. Jeho dlouhodobá a někdy paušální podávání však vedla především u gramnegativních tyčků k značnému nárůstu rezistence [5]. Při aplikaci je nutná kombinace s kyselinou klavulánovou nebo sulbaktamem, které zajišťují ochranu před destrukcí beta-laktamázy [4].

3.1.2 Cefalosporiny

Základem jejich molekuly je kyselina 7-aminocefalosporánová [14]. Mají široké spektrum antibakteriální působnosti, jsou baktericidní a vykazují velmi nízkou toxicitu vůči makroorganismu [5]. Jedná se o dipeptidová antibiotika biogeneticky odvozená od cysteinu a valinu [12].

Cefalosporiny se distribuují extracelulárně (jako beta-laktamy). Některé z nich pronikají v dostatečném množství přes hemoencefalickou bariéru (cefotaxim, ceftriaxon, cefuroxim, ceftazidim) a mohou se používat k léčbě meningitid (zánět zvyšuje propustnost bariéry). Cefalosporiny pronikají také placentou. Přesto jsou s nimi dobré klinické zkušenosti při používání v těhotenství. Naopak vylučování do žluči není časté (jen ceftriaxon a cefoperazon) [2].

I. generace cefalosporinů má poměrně úzké spektrum proti grampozitivním bakteriím, zejména stafylokokům včetně těžkých infekcí (endokarditid). Na gramnegativní mikroorganismy působí méně. Enterokoky, meticilin-rezistentní stafylokoky a *Staphylococcus epidermidis* jsou rezistentní. Řadí se sem cefalotin, cefazolin a cefapirin [2].

II. generace cefalosporinů má širší antibakteriální spektrum. Preparáty jsou účinné na kmeny *Proteus* indolpozitivní, dále řadu enterobakterů, serací a anaeroby. Jsou odolnější vůči beta-laktamázám [5]. Patří sem např. cefamandol, cefuroxim, cefoxitin [13].

III. generace cefalosporinů se vyznačuje širokým spektrem účinnosti ovšem s relativně nižším účinkem na grampozitivní mikroorganismy. Odolnost vůči beta-laktamázám je vysoká, ikdyž ne absolutní [5]. Řadíme sem cefotaxim, ceftriaxon, ceftozoxim, ceftazidim, cefoperazon, cefsulodin, cefodizim [14].

IV. generace cefalosporinů zahrnuje antibiotika zaváděna do terapie v poslední době. Je účinná jak na grampozitivní bakterie, tak na enterobakterie včetně *Pseudomonas aeruginosa* i na gramnegativní tyčky necitlivé na cefalosporiny III. generace. Počítá se s nimi v léčbě závažných smíšených infekcí u nemocných s jiným těžkým onemocněním (imunodeprese, neutropenie). Patří sem cefpirom a cefepim [2].

3.1.3 Monobaktamy a karbapenemy

Monobaktamy postrádají ve své chemické struktuře jak thiazolidinový, tak dihydrothiazolový kruh. Jejich jádro tvoří pouze substituovaný laktamový kruh. Patří sem aztreonam, který je odolný vůči všem známým beta – laktamázám [5].

Působí na aerobní gramnegativní bakterie, vůbec nepůsobí na grampozitivní bakterie [14].

Možnost indukce stafylokokových a enterokokových superinfekcí [13]. Superinfekce je infekce, která se rozvíjí v průběhu jiné, již probíhající nákazy. Na jejím vzniku se podílí oslabení organismu předchozí infekcí, ale někdy také léčba infekce (antibiotika mohou kromě působení na choroboplodný zárodek narušit i rovnováhu mezi mikroorganismy s následným pomnožením dosud neškodných druhů) [38].

Karbapenemy v sobě spojují účinek penicilinů a širokospektrých cefalosporinů, pokrývají téměř celé spektrum bakterií. První klinicky užívaný karbapenem byl imipenem. Využití samotného imipenemu se ukázalo neúčelné, protože je v ledvinách odbouráván. Proto se kombinuje s inhibitorem daného enzymu-cilastatinem (v poměru 1:1), čímž se zvyšují plazmatické koncentrace antibiotika a zároveň se snižuje jeho toxicita [2].

3.2 Amfenikoly

Řadí se mezi ně chloramfenikol a thiamfenikol. Chloramfenikol je silný inhibitor syntézy mikrobiálních proteinů. Váže se reverzibilně na receptorové místo 50S podjednotky bakteriálního ribozomu [2]. Má široké spektrum účinnosti zahrnující grampozitivní i gramnegativní mikroorganismy. Je bakteriostatický, primární toxicita je nízká a při opakovaném podání může vyvolat těžké poruchy krvetvorby. Chloramfenikol byl prvním antibiotikem se širokým spektrem účinnosti. Spektrum účinnosti zahrnuje: *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria gonorrhoeae* a *N. meningitidis*, bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus influenzae*, yersinie, pasteurely, chlamydie, borelie, anaerobní mikroorganismy a další. Rezistence na toto čistě bakteriostatické antibiotikum je poměrně častá [5].

3.3 Tetracykliny

Tetracykliny produkované houbami rodu *Streptomyces* a jsou deriváty částečně hydrolyzovaného naftalenu. Jedná se o antibiotika se širokým spektrem účinku [12].

Tetracyklin a příbuzné látky se váží na ribozomální podjednotku 30S a blokují přístup aminokyselin k ribozomům, kde tímto zásahem nedochází k jejich spojování [14].

Vstupují do mikroorganismu pasivní difúzí a také aktivním mechanismem. Navzájem se liší farmakokinetickými vlastnostmi a citlivostí mikroorganismů [2]. Základní charakteristikou je, že mají široké antibakteriální spektrum zahrnující grampozitivní i gramnegativní mikroorganismy, mykoplazmata, chlamydie a některá protozoa. Jsou primárně bakteriostatická, dobře se vstřebávají ze střevního traktu. Jejich toxicita je poměrně nízká. Mají však řadu nežádoucích jevů, z nichž dominují gastrointestinální poruchy, diskolorace zubů a nově tvořených kostí apod. [5].

Rozdělují se na:

- základní (I. generace) – tetracyklin, oxytetracyklin, chlortetracyklin
- modifikované – rolitetracyklin
- novější (II. generace) – doxycyklin, minocyklin, lymecyklin, metacyklin, thiacyklin [5].

Tetracykliny jsou léky volby u infekcí způsobených *Mycoplasma pneumoniae*, chlamydiemi, rickettsiemi, některými spirochetami. U smíšených infekcí: sinusitidy, bronchitidy, infekce močových či žlučových cest, u brucelózy, tularémie, infekce vyvolané listeriemi a u akné (doxycyklin 100 mg/den) [2].

3.4 Makrolidy

Makrolidy jsou charakterizovány polyfunkčním makrocyclickým laktonovým kruhem (obsahujícím obvykle 14 až 16 atomů), ke kterému jsou připojeny cukry [12].

Váží se na 50S podjednotku ribozomů a inhibují tvorbu peptidů [2]. Mají relativně úzké spektrum účinnosti zahrnující především grampozitivní bakterie včetně kmenů rezistentních na peniciliny. Dále působí dobře na neisserie, legionelly, kampylobaktery, některé anaeroby a *Toxoplasma gondii*. Jsou primárně bakteriostatické, všechny preparáty se dobře vstřebávají z trávicího traktu. Toxicita makrolidů je velmi nízká. Pouze vysoké dávkování vykazuje určitý stupeň hepatotoxicity [5].

Rozdělují se na základní a modifikované. Mezi základní se řadí erytromycin, spiramycin, oleandomycin. A mezi modifikované – roxitromycin, josamycin, azitromycin a claritromycin, diritromycin [5].

3.5 Linkosamidy

Inhibují syntézu proteinů, působí bakteriostaticky [2]. Základní charakteristikou je, že spektrum účinnosti zahrnuje grampozitivní bakterie a anaerobní mikroorganismy. Jsou primárně bakteriostatické, jsou primárně bakteriostatické, dobře se vstřebávají ze střevního traktu, výborně pronikají do tkání a vykazují velmi nízkou toxicitu. Mezi linkosamidy řadíme dva hlavní preparáty: linkomycin a klindamycin [5].

Linkomycin a jeho derivát klindamycin jsou především antistafylokoková antibiotika. Působí i na *Bacteroides* a jiné anaeroby. Rezistence vzniká zvolna asi mutací u streptokoků, stafylokoků a pneumokoků. Linkosamidy jsou málo toxické [2].

3.6 Aminoglykosidy

Jsou to bazické oligosacharidy obsahující speciální aminocukry - aminocyklitolový kruh. Inhibují proteinové syntézy na 30S subjednotce ribozomu – interference s vazbou formylmetionyl-tRNA [13].

Mají široké spektrum účinku zahrnující jak grampozitivní, tak i gramnegativní mikroorganismy. Jsou baktericidní, ze zažívacího traktu se téměř nevstřebávají a je nutné je aplikovat pouze parenterálně. Mají výrazný toxický efekt na makroorganismus (neurotoxicita a nefrotoxicita).

Rozdělují se na:

- klasické aminoglykosidy (streptomycin, neomycin, kanamycin);
- moderní (silně účinné aminoglykosidy (gentamicin, netilmicin, tobramycin a amikacin);
- bakteriostatické aminoglykosidy (spektinomycin) [5].

Streptomycin je nejdůležitější antituberkulotikum, účinkuje na *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* a některé gramnegativní bakterie. Naopak streptokoky a pneumokoky jsou vůči němu relativně odolné. Vysoce rezistentní vůči streptomycinu jsou anaerobní

sporulující bakterie. Váže se nespecificky na molekuly DNA, RNA, bílkoviny, ale i povrch buňky. Neomycin a kanamycin jsou baktericidní, účinkují na gramnegativní tyčky s výjimkou *Pseudomonas aeruginosa*. Neomycin se používá lokálně [14].

3.7 Peptidy

Nízkomolekulární proteiny a oligopeptidy ovlivňující v organismu řadu funkcí. Prakticky veškerá peptidová antibiotika bývají poměrně rezistentní vůči působení proteolytických enzymů; tato skutečnost je obvykle důsledkem přítomnosti nepřírodních strukturních elementů. Peptidová antibiotika obsahují aminokyseliny, které se obvykle v živočišných a rostlinných proteinech nevyskytují [12]. Spektrum antibakteriálního účinku je dáno charakterem preparátu (polymyxiny na gramnegativní bakterie, bacitracin na grampozitivní bakterie). Jsou baktericidní, nevstřebávají se ze střevního traktu- užívají se hlavně lokálně. Jsou značně toxické [5].

Polymyxin je účinný na gramnegativní bakterie, má baktericidní účinek. Byl izolován z *Bacillus polymyxa*. Tyrotricin působí na již vytvořené plamazitické membrány, je tedy nezávislý na růstové fázi bakterií v organismu. Tento a podobné látky se užívají lokálně (masti zásypy). Jsou účinné na grampozitivní a anaerobní bakterie, mohou vyvolávat toxické a alergické reakce.

Bacitracin účinkuje na grampozitivní bakterie včetně pyogenních streptokoků, na něž účinkuje relativně nejlépe, a patogenní druhy rodu *Neisseria*. Je nefrotoxický, používá se lokálně, nejčastěji ve směsi s neomycinem jako preparát Framykoin. V mikrobiologii se používá bacitracinový test na odlišení *Streptococcus pyogenes* od jiných podobně rostoucích streptokoků [14].

Polymyxiny jsou baktericidní vůči gramnegativním mikroorganismům. Působí jako detergenty, tj. porušují osmotické vlastnosti bakteriální membrány a její transportní mechanismy.

Kolistin metansulfonát je méně nefrotoxický. Kolistin se z lékové formy pomalu uvolňuje ve tkáních hydrolyzou. Dominantní je u pseudomonádových infekcí, kde je vysoce účinný. [2].

3.8 Glykopeptidy

Jsou to heptapeptidy s cukernou složkou. Zapříčiňují inhibici syntézy buněčné stěny – brání zesíťování peptidoglykanu působí baktericidně. Spektrum účinku zahrnují grampozitivní bakterie včetně meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), *E. faecalis*, *C. difficile* [13]. Mezi glykopeptidy patří antibiotika vankomycin a teikoplanin [5].

3.9 Ansamyciny

Antibakteriální spektrum ansamycinů je dosti široké. Postihuje grampozitivní i gramnegativní bakterie, *Mycobacterium tuberculosis*, chlamydie, legionely a rickettsie. Jsou baktericidní. Dobře se vstřebávají ze střeva a mají nízkou toxicitu.

Z dosti široké palety preparátů se využívá pouze rifampicin a rifabutin.

Ansamyciny mají nepříznivý typ rezistence, tj. fakultativní jedno- i více stupňový, takže by neměly být podávány nikdy samotné, ale jen v kombinaci s jiným vhodným preparátem např. s makrolidy, linkosamidy, aminoglykosidy a trimetoprimem pokud jde o antimikrobní terapii [5].

3.10 Antimikrobní chemoterapeutika

V současné době existuje celá řada rozmanitých strukturálních typů chemoterapeutik používaných k léčbě bakteriálních infekcí. K nejvýznamnějším patří především sulfonamidy a chinolony [12].

3.10.1 Sulfonamidy

Jedná se o strukturální analogy kyseliny paraaminobenzoové (PABA), se kterou soutěží o vazbu na enzym, který ji inkorporuje do kyseliny listové. Syntéza kyseliny listové je pro mikroorganismy esenciální (naproti tomu eukaryotické buňky ji nesyntetizují, mají schopnost ji přijmout v hotové formě). Výsledkem je bakteriostatický účinek sulfonamidů. Růst mikroorganismů může být obnoven jakmile je sulfonamid z vazby vytěsněn [2]. Mají široké antibakteriální spektrum, jsou bakteriostatické, většinou se dobře vstřebávají ze střevního traktu a mají velmi nízkou toxicitu [5]. Použití nacházejí u některých grampozitivních a gramnegativních bakterií, chlamydií, nokardií, i některých protozoí [13].

Podle doby účinku rozeznáváme krátkodobé, které se aplikují po 4-6 hodinách (představitelem je sulfisoxazol), střednědobé, které se podávají po 12 hodinách (sulfametoxazol), dlouhodobé (tj. 24 hodin, např. sulfametoxidin) a s velmi dlouhou dobou účinku (sulfadoxin – preventivně používán pro profylaxi a léčbu malárie) [2].

K nejpoužívanějším druhům patří kombinovaný lék Cotrimoxazol. To je trimetoprim + sulfonamid 1:5 [6] který nalezneme v Biseptolu či Septrinu. Je to lék užívaný k léčbě infekcí močových cest, sinusitid, kapavky u pacientů přecitlivělých na beta-laktamová antibiotika, nokardiózy, shigelózy a k léčbě břišního tyfu [2].

Všechny původně citlivé druhy bakterií nyní vykazují různou četnost a různý stupeň rezistence na sulfonamidy. Tato změna byla nejdříve pozorována u gonokoků, teprve o hodně později též u meningokoků. Rovněž často byla pozorována necitlivost u streptokoků a pneumokoků, dosti běžná je dnes u gramnegativních střevních tyčinek. Všechny sulfonamidy mají téměř úplnou zkříženou rezistenci [5].

3.10.2 Chinolony

Tato skupina farmak byla zavedena do klinické praxe koncem 60. let 20. století. Jedná se o inhibitory DNA gyrázy [12].

Chinolonová chemoterapeutika jsou primárně baktericidní látky, které lze podle antibakteriální aktivity, průniku do tkání a šířky antibakteriálního spektra rozdělit do 4 generací. Všem je společný mechanismus účinku, tj. inhibice bakteriální gyrázy, enzymu zodpovědného za správné splétání a rozplétání řetězců bakteriální nukleové kyseliny v průběhu G fáze buněčného cyklu [2].

Chinolony 1. generace (kyselina nalidixová, oxolinová) a 2. generace (kyselina pipemidová, norfloxacin, rosoxacin) působí především na gramnegativní mikroorganismy [2]. Můžeme je také charakterizovat jako nefluorované chinolony. Mají úzké antimikrobní spektrum účinku zahrnující především enterobakterie a účinných koncentrací dosahují pouze v moči [5].

Mechanismus účinku kyseliny oxolinové spočívá v letální desynchronizaci bakteriálního metabolismu způsobené inhibicí včleňováním do DNA, zatímco syntéza RNA a bílkovin probíhá nerušeně dále. Rezistence na tento preparát vzniká poměrně rychle a někdy i během první léčby [5].

Chinolony 3. generace zahrnují léčiva se širokým antibakteriálním spektrem. Patří mezi ně: ciprofloxacin, pefloxacin, enoxacin, ofloxacin, fleroxacin, lomefloxacin [1].

Fluorované chinolony – fluorochinolony mají široké antimikrobní spektrum, baktericidní účinek, výhodnou farmakokinetiku a dobrý účinek i na intracelulárně uložené mikroorganismy [5].

Jsou účinné proti grampozitivním (s výjimkou pneumokoků) i gramnegativním mikroorganismům (včetně *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. a *Pseudomonas aeruginosa*). Dále působí na chlamydie, mykoplazmata a *Mycobacterium tuberculosis*. Na rozdíl od zástupců 1. generace po perorálním podání vytvářejí v krvi a tkáních dostatečné hladiny pro baktericidní působení [2].

Fluorované chinolony (chinolony 4. generace) s rozšířeným spektrem účinku (sparfloxacin, trovafloxacin, grepafloxacin, clinafloxacin, levofloxacin) mají rozšířené antimikrobní spektrum především na grampozitivní mikroorganismy a anaeroby [5].

Sparfloxacin působící na řadu multirezistentních mikroorganismů, např. na pneumokoky penicilin rezistentní, meticilin rezistentní stafylokoky, vankomycin rezistentní stafylokoky a enterokoky. Účinkuje také na některé rezistentní anaerobní mikroorganismy. Je proto používán výhradně jako rezervní antibiotikum [2].

3.10.3 Ostatní

Nitroimidizolová chemoterapeutika

Patří mezi ně metronidazol, ornidazol a tinidazol [2]. Narušují mikrobiální DNA [13]. Mají výrazný antiparazitární účinek a velmi dobrý efekt proti anaerobům [5].

Do jejich indikačního spektra patří *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* a *Giardia lamblia*. Dále se používá pro terapii sepse v chirurgii a v dalších chirurgických oborech, zejména jsou-li původci anaerobní mikroorganismy (*Bacteroides* sp.) [2].

Nitrofurany

Inhibují proteosyntézu - blokuje zahájení translace [13]. Nitrofurany působí bakteriostaticky až baktericidně na patogeny grampozitivní i gramnegativní řady. *Pseudomonas aeruginosa* a *Proteus mirabilis* jsou primárně rezistentní [2]. Rezistence vzniká snadno, a to i během léčby jednoho pacienta [5].

Pyrimidiny

Působí na stejném metabolickém řetězci jako sulfonamidy, ale na jiném místě. Inhibuje enzym reduktázu kyseliny dihydrolistové, což se promítne při syntéze bakteriální DNA.

Patří mezi ně trimetoprim. Je to chemoterapeutikum s relativně širokým antibakteriálním spektrem. Po orálním podání dosahuje sérových hladin, které jsou schopny inhibovat růst těchto důležitých bakterií: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, pneumokoků, viridujících streptokoků, *H. influenzae*, *E. coli*, *Proteus* sp., klebsiely, enterobakterů, shigel, salmonel. Mezi rezistentní patří *M. tuberculosis*, klostridia, patogenní neisserie a *P. aeruginosa* [5].

3.11 Antituberkolika

Antituberkulotika tvoří samostatnou skupinu antibiotik a chemoterapeutik [5]. V současné době začíná být tuberkulóza opět závažným problémem. V posledních letech stále narůstá počet případů této choroby. Kromě toho mají mykobaktriální infekce tendence k chronickému průběhu a ke vzniku rezistence na používaná léčiva. Proto se obvykle používá kombinovaná terapie tj. současné nasazení několika léčiv. K antituberkulotikům „první linie“, kterými se obvykle zahajuje léčba TBC, patří isoniazid, pyrazinamid, ethambutol, a antibiotika streptomycin a rifampicin [12]. Antituberkulotika druhé řady, kam zahrnujeme léky s nižší účinností a vyšší toxicitou řadíme: ethioamid, cykloserin, kapeomycin, viomycin, kanamycin, amikacin [5].

3.12 Antimykotika, antivirotika a antiparazitika

Antimykotika dnes představují poměrně rozsáhlou skupinu léků, které se bouřlivě rozvíjejí. Antimykotika jsou relativně nesourodou skupinou preparátů, které mají jednak povahu antibiotickou (polyenová antimykotika a griseofulvin, který je získán z penicilinu), jednak povahu čistě chemickou (azoly a ostatní). V humánní praxi se z řady preparátů osvědčily především nystatin, primaricin, amfotericin B a ambisom [5]. Mezi azolová antimykotika se řadí léčiva Clotrimazol (Canesten- je příliš toxický, podává se pouze místně), Mikonazol (daktarin), ketokonazol (Nizoral podáván u slabších mykóz), lukonazol a itrokonazol [2].

Antivirová chemoterapeutika představují látky, které mohou zasahovat do různých fází replikace viru. Tím ovšem významně postihují i buňky makroorganismu, z čehož pramení i

relativně velký výskyt nežádoucích účinků [5]. Zejména v posledních letech probíhá intenzivní výzkum v souvislosti s hledáním farmak účinných proti viru HIV [14]. V současné době se v klinické praxi používají tyto preparáty: idoxuridin, acyklovir, ganciklovir, foscarnet, amantadin a rimantadin, vidarabin, enviroxim, metisazon, interferony a další [5].

Do skupiny antiparazitárních léků řadíme jednak preparáty rostlinného původu, dále antibiotika, ale převážně jde o léčiva připravená chemickou cestou [5]. Mezi antiprotozoika patří např. chinin, emetin, suramin, chinolony, antibiotika (tetracykliny, spiramycin, klindamycin, amphotericin), chemoterapeutika (sulfonamidy, kotrimoxazol, imidazoly) a další [14].

4 METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI NA ANTIBIOTIKA

Hodnocení antimikrobiálního účinku se provádí in vitro stanovením minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) [1]. MIC udává minimální inhibiční koncentraci, což je nejmenší naměřené množství (koncentrace) antibiotika, které inhibuje růst a množení bakterií v testovacím mediu [9]. MBC udává minimální baktericidní koncentraci, což je nejmenší množství antibiotika, které nedovolilo přežití ani jediné buňce z původního inokula [5].

4.1 Difúzní testy

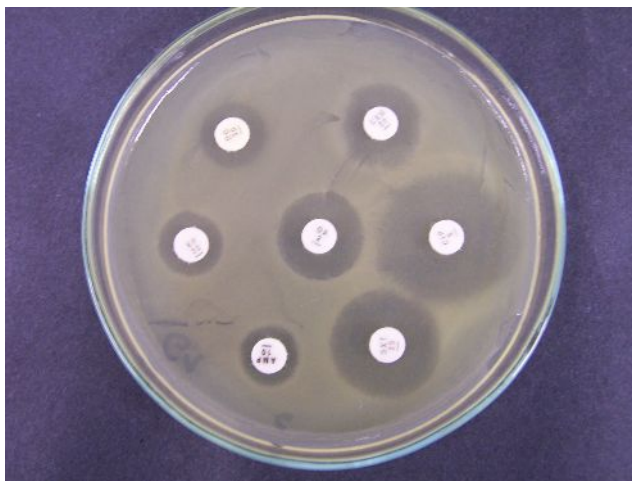
Principem je, že antibiotikum difunduje kontinuálně z vhodného zdroje (nosiče) do agarové půdy za tvorby tzv. gradientu difúze. S tímto gradientem difúze přichází do styku mikroorganismus nanesený v daném množství na agarovou živnou půdu nebo do ní zalitý. Během inkubace dochází k růstu bakterií až do inhibiční koncentrace gradientu difúze antibiotika; jakmile je jí dosaženo, přestává viditelný růst bakterií a dochází k vytvoření tzv. inhibiční zóny v okolí zdroje antibiotika [5].

4.1.1 Kvalitativní difúzní test

Je nejrozšířenější a nejjednodušší test, který ale za standardizovaných podmínek poskytuje velmi cenné údaje o citlivosti či rezistenci kmene [5].

Disková difúzní metoda je standardním postupem. Na povrch Petriho misky s vhodnou živnou půdou se rovnoměrně naočkuje testovaný mikroorganismus. Papírové disky napuštěné známými koncentracemi různých antibiotik se přiloží na povrch agaru. Během následné inkubace antibiotika difundují z papíru do agaru a jejich koncentrace ve směru od okraje disku postupně slábne. Účinné antibiotikum vytvoří kolem disku průzračnou zónu bez nárůstu buněk [10]. Velikost zón je ovlivněna složením média, pH média, hloubkou agaru, velikostí a rychlostí růstu inokula, koncentrace antibiotik v disku, počet disků na plotně, inkubační teplota, složení inkubační atmosféry, dobou inkubace a způsobem měření zón [11]. Koncentrace antibiotika na okraji zóny představuje minimální inhibiční koncentraci. Pro vyhodnocení se udává průměr zóny v mm. Jelikož rychlost difúze hodně

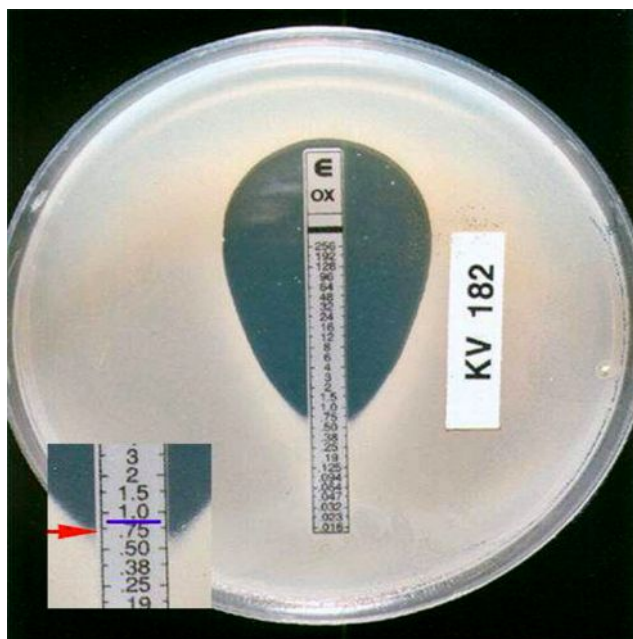
závisí na typu půdy, užívá se v klinické mikrobiologii Mueller – Hintonův agar, který umožňuje dobrou difúzi a srovnání výsledků mezi jednotlivými laboratořemi [10].



Obrázek 2: Ukázka misky s Mueller-Hintonovou půdou s antibiotickými disky a inhibičními zónami.

4.1.2 Kvantitativní difúzní test (Epsilon test)

Je proveditelný za přesně definovaných podmínek. Předpokladem je, že známe kvantitativní hodnoty koncentračního gradientu jednotlivých antibiotik. Takové zjišťování však zatím naráží na značné technické i ekonomické obtíže a slouží především pro epidemiologické účely. V praxi je proto dáována přednost kvantitativním testům solučním. V současné době byl vypracován tzv. Epsilon test. Na textačním proužku jsou nastaveny vzestupné koncentrace zkoušeného antibiotika. Proužek se přiloží na inokulovanou agarovou plotnu a za 24 hodin se odečítá koncentraci antibiotika u hodnoty, u které nám končí inhibiční zóna [5]. V místě protěti zóny s papírkem je MIC [6].



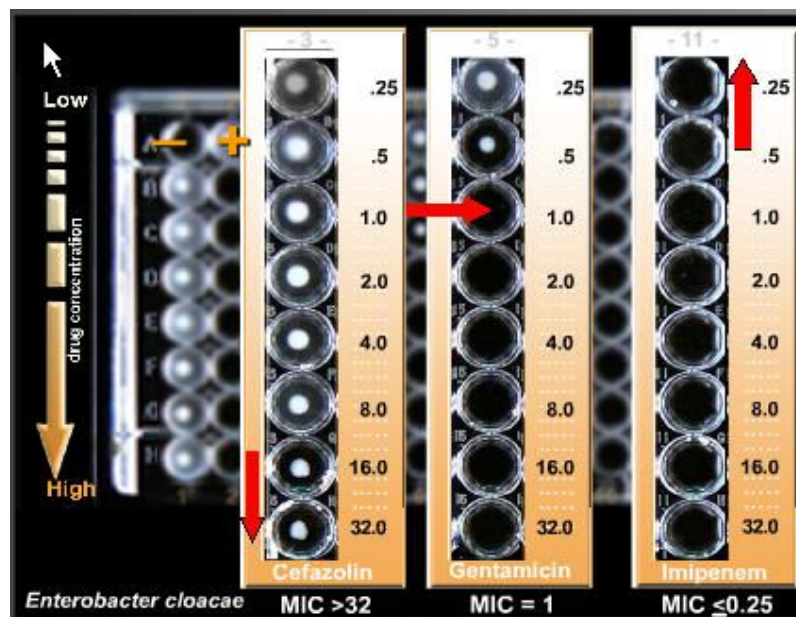
Obrázek 3: Ukázka praktického provedení Epsilon testu [6].

4.2 Diluční testy

Slouží ke kvantitativnímu stanovení citlivosti. Principem je, že antibiotikum je v odstupňované koncentraci (obvykle geometrickou řadou) přidáno do série vhodných tekutých či tuhých půd; koncentrační gradient je tedy v tomto případě diskontinuální.

Do každé nádoby je potom přidáno standardní inokulum čisté kultury testovaného kmene. Po inkubaci se zjišťuje, v jakém nejmenším množství antibiotika (vztaženo na 1 ml půdy) došlo k viditelné zástavě růstu bakteriální populace. Tato hodnota udává MIC daného antibiotika vůči testovanému kmeni. Založením subkultur z nádobek bez viditelného růstu zjistíme nejmenší množství antibiotika, které nedovolilo přežití ani jedné buňce z původního inokula. Tato hodnota udává MBC [5].

Minimální inhibiční koncentrace antibiotika určuje citlivost kvantitativně. V jamkách jsou napipetovány bujón a ředěná antibiotika [4]. V současné době je nejrozšířenější diluční mikrometoda za použití mikrotitračních destiček na jedno použití. Plnění destiček se provádí automatickými multikanálovými pipetami o 12 nebo 96 kanálech. Jednotlivé jamky v destičce se naplní 100 μ l testované půdy s příslušnými koncentracemi antimikrobních látek. Po 18 – 20hodinové inkubaci odečítáme pomocí zrcátka nebo fotometru [5].



Obrázek 4: Ukázka zjištění MIC pomocí mikrotitrační destičky [6].

5 CHARAKTERISTIKA *E. COLI*

E. coli, patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*, je nejprozkoumanějším bakteriálním druhem. Slouží jako modelový mikroorganismus pro genetické a biochemické studie. Jsou to gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky [22]. Nesporulující, fermentující laktózu za tvorby kyseliny mléčné, kyseliny octové, CO₂ a H₂ [23]. Kmeny *E. coli* se nachází v dolní části trávicího traktu člověka a teplokrevných zvířat. Přítomnost v potravinách je tedy ukazatelem fekálního znečištění. Některé kmeny jsou patogenní způsobující nejen průjmová onemocnění [22]. Je komenzálem, saprofytem a také symbiontem, protože svým působením znemožňuje průnik patogenů produkcí kolicinů, které jsou pro některé jiné bakterie toxické. Zároveň je pro makroorganismus prospěšná i přímo díky tvorbě některých vitaminů, především vitamínu K [37].

Na *E. coli* byla prokázána bakteriální konjugace a replikace DNA, do jeho genomu byly vneseny geny pro nejrůznější látky jako je lidský inzulin či interferon a geny kódující antigeny jiných mikrobů pro přípravu rekombinantních vakcín. V posledních letech se rovněž používá jako indikátor výskytu rezistence k antimikrobiálním látkám v různých typech prostředí [37].

E. coli je podmíněný patogen. Při oslabení lidského organismu a při poklesu jeho přirozené odolnosti hlavně u kojenců a starých lidí může nastat onemocnění způsobené invazivními sérovary *E. coli* [23]. Mezi tyto kmeny se řadí skupiny:

- **Enteropatogenní *E. coli* (EPEC)** jsou spojovány s onemocněním novorozenců získané především v nemocničním prostředí. Nejběžnější jsou antigenní typy O55, O126 a O86.
- **Enteroinvazivní *E. coli* (EIEC)** disponují faktory invazivity a vyvolávají onemocnění připomínající bacilární dyzenterii.
- **Enterotoxigenní *E. coli* (ETEC)** vyvolávají průjmy v oblasti tropů a subtropů s nízkým hygienickým standardem. Onemocnění vyvolaná tímto typem se označují jako tzv. cestovatelské průjmy.
- **Shiga toxin produkující *E. coli* (STEC, také VTEC, EHEC)** způsobují nejzávažnější onemocnění. Vyvolávají hemoragickou kolitidu a hemolyticko-

uremický syndrom (HUS). Nejčastější jsou antigenní typy O157 a mezi EPEC dříve řazený antigenní typ O26 [24].

V posledních letech je zaznamenán vysoký nárůst rezistence bakteriálních patogenů člověka a zvířat [26]. Frekvence výskytu rezistentních izolátů se v jednotlivých zemích odlišuje. Výskyt rezistentních bakterií souvisí s použitím antimikrobiálních látek u člověka nebo zvířete, ze kterého byl rezistentní kmen získán. Bylo prokázáno, že aplikace určitého antibiotika vede k selekci bakterií rezistentních k této antimikrobiální látce [28]. Podle mnoha studií jsou sulfonamidy, streptomycin, tetracyklin a ampicilin antimikrobiální látky, u kterých bylo zjištěno vysoké procento patogenních i nepatogenních kmenů *E. coli* získaných ze zvířat, potravin a člověka rezistentních [30].

Bylo prokázáno, že antibiotická rezistence izolátů *E. coli* získaných z prasat a drůbeže je mnohem vyšší než rezistence izolátů ze skotu a souvisí s nadměrnou aplikací antibiotik v chovech prasat a drůbeže [27].

Vysoký výskyt rezistentních nepatogenních bakterií je dokumentován u mléčného a masného skotu [31]. Byla prokázána rezistence k tetracyklinu u 33 % zkoumaných kmenů, k sulfonamidům u 20 %, ampicilinu a streptomycinu u 16 % kmenů *E. coli* získaných z dojnic [32]. Rezistence k ampicilinu, streptomycinu, sulfonamidům a tetracyklinu se nejčastěji vyskytuje u 20 – 22 % izolátů *E. coli* pocházejících ze skotu [33]. Byl zaznamenán vysoký výskyt nepatogenních izolátů *E. coli* rezistentních k ampicilinu, kyselině nalidixové a tetracyklinu získaných z potravin (přibližně u 50 % izolátů). U nepatogenních izolátů *E. coli* z vepřového masa byla zaznamenána i poměrně vysoká rezistence k sulfonamidům [34].

Patogenní bakterie *E. coli* O157 byla na celém světě dlouho považována za citlivou k mnoha antimikrobiálním látkám. Na počátku 80. let se rezistence vyskytovala pouze u 1 – 3 % izolátů těchto bakterií, ale od konce 80. let je dokumentován nárůst antibiotické rezistence. Současné studie dokazují vysokou prevalenci rezistence a výskyt multirezistence u *E. coli* O157 izolovaných ze zvířat, potravin i lidí [35], které jsou způsobené častou aplikací antibiotik u potravinových zvířat, především skotu, který je hlavním rezervoárem *E. coli* O157. Antibiotická rezistence se vyskytuje u 7 – 70 % izolátů *E. coli* O157 získaných ze skotu [36].

U izolátů STEC O157 byl oproti jiným sérotypům STEC prokázán nižší výskyt antibiotické rezistence. Zajímavým je rovněž nižší výskyt rezistence u izolátů STEC ve srovnání s patogenními *E. coli* bez produkce Shiga toxinu [29].

Tabulka 2: Citlivost izolátů *E. coli* na antibiotika v České republice v průběhu let 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007 a 2008 [25].

rok			Antibiotikum			
			aminoglykosidy	aminopeniciliny	fluorochinony	cefalospor.3.gen.
2001	Počet	S	1106	666	1079	1140
		R	70	491	95	27
	Procenta (%)	S	94,0	57,6	91,9	97,7
		R	6,0	42,4	8,1	2,3
2002	Počet	S	1493	869	1421	1566
		R	94	718	165	19
	Procenta (%)	S	94,1	54,8	89,6	98,8
		R	5,9	45,2	10,4	1,2
2003	Počet	S	1671	964	1531	1739
		R	94	802	233	20
	Procenta (%)	S	94,7	54,6	86,8	98,9
		R	5,3	45,4	13,2	1,1
2004	Počet	S	1868	4041	1652	1932
		R	1966	1965	1965	1965
	Procenta (%)	S	95,0	53,0	84,1	98,3
		R	5,0	47,0	15,9	1,7
2005	Počet	S	2095	1112	1781	2183
		R	139	1122	452	50
	Procenta (%)	S	93,8	49,8	79,8	97,8
		R	6,2	50,2	20,2	2,2

2006	Počet	S	1965	951	1639	2040
		R	177	1193	494	109
	Procenta (%)	S	91,7	44,4	76,8	94,9
		R	8,3	55,6	23,2	5,1
2007	Počet	S	2234	1064	1825	2229
		R	173	1343	581	178
	Procenta (%)	S	92,8	44,2	75,9	92,6
		R	7,2	55,8	24,1	7,4
2008	Počet	S	2501	1096	2024	2468
		R	237	1642	712	270
	Procenta (%)	S	91,3	40,0	74,0	90,1
		R	8,7	60,0	26,0	9,9

Aminoglykosidy = Gentamycin nebo Tobramycin

Aminopeniciliny = Ampicilin, Amoxicilin, Piperacilin nebo Ticarcilin

Fluorochinony = Ciprofloxacin, Ofloxacin, Levofloxacin, Pefloxacin nebo Norfloxacin

Cefalosporiny 3. generace = Cefotaxim, Ceftazidim, Ceftriaxon nebo Ceftizoxim

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL PRÁCE

Tato diplomová práce byla v praktické části zaměřena na:

- izolaci kmenů *E. coli* ze vzorků drůbeže a vepřového masa;
- identifikaci *E. coli* pomocí biochemických mikrotestů a metodou PCR;
- určení citlivosti izolátů *E. coli* k antibiotikům diskovou difúzní metodou;
- určení minimální inhibiční koncentrace u vybraných kmenů *E. coli*.

7 MATERIÁL A METODIKA

Pro izolaci kmenů *E. coli* byla použita chlazená drůbeží křídla, krutí biskupy a chlazené vepřové nožičky zakoupené v tržní síti. A to u prodejců RACIOLA-JEHLIČKA s.r.o.

ve zlínské podnikové prodejně, Řeznictví a uzenářství Josef Filák v podnikových prodejnách ve Zlíně a Uherském Hradišti.

7.1 Pomůcky a použité přístroje

- běžné laboratorní sklo a pomůcky,
- antibiotické disky (Oxoid Ltd., Velká Británie),
- souprava mikrotestů ENTEROtest 24 (PLIVA – Lachema Diagnostika s.r.o. Brno, Česká republika),
- parní sterilizátor VARIOKLAV 75S, 135S (H+P Labortechnik, Německo),
- biologický inkubátor (Mettler, Německo),
- předvážky KERN 440-47N (Kern, Německo),
- termocykler PTC 100 MJ Research (Bio-Rad, USA),
- termoblok Bio TDB-100 (Biotech, Česká republika),
- termostat BT120 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika),
- elektroforetické zařízení model B1A (OWL Separation Systems, Inc., USA),
- UV-transluminátor - dokumentační systém pro elektroforézu (Biotech, Česká republika),
- digitální fotoaparát PowerShot G6 (Canon, Japonsko),
- Denzitometr DENZI-LA-METEREMO (Lachema, Česká republika),
- Microplate leader Tecan, SUNRISE s SW Magellan, verze 3,11(Tecan, Australia),
- mikrotitrační destičky Micronaut S (Merlin, Německo).

7.2 Půdy

Masopeptonový agar (MPA)

Agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie).....	15 g
Masový výtažek (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie).....	10 g
Pepton (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie).....	10 g
NaCl (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod).....	5 g
Destilovaná voda.....	1000 ml

MPB

Masový výtažek (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie).....	3 g
Pepton (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)	5 g
NaCl (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod).....	3 g
Destilovaná voda.....	1000 ml

Endo agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)

Používá se pro detekci a rozlišení laktóza-pozitivních a laktóza-negativních koliformních bakterií.

Živná půda.....	41,5 g
Destilovaná voda.....	1000 ml

Mueller Hinton agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)

Půda používaná pro stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám diskovou difúzní metodou.

Živná půda.....	38,0 g
Destilovaná voda.....	1000 ml

Mueller Hinton bujón (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)

Bujón používaný k inkubaci při stanovení MIC pomocí mikrotitračních destiček.

Živná půda.....	21,0 g
Destilovaná voda.....	1000 ml

Fyziologický roztok

NaCl (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod).....	8,5 g
Destilovaná voda.....	1000 ml

Příprava půd:

Jednotlivé složky půd byly postupně naváženy a rozpuštěny v příslušném množství destilované vody. Připravené půdy byly sterilovány v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min. Půdy byly rozlévány do sterilních Petriho misek nebo zkumavek.

7.3 Metody**7.3.1 Izolace kmenů *E.coli***

Do 100 ml fyziologického roztoku bylo sterilně přeneseno asi 10 g kůže z daného vzorku. Dále byl vzorek protřepáván po dobu 30 minut. Z takto připraveného vzorku bylo provedeno desítkové ředění (do zkumavky bylo nepipetováno 4,5 ml fyziologického roztoku a 0,5 ml vzorku po třepání) a dále pak pipetováno 100 µl na Petriho misky s Endovým agarem.

Byla provedena inkubace při 37 °C po dobu 18 – 24 hodin. Jako pozitivní nález *E. coli* byly identifikovány kolonie s typickým kovovým leskem.

7.3.2 Identifikace *E.coli* pomocí biochemických mikrotestů

Pro upřesnění sporně vyhlížejících kolonií vyrostlých na Endově agaru byly provdny mikrotesty. Z čisté 24 hodinové kultury byla připravena suspenze ve fyziologickém roztoku o 1. stupni McFarlandovy zákalové stupnice. Dále byla připravena souprava ENTEROtestu

24 sejmutím hliníkové fólie a vložením do prázdného rámečku. Suspenze byla důkladně homogenizována a bylo inokulováno 0,1 ml do všech 24 jamek. Dále bylo k testům na sirovodík, lysin, indol, ornithin, ureázu a arginin přidáno po dvou kapkách sterilního parafinového oleje. Destička s enterotesty byla vložena do polyethylenového sáčku a vloženy do termostatu při 37 °C a bylo inkubováno po dobu 24 hodin. Po inkubaci bylo provedeno zhodnocení reakcí. Nejprve byla zakápnuta jamka pro test idolu zakápnuta činidlem pro indol a jamka pro test acetoninu činidly pro VPT I a VPT II a destička byla ponechána ještě 30 minut inkubovat při 37 °C. Po uplynutí této doby byla zakapána jamka pro test fenylalaninu činidlem pro fenylalanin. Dále byly odečteny výsledky reakcí podle barevné srovnávací stupnice a výsledky byly zaznamenány do formuláře pro záznam výsledků. Identifikace byla provedena pomocí počítačového identifikačního programu TNW Lite 6.5.

7.3.3 Identifikace *E. coli* metodou polymerázové řetězové reakce

Princip polymerázové řetězové reakce (PCR)

V této práci byla bakterie *E. coli* identifikována pomocí metody PCR. Bylo využito páru primerů LZL 389 a LZR 653 [39].

Těmito primery (Tab. 3) je detekována oblast genu *lacZ* (264 bp), který kóduje enzym β -galaktosidázu.

PCR je metoda, která slouží k amplifikaci DNA úseků *in vitro* za pomoci enzymu DNA-polymeráza. DNA-polymeráza je schopná syntetizovat komplementární vlákno podle templátu jednovláknové DNA tak, že přidává k existujícímu úseku druhého vlákna nové nukleotidy ve směru 5' > 3'. Kromě templátového vlákna a deoxynukleotidtrifosfátů (dNTP) jsou nutné krátké úseky druhého vlákna (oligonukleotidy), tzv. primery. Primery nasedají na templátovou DNA a určují od kterého místa a kterým směrem (od 3'-konce primeru) má DNA-polymeráza začít syntetizovat komplementární vlákno (extenze - prodlužování primeru přidáváním dalších nukleotidů). Podle jednoho templátového vlákna tímto způsobem vznikne jen jedna kopie, takže nedojde k žádnému řetězovému hromadění produktu. To je v PCR zajištěno použitím dvou primerů, které nasedají na komplementární sekvence ve dvou templátových vláknech. Templátová vlákna vznikají denaturací původně

dvouvláknové DNA. Primery na tato vlákna nasedají v protisměrné orientaci, takže po opakovaných cyklech denaturace, nasedání primeru a extenze primeru DNA-polymerázou vznikají produkty, které slouží jako templáty pro nový reakční cyklus [20]. Z jednoho fragmentu se po opakování tohoto procesu vytvoří dva nové úseky DNA. Po opakování 21 cyklů se může s jednoho úseku DNA amplifikovat i přes jeden milion kopií [21].

Ke třídění molekul DNA se používá nejčastěji agarózová gelová elektroforéza. Agarózový gel se připravuje vylitím roztoku agarózy do připravené formy s hřebínkem. Po ochlazení a gelifikaci agarózy je hřebínek vyjmut z gelu a gel vyjmut z formičky, takže zůstává plátek gelu s jamkami po vyjmutém hřebínku. Tento gel je umístěn do elektroforetické vany a zalit elektroforetickým pufrům. Vzorky DNA je pak potřeba vpravit do jamek v gelu, které jsou již v této chvíli pod hladinou pufru. Pak je možné uzavřít elektrický okruh připojením ke stabilizovanému zdroji napětí - od té chvíle probíhá elektroforéza a molekuly DNA se pohybují rozdílnou rychlostí podle své velikosti [20].

Jako DNA matrice pro provedení PCR byl použit vzorek připravený z 1-2 kolonií daného kmene *E. coli* ve 20 μl sterilní vody. Homogenizovaný vzorek byl tepelně ošetřen v termobloku (95 $^{\circ}\text{C}/20$ min) z důvodu rozbití buněčných stěn, úplné denaturace DNA, inaktivaci kontaminujících proteáz a ke zvýšení citlivosti reakce.

Příprava 25 μl PCR reakční směsi

Komponenty na jednu reakci přidávané v následujícím pořadí:

sterilní destilovaná voda	18,9 μl ;
ThermoPol pufr (NEB, Velká Británie)	2,5 μl ;
dNTP směs (Jena Bioscience, Německo)	0,5 μl (12,5 mmol/l každého);
primer LZL 653 (Invitrogen, USA)	0,5 μl ;
primer LZR 389 (Invitrogen, USA)	0,5 μl ;
<i>Taq</i> DNA-polymeráza (NEB, Velká Británie)	0,1 μl ;
templátová DNA	2,0 μl .

Tabulka 3: Sekvence použitých primerů [38].

Název primeru	Sekvence primeru 5'-3'	Velikost PCR produktu (bp)
LZL-389	ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC	264
LZR-653	GGTTTATGCAGCAACGAGACGTCA	

Provedení PCR reakce

Všechny složky PCR směsi byly promíchány a vloženy do termocykleru s vyhříváním víkem PTC 100 MJ Research. Termocykler byl spuštěn podle předem nastaveného programu:

denaturace (hot start).....95 °C/5 min;

poté následovalo 35 cyklů:

denaturace.....92 °C/1 min;

připojení primerů.....52 °C/30 s;

syntéza řetězce DNA.....72 °C/30 s.

Po proběhnutí 35 cyklů proběhla ještě závěrečná extenze při 72 °C/5 min.

Detekce PCR produktu agarózovou gelovou elektroforézou

Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézou

TAE pufr (Tris-acetátový pufr):

TRISMA-base (Sigma, USA).....121 g

0,5 M EDTA (pH 8, Lach. – Ner. s.r.o., Neratovice).....50 ml

ledová kyselina octová (Lachema a.s., Brno).....28,55 ml

Jednotlivé složky byly doplněny destilovanou vodou do 0,5 l a roztok byl vysterilizován při 121 °C 15 minut.

Nanášecí pufr:

bromfénolová modř (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)10 mg

10% SDS (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo).....600 µl

glycerol (PENTA, Ing, Petr Švec, Chrudim)..... 1,2 ml

Vše bylo doplněno do 10 ml destilovanou vodou.

Příprava 1% agarózového gelu na velkou elektroforézu:

2 g agarózy bylo rozvařeno v 200 ml 1x TAE pufru v mikrovlnné troubě. Nechal se ochladit asi na 60 °C a bylo přidáno 10 µl etidium bromidu (do výsledné koncentrace 0,5 µg/ml) a nalito do připravené elektroforetické vaničky s hřebínky. Gel se nechal půl hodiny ztuhnout při pokojové teplotě a byly vyjmuty hřebínky.

Příprava 1% agarózového gelu na malou elektroforézu:

Postup je stejný jako u předchozího gelu, jen bylo naváženo jiné množství reagensů. A to 0,5 g agarózy, 50 ml 1x TAE pufru a 3,5 µl etidium bromidu (do výsledné koncentrace 0,5 µg/ml).

Nanášení vzorků na gel a dokumentace:

Na gel bylo nanášeno 15 µl PCR produktu spolu se 3 µl nanášecího pufru. Takto připravená směs byla nanášena do komůrek zprava doleva a do poslední komůrky byl nanášen 100 bp DNA standard (NEB, Velká Británie). Následně byla spuštěna elektroforéza, malá vanička při 80 V a velká při 110 V. Elektroforéza byla ukončena po doputování barvičky do 2/3 gelu. DNA fragmenty byly vizualizovány UV světlem na UV transluminátoru, výsledek byl dokumentován pomocí digitálního fotoaparátu.

7.3.4 Zjištění citlivosti kmenů *E. coli* na antibiotika diskovou difúzní metodou

Z čisté kultury bakterií byla kličkou nanášena kolonie do zkumavek se sterilním MPB a bylo inkubováno při 37 °C po dobu 18-24 hodin. Po inkubaci byla namíchána suspenze která odpovídá zákalu 1. stupně McFarlanda. Tato suspenze byla pipetována (250 µl) na povrch Mueller – Hintonova agaru a rovnoměrně rozetřena hokejkou. Poté byly aplikovány sady antibiotických disků na povrch půdy. Kultivace probíhala při 37 °C/18 – 24 hodin. Po kultivaci byly měřeny hraniční zóny a naměřené výsledky byly srovnávány s doporučenými standardy.

Byly použity 3 sady disků s antibiotiky.

První sada (G1): ampicilin (AMP)-10 µg, cafalotin (KF)-30 µg, doxycyklin (DO)-30 µg, cefuroxim (CXM)-30 µg, ciprofloxacim (CIP)-5 µg, sulfametazol/trimetoprim (SXT)- 25 µg, kys. oxolinová (OA)-2 µg.

Druhá sada (G2): gentamicin (CN)-10 µg, cefotaxim (CTX)-30 µg, ceftazidim (CAZ)-30 µg, amoxicilin/klavulanát (AMC)-30 µg, aztreonam (ATM)-30 µg, chloramphenikol (C)-30 µg, colistin (CT)-10 µg.

Třetí sada (G3): amikacin (AK)-30 µg, cefoperazon/sulbaktam (SCF)-105 µg, piperacilin/tazobaktam (TZP)-110 µg, cefepim (FEP)-30 µg, imipenem (IPM)-10 µg, meronem (MEM)-10 µg.

7.3.5 Zjištění minimální inhibiční koncentrace antibiotik na vybrané kmeny *E.coli* pomocí mikrotitračních destiček Micronaut – S.

Čisté kultury *E. coli* staré 18 – 24 hodin byly odebrány do fyziologického roztoku, homogenizovány a poté byl změřen jejich zákal aby odpovídal 0,5 stupně McFarlandovi stupnice. Poté bylo pipetováno 50 µl bakteriální suspenze do 11 ml Mueller-Hintonova bujónu. Dále bylo pipetováno 100 µl do každé jamky označené destičky. Destička byla uzavřena aluminiovou folií a vložena inkubovat do termostatu při 37°C po dobu 18 – 24 hodin. Bylo provedeno vyhodnocení na spektrofotometru Tecan po 20 sekundovém protřepání a 5 minutovém ustálení při vlnové délce 600 nm.

Byla použita tato antibiotika: amoxicilin/klavulanát (AMOX/CLAV), ampicilin (AMP), apramycin (APRA), cefquinom (CEQU), ceftiofur (CETF), cafalotin (CELO), clindamycin (CLIN), colistin (CST), enrofloxacin (ENRO), erytromycin (ERY), florfenicol (FLOR), gentamicin (GEN), neomycin (NEO), penicilin G (PEN), spectinomycin (SPEC), tetracyklin (TET), tiamulin (TIA), tilmicosin (TIL), sulfametazol/trimetoprim (SULF). Použité koncentrace antibiotik jsou uvedeny v tabulce (Tab. 4).

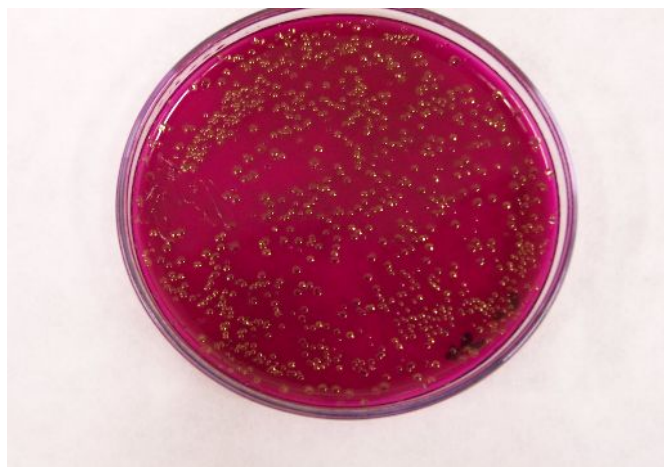
Tabulka 4: Přehled jamek s antibiotiky a jejich koncentrace.

Katalog-Nr.	Kategorie	Bezeichnung										MERLIN	
E1-931-200	V	MICRONAUT-S Mastitis 2										Diagnostika	
Layout												Aktualisierungsdatum: 22.08.2006	
2 Tests												Druckdatum: 12.02.2007	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	GC	GC	PEN 0,125	PEN 0,25	PEN 0,5	PEN 1	PEN 2	PEN 4	PEN 8	AMP 4	AMP 8	AMP 16	
B	CEZ 4	CEZ 8	CEZ 16	CEZ 32	CPZ 2	CPZ 4	CPZ 8	CPZ 16	CEQ 1	CEQ 2	CEQ 4	CEQ 8	
C	OXA 1	OXA 2	OXA 4	PIR 1	PIR 2	PIR 4	ERY 0,125	ERY 0,25	ERY 0,5	ERY 1	ERY 2	ERY 4	
D	AMC 4/2	AMC 8/4	AMC 16/8	AMC 32/16	GEN 2	GEN 4	GEN 8	GEN 16	MAF 0,25	MAF 0,5	MAF 1	MAF 2	
E	GC	GC	PEN 0,125	PEN 0,25	PEN 0,5	PEN 1	PEN 2	PEN 4	PEN 8	AMP 4	AMP 8	AMP 16	
F	CEZ 4	CEZ 8	CEZ 16	CEZ 32	CPZ 2	CPZ 4	CPZ 8	CPZ 16	CEQ 1	CEQ 2	CEQ 4	CEQ 8	
G	OXA 1	OXA 2	OXA 4	PIR 1	PIR 2	PIR 4	ERY 0,125	ERY 0,25	ERY 0,5	ERY 1	ERY 2	ERY 4	
H	AMC 4/2	AMC 8/4	AMC 16/8	AMC 32/16	GEN 2	GEN 4	GEN 8	GEN 16	MAF 0,25	MAF 0,5	MAF 1	MAF 2	

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

8.1 Izolace kmenů *E. coli*

Ze 140 zkoumaných vzorků masa bylo izolováno 51 kmenů *E. coli*. Izolace *E. coli* byla provedena aplikací vzorků na Endův agar, což je selektivní půda obsahující laktózu pro detekci koliformních bakterií a bazický fuchsin pro selekci grampozitivních bakterií. *E. coli* zkvašují laktózu a na Endově půdě tvoří kolonie typické svým kovovým leskem (Obr. 5).



Obrázek 5: Nárůst kolonií *E.coli* na Endově agaru.

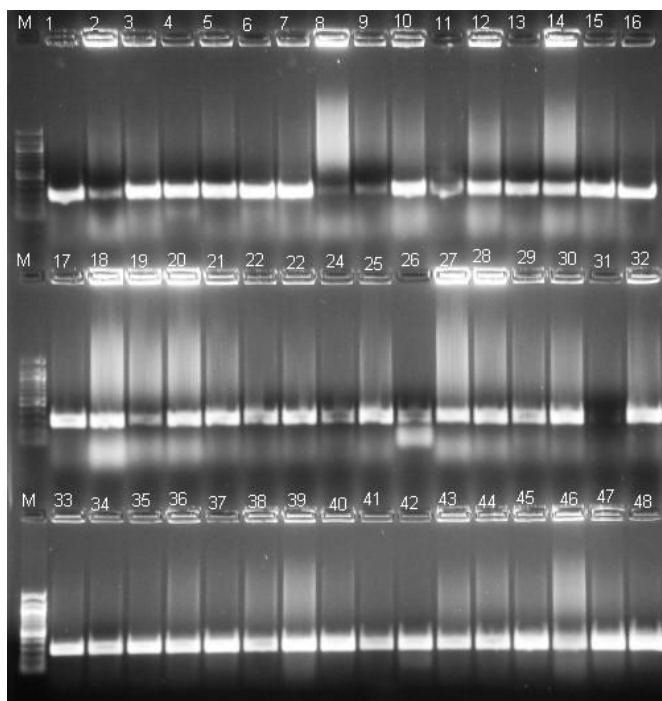
Dále u 13 izolovaných kolonií u kterých na Endově agaru nebylo patrné zda se jedná o *E. coli* byly provedeny ENTEROtesty a tím byly vyřazeny 4 kmeny u kterých nebylo prokázáno, že se jedná o *E. coli* (Obr. 6).

MIKROTEST®		Datum/Date/Дата		Zprac./Sprac./Ref./Идент. номер		PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o. Karásek 1 621 33 Brno, CZ		
ENTEROtest 24		Kmen č./Kmen č./Strain No./Идентификация		Poznámky/Notes/Примечания				
17								
	H	G	F	E	D	C	B	A
1	IND +	H2S -	LYS +	ORN +	URE -	ARG +	SCI -	MAL -
2	PH2 -	ONP +	INO -	ADO -	CEL -	SUC -	TRE +	MAL +
3	VPT -	ESL +	SOR +	RHA -	MLB +	RAF +	DUL -	GLU +
								=Profil/Профиль/Профиль
Dodatkové testy/Additional tests/Дополнительные тесты				Identifikace/Identifikácia/Identification/Идентификация				
				<i>E. coli</i> Valný slovník identifikace				

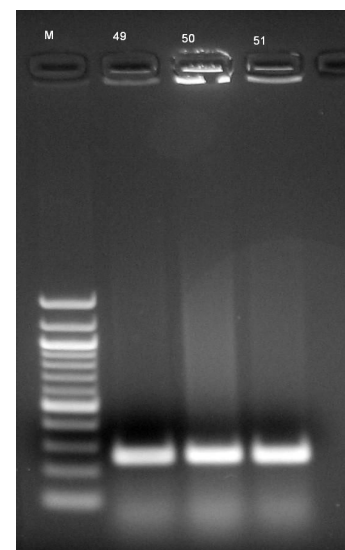
Obrázek 6: Záznamový arch s výsledky enterotestu.

8.2 Identifikace *E. coli* metodou PCR

Byla provedena identifikace metodou PCR u 51 kmenů *E. coli*. Velikost očekávaného PCR produktu 264 bp byla detekována agarózovou gelovou elektroforézou (Obr. 7, 8). Správná velikost PCR produktu byla potvrzena u všech 51 kmenů *E. coli* izolovaných z potravin a tím bylo ověřeno, že se ve všech případech jedná o *E. coli*.



Obrázek 7: Gel s PCR produkty u kmenů 1-48. M – 100 bp DNA marker



Obrázek 8: Gel PCR produkty u kmenů 49-51. M – 100 bp DNA marker.

8.3 Zjištění citlivosti diskovou difúzní metodou

Diskovou difúzní metodou ke stanovení antibiotické rezistence bylo zjištěno, že se rezistence alespoň na jedno antibiotikum vyskytuje u 50 z 51 izolovaných kmenů *E. coli*, což je výskyt u 98 % kmenů. Multirezistenci vykazovalo dokonce 49 izolátů (96 %), což znamená rezistenci ke dvěma a více antimikrobiálními látkám (Tab. 4).

Rezistence byla nejčastěji zaznamenána u ampicilinu (94 % izolátů), u cefalotinu (90 %), doxycyklinu (82 %), amoxicilinu/klavulanátu (49 %) a colistinu (47 %). Všechny izolované

kmeny *E. coli* byly citlivé na antibiotikum cefepim a na kombinaci antibiotik cefoperazon/sulbaktam.

Bylo prokázáno, že antibiotická rezistence izolátů *E. coli* získaných z prasat a drůbeže je mnohem vyšší než rezistence izolátů ze skotu a souvisí s nadměrnou aplikací antibiotik v chovech prasat a drůbeže [27].

Podle studie Meyera a kolektivu [40] bylo v roce 2002/2003 bylo zjištěno, že ze 42 kmenů *E. coli* vyizolovaných z potravin bylo 57 % rezistentních na tetracykliny, 38 % na ampicilin, 37 % na trimetoprim/sulfametaxazol. Rezistence k chloramfenikolu se vyskytovala u 18,4 %. Izoláty byly nejvíce citlivé k imipenemu a cefotaximu.

Naopak podle studie Hera a kol. byla nejvyšší rezistence zaznamenána na beta-laktamová antibiotika následovaná tetracyklinem, streptomycinem a sulfonamidy. Frekvence výskytu rezistence vyšetřovaných izolátů pravděpodobně souvisí s aplikací antibiotik u potravinových zvířat. Tuto hypotézu částečně potvrzují údaje týkající se spotřeby antibiotik ve veterinární medicíně v České republice v roce 2004, podle kterých jsou tetracykliny nejčastěji aplikovaná antibiotika při léčbě bakteriálních infekcí a jsou následovány beta-laktamovými antibiotiky, diterpeny, sulfonamidy a makrolidy [42].

Podle studie Sáenze a kol. se rezistence u izolátů *E. coli* pocházejícím ze skotu vyskytuje nejčastěji k ampicilinu, streptomycinu, sulfonamidům a tetracyklinu a to u 20 – 22 % [33].

Tabulka 5: Prevalence rezistentních kmenů *E. coli* k testovaným antibiotikům.

Antimikrobiální látka	Počet rezistentních kmenů / %	Antimikrobiální látka	Počet rezistentních kmenů / %
Ampicilin	48 / 94	Meropenem	1 / 2
Amoxicilin/clavulanat	25 / 49	Aztreonam	2 / 4
Piperacilin/tazobactam	4 / 8	Gentamicin	1 / 2
Cefalotin	46 / 90	Amikacin	5 / 10
Cefuroxim	4 / 8	Chloramfenikol	9 / 18
Cefotaxim	6 / 12	Doxycyklin	42 / 82
Ceftadizin	4 / 8	Colistin	24 / 47
Cefoperazon/sulbaktam	0 / 0	Ciprofloxacín	1 / 2
Cefepim	0 / 0	Sulfametoxazol/trimetoprim	2 / 4
Imipenem	3 / 6	Kys. oxolinová	5 / 10

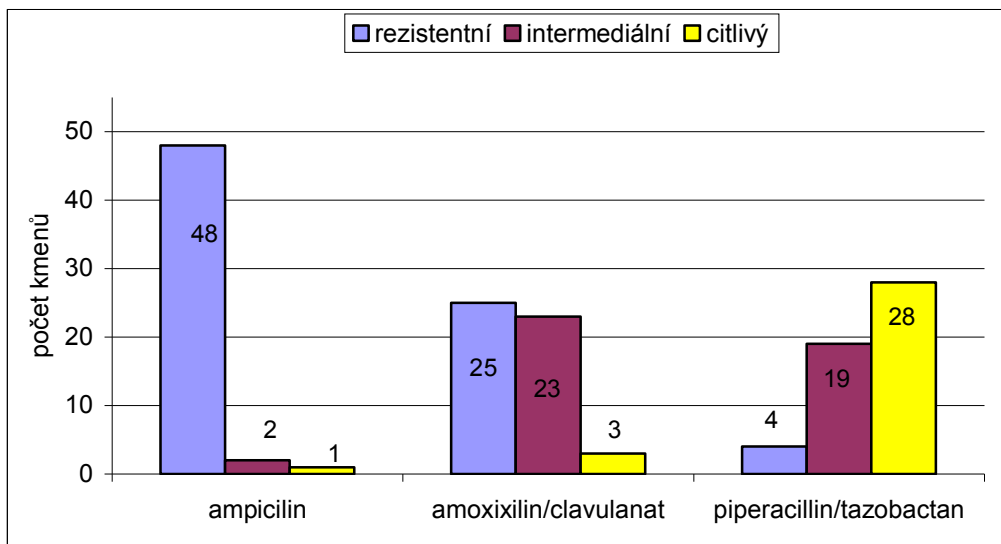
* šedě označená antibiotik a byla použita i u stanovení MIC.

Nejčastěji se vyskytovala rezistence k 5 a 3 antibiotikům současně. Byly nalezeny i izoláty s rezistencí k 8 antibiotikům (Tab. 4).

Tabulka 6: Prevalence rezistentních kmenů *E. coli* k 1-8 antibiotikům.

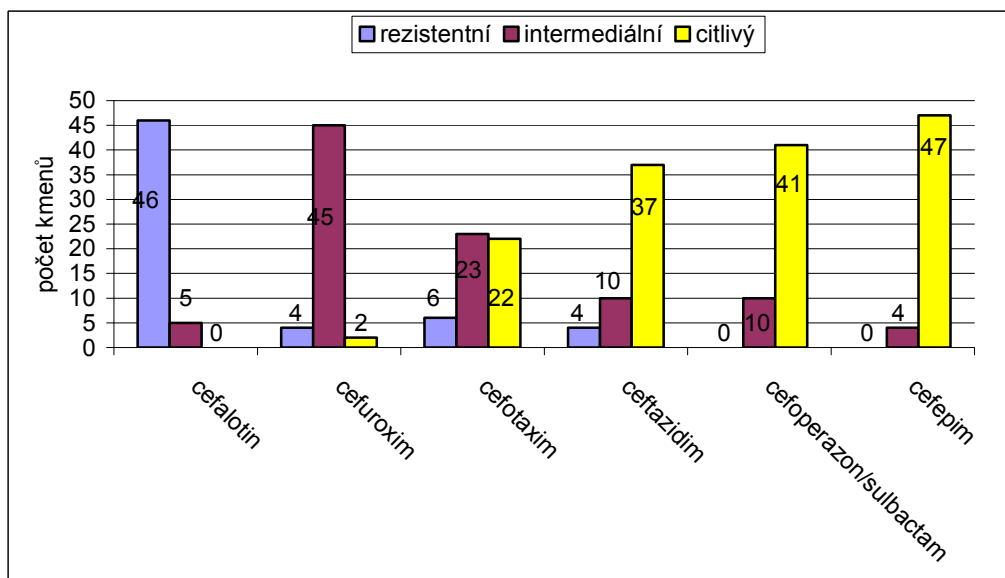
Počet prokázaných rezistencí	Počet izolovaných kmenů <i>E. coli</i> / %
1	1 / 5
2	2 / 10
3	12 / 60
4	8 / 40
5	13 / 65
6	7 / 35
7	6 / 20
8	1 / 5

Ze skupiny penicilinů se rezistence vyskytovala u ampicilinu u 48 kmenů (94 %), u amoxicilin/klavulanátu v 25 případech (49 %). Největší citlivost z této skupiny vykazovala kombinace antibiotik piperacilin/sulbaktam (Obr. 9).



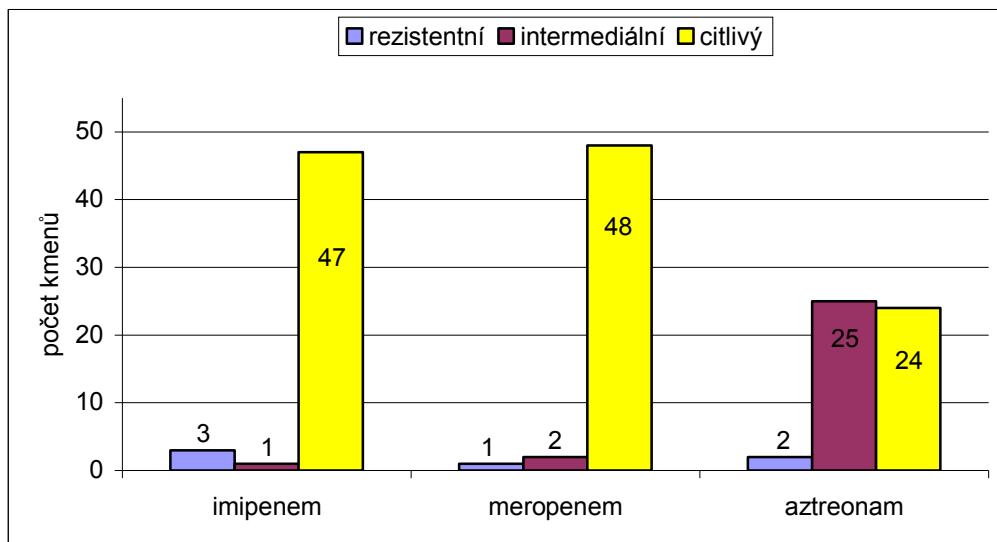
Obrázek 9: Grafické znázornění citlivosti izolovaných kmenů na antibiotika ze skupiny penicilinů.

U cefalosporinů vykazovalo největší rezistenci antibiotikum cefepim u 46 kmenů (90%). V této skupině se pak vyskytovala antibiotika ke kterým byly *E. coli* zcela citlivé. Bylo to u cefepimu 47 kmenů (92 %) a cefoperazonu/sulbaktam u 41 izolátů (80 %) (Obr. 10).



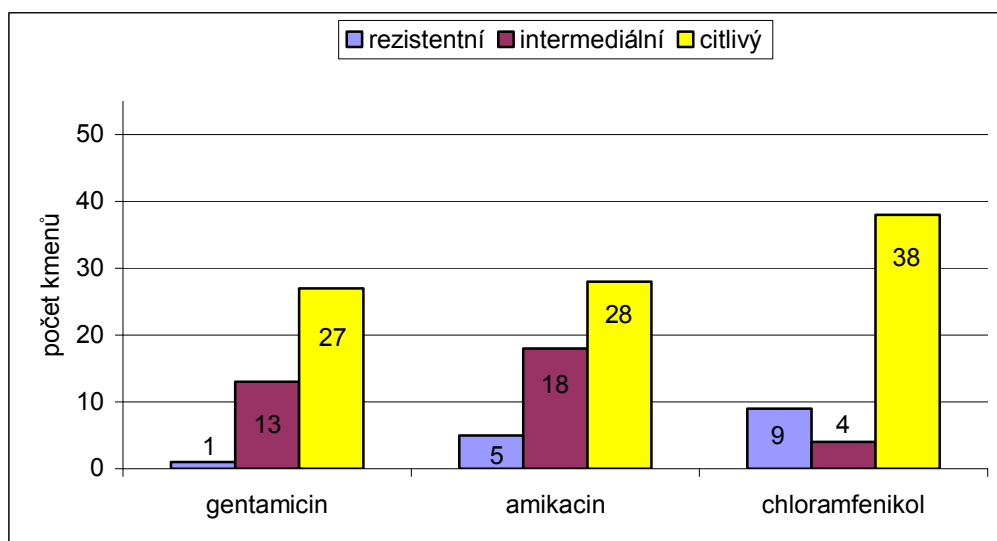
Obrázek 10: Grafické znázornění citlivosti izolovaných kmenů na antibiotika ze skupiny cefalosporinů.

Rezistenci u monokabtamů a karbapenemů ukazuje Obr. 11. Rezistence se vyskytovala jen málo a to u imipenemu u 3 kmenů (6 %), meropenemu u 1 kmenu (2 %) a u aztreonamu u 2 kmenů (4 %).



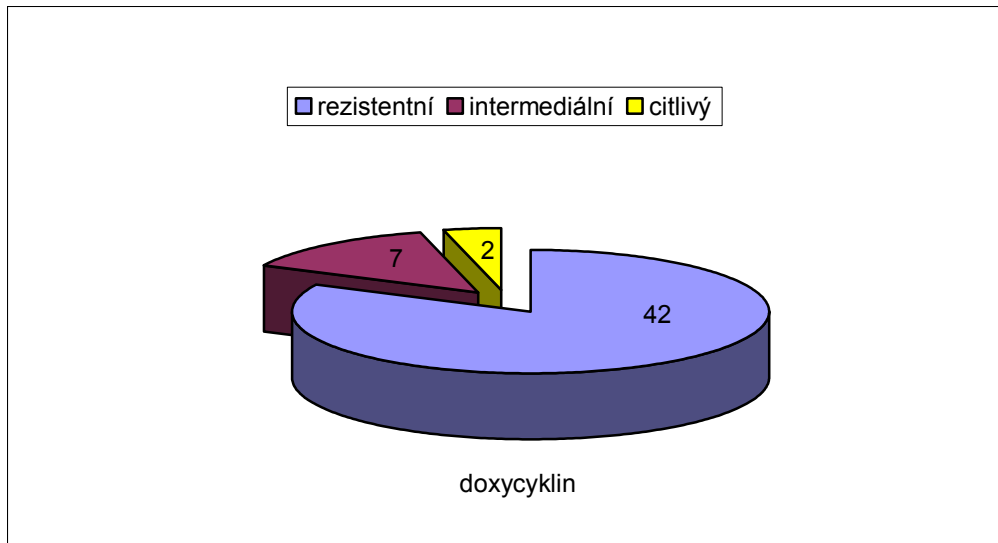
Obrázek 11: Grafické znázornění citlivosti izolovaných kmenů na antibiotika ze skupiny monokabtamů a karbapenemů.

Na gentamicin bylo rezistentní 1 kmen (4 %), na amikacin 5 kmenů (10 %) a na chloramfenikol 9 izolátů (18 %) (Obr.12).



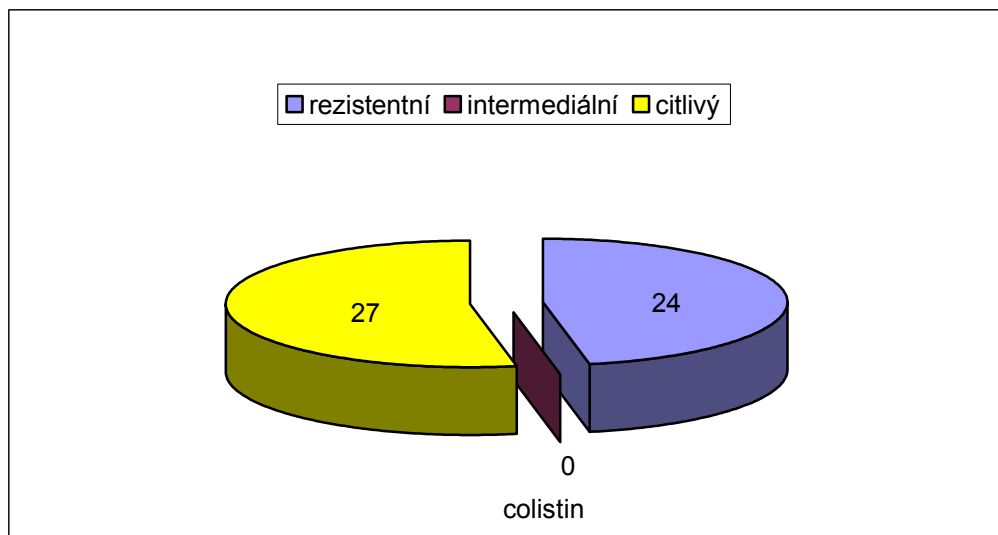
Obrázek 12: Grafické znázornění citlivosti izolovaných kmenů na antibiotika ze skupiny aminoglykosidů a chloramfenikolu.

Doxycyklin působil rezistentně na 42 (82 %) izolátů, jak ukazuje Obr. 13.



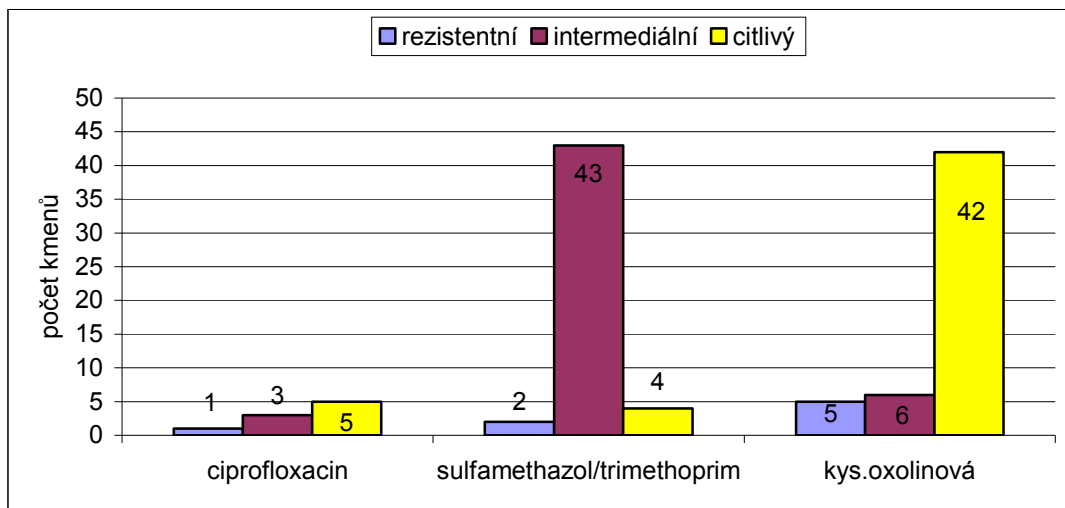
Obrázek 13: Grafické znázornění citlivosti izolovaných kmenů na antibiotika ze skupiny tetracyklinů.

Rezistence na colistin se projevila u 24 kmenů (47%). Což je zaznamenáno na Obr. 14.



Obrázek 14: Grafické znázornění citlivosti izolovaných kmenů na antibiotika ze skupiny peptidů.

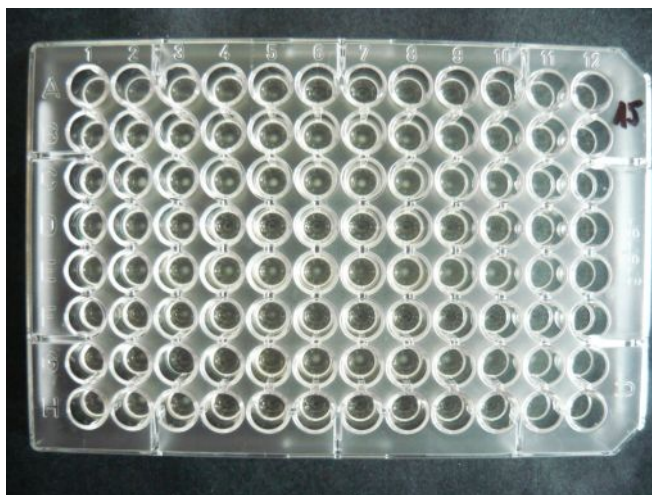
Obr. 15 ukazuje rezistenci na antimikrobní chemoterapeutika. Nejvyšší rezistence byla zaznamenána na kys. oxolinovou u 5 (10 %) kmenů. Na ciprofloxacin byl rezistentní 1 kmen (2 %) a na sulfametazol v kombinaci s trimetoprimem 2 kmeny (4 %).



Obrázek 15: Grafické znázornění citlivosti izolovaných kmenů na antibiotika ze skupiny antimikrobních chemoterapeutik.

8.4 Určení minimální inhibiční koncentrace

Minimální inhibiční koncentrace byla stanovena u 9 vybraných kmenů pomocí mikrotitračních destiček s danými koncentracemi antibiotik (Obr. 16).



Obrázek 16: Ukázka mikrotitrační destičky s viditelným nárůstem v jamkách.

Rezistence u všech vybraných kmenů *E. coli* byla zaznamenána u antibiotika klindamycinu. 6 (67 %) kmenů bylo rezistentních na erytromycin, 7 (78 %) bylo rezistentních k penicilinu, k ampicilinu 6 (67 %) kmenů, k tiamulinu bylo rezistentních 8 (89 %) kmenů. Citlivost u všech kmenů byla zaznamenána na antibiotika colistin, gentamicin a ceftiofur. Všechny hodnoty MIC jsou zaznamenány Tab. 7.

Tabulka 7: Stanovené hodnoty MIC.

	Označení vybraného kmenu <i>E. coli</i>								
	2	5	6	7	14	15	37	42	51
antibiotikum	MIC v mg/l								
AMOX/CLAV	4/2	4/2	32/16	>32/16	16/8	16/8	8/4	8/4	4/2
SPEC	64	16	32	>128	>128	>128	64	32	64
AMP	32	>32	>32	>32	>32	>32	32	>32	>32
APRA	16	<8	<8	<8	<8	<8	8	16	16
PEN	>16	16	>16	>16	>16	>16	16	>16	16
NEO	16	<8	<8	<8	32	8	8	16	>16
CELO	8	>32	>32	>32	32	32	8	32	4
CEQU	2	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1
CETF	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1
ERY	8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	8	>8
CLIN	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4
TIL	<4	<4	>32	>32	>32	>32	>32	32	>32
FLOR	2	<1	2	4	2	2	1	4	4
GEN	2	<2	<2	<2	<2	2	<2	<2	<2
TET	<1	<1	<1	>16	>16	>16	8	<1	4
TRI/SULF	<0,25/4,75	<0,25/4,75	>4/76	>4/76	>4/76	>4/76	>4/76	4/76	2/38
TIA	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	32	>32
ENRO	<0,0625	>2	>2	>2	2	2	0,25	<0,0625	>2
CST	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5

*šedé řádky označují antibiotika použítá i při stanovení citlivosti diskovou difúzní metodou.

Při porovnání vybraných výsledků diskové difúzní metody a MIC podle práce Metody testování antimikrobní citlivosti od British society for antimicrobial chemotherapy [41]. Bylo zjištěno, že existuje vztah mezi průměrem inhibičních zón (Tab.9) a minimální inhibiční koncentrací (Tab.7). Například u izolátu 2 byla u ampicilinu podle průměru inhibiční zóny 9 mm zjištěna rezistence (Tab.8 a 9). MIC ampicilinu u téhož kmene byla 32 mg/l, což podle BSCA znamená, že je kmen také rezistentní (Tab.7 a 8). Toto srovnání bylo provedeno u devíti vybraných kmenů a to jen u antibiotik ampicilinu, colistinu a gentamicinu, protože se buď lišila koncentrace použitých antibiotik nebo se námi použitá antibiotika v materiálech BSCA nevyskytovala.

Tabulka 8: MIC a mezní hodnoty průměru zón pro *Enterobacteriaceae*.

	MIC (mg/l)			Obsah antb.(μ g)	Průměr zóny (mm)		
	R >	I	S \leq		R \leq	I	S \geq
Ampicilin	16	16	8	10	11	12-14	15
Colistin	4	-	4	25	14	-	15
Gentamicin	4	4	2	10	16	17-19	20

Tabulka 9: Průměr inhibičních zón u vybraných izolátů *E. coli*.

Č. izolátu <i>E.coli</i>	Ampicilin (10 μ g)	Colistin (25 μ g)	Gentamicin(10 μ g)
	Průměr inhibiční zóny (mm)		
2	9	15	21
5	11	15	20
6	0	16	22
7	0	15,5	21
14	0	18	20,5
15	0	16	21
37	11	19	20
42	11	16	22
51	9	15	23

ZÁVĚR

V České republice je použití antibiotik u zvířat chovaných pro potravinové účely od 30. září 2003 regulováno Vyhláškou č. 325/2003 Sb. Navíc od 1. 1. 2006 (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003) jsou v ČR zakázána antibiotika jako růstové stimulanty, které byly dříve užívány zejména u drůbeže. Pokud by se daná nařízení dodržovala, mělo by dojít k nižší spotřebě antibiotik. Bohužel pro současné hodnocení jsou dostupné pouze údaje o celkové spotřebě antibiotik ve veterinární medicíně a z nich vyplývá vzrůstající trend spotřeby v letech po zavedení této vyhlášky.

Antibiotická rezistence se v posledních letech stala velice zásadním problémem veterinární i lidské medicíny, který je široce diskutován a je možné rovněž pozorovat snahy tento přetrvávající problém řešit.

Výsledky studií ukazují, že problematika antimikrobiální rezistence se týká i České republiky. Vyšetřením potravin v této práci byla zjištěna vysoká prevalence *E. coli* rezistentních k antimikrobiálním látkám. Vysoká prevalence rezistence je odrazem použití antimikrobiálních látek při terapii a prevenci infekčních onemocnění. Rezistence se vyskytovala alespoň na jedno antibiotikum u 50 z 51 izolovaných kmenů *E. coli*, což je výskyt u 98 % kmenů. Multirezistenci vykazovalo dokonce 49 izolátů (96 %), což znamená rezistenci ke dvěma a více antimikrobiálními látkám.

Rezistence byla nejčastěji zaznamenána u ampicilinu (94 % izolátů), u cefalotinu (90 %), doxycyklinu (82 %), amoxicilinu/klavulanátu (49 %) a colistinu (47 %). Všechny izolované kmeny *E. coli* byly citlivé na antibiotikum cefepim a na kombinaci antibiotik cefoperazon/sulbaktam.

Bakterie rezistentní k antimikrobiálním látkám se mohou šířit do lidské populace také prostřednictvím potravinových produktů a představují tak nepřímé ohrožení lidského zdraví.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] What are antibiotics and how do antibiotics work [online]. [cit. 2010-01-14]. Dostupný z WWW <<http://www.medicalnewstoday.com/articles/10278.php>>.
- [2] Antibiotika [online]. [cit. 2010-01-14]. Dostupný z WWW <camelot.lfhk.cuni.cz/farmakol/cz/antib99.doc>.
- [3] Definition of antibiotic [online]. [cit. 2010-01-26]. Dostupný z WWW <<http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=8121>>.
- [4] Antibakteriální chemoterapie [online]. [cit. 2010-01-26]. Dostupný z WWW <www.stefajir.cz/files/atb.ppt>.
- [5] LOCHMANN, O. Základy antimikrobní terapie, TRITON, Praha 1999.
- [6] Léčba infekcí [online]. [cit. 2010-01-14]. Dostupný z WWW <http://eamos.pf.jcu.cz/amos/kpk/externi/kpk_0813/02lecba_infekci.ppt>.
- [7] JELÍNEK, J. ZICHÁČEK, V. Biologie pro gymnázia, Nakladatelství Olomouc, 1998, 3. doplněné a opravené vydání.
- [8] ČECHOVÁ, L. JANALÍKOVÁ, M. Obecná mikrobiologie, UTB, Zlín, 2007
- [9] Přehled antibiotik ve veterinární medicíně [online]. [cit. 2010-01-14]. Dostupný z WWW <<http://farmakologie.webzdarma.cz/farmacka4.ppt>>.
- [10] DEMNEROVÁ, K. a kol. Laboratorní cvičení z mikrobiologie, 3. vydání, VŠCHT, Praha 2001
- [11] Antibiotika [online]. [cit. 2010-01-26]. Dostupný z WWW <http://www.simia.dreamhosters.com/prednasky/Antibiotika_I.ppt>.
- [12] HAMPL, F.; RÁDL, S.; PALEČEK, J.; 2nd ed. Praha, VŠCHT Praha, 2007. ISBN 978-80-7080-639-5
- [13] Skupiny antibiotik [online]. [cit. 2010-02-02]. Dostupný z WWW

- < http://www.lfhk.cuni.cz/klinmikrob/ppt/atb_skupiny.ppt>.
- [14] Antibiotika [online]. [cit. 2010-02-02]. Dostupný z WWW
< www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/atb.pdf>.
- [15] Léčba antibiotiky [online]. [cit. 2010-02-02]. Dostupný z WWW
< <http://www.chlamydie.info/node/753> >.
- [16] Problematika bakteriální rezistence [online]. [cit. 2010-01-14]. Dostupný z WWW < <http://www.fnol.cz/main.jsp?id=824>>.
- [17] Rezistence na antibiotika [online]. [cit. 2010-03-08]. Dostupný z WWW
< <http://www.vesmir.cz/clanek/rezistence-na-antibiotika> rezistence na antibiotika>.
- [18] B – laktamázy [online]. [cit. 2010-03-08]. Dostupný z WWW
<http://fv1.vfu.cz/export/sites/fv1/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie_pro_farmaceuty/B-laktamazy.pdf>.
- [19] Metody molekulární patologie [online]. [cit. 2010-03-08]. Dostupný z WWW <https://atlases.muni.cz/atlases/stud/atl_cz/main+metody+metmolpat.html#pcrstud>.
- [20] Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) [online]. [cit. 2010-03-08]. Dostupný z WWW
<<http://biologie.upol.cz/metody/Amplifikace%20pomoci%20PCR.htm>>.
- [21] Polymerase Chain reaction [online]. [cit. 2010-03-08]. Dostupný z WWW
<<http://highered.mcgraw-hill.com/olc/dl/120078/micro15.swf>>.
- [22] ŠILHÁNKOVÁ, L. Mikrobiologie pro potravináře. Praha 1: Nakladatelství technické literatury, 1983.
- [23] GÖRNER, F. VALÍK, L. Aplikovaná mikrobiológia požívatin. Malé Centrum, Bratislava, 2004.

- [24] KAPER, J.B. O'BRIEN, A.D. *Escherichia coli* 0157:H7 and other shiga toxin producing *E.coli* strains. Washington DC, America society for mikrobiology, 1998.
- [25] EARSS [online]. [cit. 2010-03-08]. Dostupný z WWW <<http://www.rivm.nl/earss/database/>>.
- [26] WHITE, D. G.; ZHAO, S.; SIMJEE, S.; WAGNES, D. D.; MCDERMOTT, P. F. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. 2002, *Microbes Infect.* 4: 405-412.
- [27] GUERRA, B.; JUNKER, E.; SCHROETER, A.; MALORNY, B.; LEHMANN, S.; HELMUTH, R. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. 2003, *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 489-492.
- [28] SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. 2001, *Vet. Res.* 32: 201-225.
- [29] ZHAO, S.; WHITE, D. G.; GE, B.; AYERS, S.; FRIEDMAN, S.; ENGLISH, L.; WAGNER, D.; GAINERS, S.; MENG, J. Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. 2001, *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1558-1564.
- [30] AERESTRUP, F. M., WEGENER, H. C. The effects of antibiotics usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance of humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. 1999, *Microbes Infect.* 1: 639-644.

- [31] DEFRANCESKO, K. A.; COBBOLD, R. N.; RICE, D. H.; BESSER, T. E.; HANCOCK, D. Antimicrobial resistance of comensal *Escherichia coli* from dairy cattle associated with recent multi-resistant salmonellosis outbreaks. 2004, *Vet. Microbiol.* 98: 55-61.
- [32] LANZ, R.; KUHNERT, R.; BOERLIN, P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species Switzerland. 2003, *Vet. Microbiol.* 91: 73-84.
- [33] SÁENZ, Y.; ZARAGAZA, M.; BRINAS, L.; LANTERO, M. Antibiotik resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. 2006, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 18: 353-358.
- [34] HAMMERUM, A. M.; SANDVANG, D.; ANDERSON, S. R.; SEFVARTH, A. M. Detection of *sul1*, *sul2* and *sul3* in sulfonamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark. (2006), *Int. J. Food Microbiol.* 106: 235-237.
- [35] MORA, A.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; ALONSO, M. P.; DHABI, G.; ECHEITA, A.; GOLZÁNES, E. A.; BERNÁNDES, M. I.; BLANCO, J. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)--producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains from humans, cattle, sheep and food in Spain 2005, *Res. Microbiol.* 156: 793-806.
- [36] WILKERSON, CH.; SAMANDPOUR, M.; VAN KIRK, N.; ROBERTS, M. C. Antibiotic resistance and distribution of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* O157:H7 isolates from human and bovines. 2004, *Agents Chemother.* 48: 1066-1067.
- [37] VOTAVA, M.; ČERNOHORSKÁ, L.; HEROLDOVÁ, M.; HOLÁ V.; MEJZLÍKOVÁ, L.; ONDROVČÍK, P.; RŮŽIČKA, F.; DVOŘÁČKOVÁ,

- M.; WOZNICOVÁ, V.; ZAHRADNÍČEK, O. Lékařská mikrobiologie speciální. 2003, Neptun, Brno, 495 s.
- [38] Velký lékařský slovník [online]. [cit. 2010-04-22]. Dostupný z WWW <<http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/superinfekce-2>>.
- [39] BEJ, A. K. a kol. Polymerase chain reaction- gene probe detection of microorganism by using filter- concentrated samples. Appl and Environ Microbiology, 1991, 57(12), s. 3529-3534
- [40] MEYER, E.; LUNKE, C.; KIST, M.; SCHWAB, F.; FRANK, U. Antimicrobial resistance in Esherichia coli strains isolatér from food, animals and humans in Germany. Infection 36, 2007.
- [41] British society for antimicrobial chemotherapy. BSCA methods for antimicrobial susceptibility testing. Version 7.1, únor 2008.
- [42] HERA, A., KOUTECKÁ, L., DORN, D., PSOTA, P. Spotřeba antibiotik ve veterinární medicíně v ČR v letech 2002-2004. Věstník Ústavu pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv 3, 2005, 48-49.
- [43] Antibiotická rezistence [online]. [cit. 2010-05-14]. Dostupný z WWW <http://cs.wikipedia.org/wiki/Antibiotick%C3%A1_rezistence>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

EPEC	Enteropatogenní <i>E. coli</i> .
EIEC	Enteroinvazivní <i>E. coli</i> .
ETEC	Enterotoxigenní <i>E. coli</i> .
EHEC	Shiga toxin produkující <i>E. coli</i> .
MIC	Minimální inhibiční koncentrace.
MBC	Minimální baktericidní koncentrace.
PABA	Paraaminobenzoová kyselina.
DNA	Deoxyribonukleová kyselina.
RNA	Ribonukleová kyselina.
PCR	Polymerázová řetězová reakce.
MPA	Masopeptonový agar.
MPB	Masopeptonový bujón.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Mechanizmy účinku antibiotik.....	15
Obrázek 2: Ukázka misky s Mueller-Hintonovou půdou a antibiotickými disky s ihibičními zónami.....	32
Obrázek 3: Ukázka praktického provedení Epsilon testu.....	33
Obrázek 4: Ukázka zjištění MIC pomocí mikrotitrační destičky.....	34
Obrázek 5: Nárůst kolonií <i>E.coli</i> na Endově agaru.....	50
Obrázek 6: Záznamový arch s výsledky enterotestu.....	50
Obrázek 7: Gel s PCR produkty u kmenů 1-48. M – 100 bp DNA marker.....	51
Obrázek 8: Gel s PCR produkty u kmenů 49-51. M – 100 bp DNA marker.....	51
Obrázek 9: Grafické znázornění citlivosti izolovaných kmenů na antibiotika ze skupiny penicilinů.....	54
Obrázek 10: Grafické znázornění citlivosti izolovaných kmenů na antibiotika ze skupiny cefalosporinů.....	54
Obrázek 11: Grafické znázornění citlivosti izolovaných kmenů na antibiotika ze skupiny monokabtamů a karbapenemů.....	55
Obrázek 12: Grafické znázornění citlivosti izolovaných kmenů na antibiotika ze skupiny aminoglykosidů a chloramfenikolu.....	55
Obrázek 13: Grafické znázornění citlivosti izolovaných kmenů na antibiotika ze skupiny tetracyklinů.....	56
Obrázek 14: Grafické znázornění citlivosti izolovaných kmenů na antibiotika ze skupiny peptidů.....	56
Obrázek 15: Grafické znázornění citlivosti izolovaných kmenů na antibiotika ze skupiny antimikrobních chemoterapeutik.....	57
Obrázek 16: Ukázka mikrotitrační destičky s viditelným nárůstem v jamkách.....	57

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled mechanismů rezistence na nejčastěji používaná antibiotika.....	17
Tabulka 2: Citlivost izolátů <i>E. coli</i> na antibiotika v České republice v průběhu let, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007 a 2008.....	37
Tabulka 3: Sekvence použitých primerů.....	46
Tabulka 4: Přehled jamek s antibiotiky a jejich koncentrace.....	49
Tabulka 5: Prevalace rezistentních kmenů <i>E. coli</i> k testovaným antibiotikům.....	53
Tabulka 6: Prevalace rezistentních kmenů <i>E. coli</i> k 1-8 antibiotikům.....	53
Tabulka 7: Stanovení hodnoty MIC.....	58
Tabulka 8: MIC a mezní hodnoty průměru zón pro <i>Enterobacteriaceae</i>	59
Tabulka 9: Průměr inhibičních zón u vybraných izolátů <i>E. coli</i>	59