

Antibiotická rezistence u enterobakterií izolovaných z potravin

Pavína Píšová

Bakalářská práce
2021

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Pavλίna Píšová
Osobní číslo:	T18122
Studijní program:	B2901 Chemie a technologie potravin
Studijní obor:	Chemie a technologie potravin
Forma studia:	Prezenční
Téma práce:	Antibiotická rezistence u enterobakterií izolovaných z potravin

Zásady pro vypracování

1. Enterobakterie –vlastnosti, výskyt v potravinách a možnosti jejich detekce.
2. Mechanizmy a příčiny vzniku antibiotické rezistence.
3. Antibiotická rezistence enterobakterií izolovaných z potravin a nápojů.

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam doporučené literatury:

- [1] Walsh, C. Antibiotics: actions, origins, resistance. Washington: ASM Press, 2003, 335 s. ISBN 1-55581-254-6
- [2] Hudson, J.A., Frewer, L.J., Jones, G. et al. The agri-food chain and antimicrobial resistance: A review. Trends in Food Science and Technology, 69: 131-147. 2017
- [3] Rhouma, M., Romero-Barrios, P., Gaucher, M-L., Bhachoo, S. Antimicrobial resistance associated with the use of antimicrobial processing aids during poultry processing operations: cause for concern?. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020. doi: 10.1080/10408398.2020.1798345
- [4] Schrijver, R., Stijntjes, M., Rodriguez-Bano, J. et al. Review of antimicrobial resistance surveillance programmes in livestock and meat in EU with focus on humans. Clinical Microbiology and Infection, 24: 577-590. 2018
- [5] Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **21. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 8. února 2021

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji 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. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – 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);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem 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.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá vybranými enterobakteriemi, a to *Escherichia coli* a *Salmonella enterica*. Dále pojednává o antibiotikách, jejich historii a mechanismech účinku. Jsou zde rozebrány diluční a difúzní metody zjišťování rezistence na antibiotika. Rovněž je v práci shrnuta antibiotická rezistence, její vznik a mechanismy. V závěru práce jsou zmíněny příklady jednotlivých antibiotik indikujících antibiotickou rezistenci.

Klíčová slova: enterobakterie, antibiotikum, mechanismus účinku antibiotika, antibiotická rezistence

ABSTRACT

This thesis deals with enterobacteria, namely *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. It also concerns antibiotics, their history and mechanisms of action. It analyses the dilution method and the diffusion method used to analyse antibiotic resistance. The thesis also summarizes antibiotic resistance, its origin and mechanisms. At the end of the thesis, there are mentioned examples of individual antibiotics, which indicate antibiotic resistance.

Keywords: enterobacteria, antibiotic, mechanism of action of antibiotic, antibiotic resistance

Poděkování

Děkuji doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení práce, poskytování rad a materiálních podkladů.

OBSAH

ÚVOD.....	9
1 VYBRANÉ ENTEROBAKTERIE IZOLOVANÉ Z POTRAVIN A NÁPOJŮ.....	10
1.1 <i>ESCHERICHA COLI</i>	10
1.2 <i>SALMONELLA ENTERICA</i>	13
1.2.1 <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Typhimurium	16
1.2.2 <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Enteritidis	17
2 ANTIBIOTIKA	18
2.1 HISTORIE	18
2.2 MECHANIZMUS ÚČINKU	19
2.2.1 Inhibice syntézy buněčné stěny	19
2.2.2 Narušení membrán buňky	19
2.2.3 Inhibice syntézy nukleových kyselin	20
2.2.4 Inhibice syntézy proteinů	20
2.2.5 Inhibice metabolismu	21
2.3 METODY ZJIŠŤOVÁNÍ CITLIVOSTI MIKROORGANISMŮ NA ANTIBIOTIKUM	21
2.3.1 Difúzní metoda	22
2.3.2 Diluční metoda	22
3 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE.....	23
3.1 PŘIROZENÁ ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE	23
3.2 ZÍSKANÁ ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE	23
3.3 PŘÍČINY VZNIKU ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE	24
3.4 MECHANIZMY ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE	24
3.4.1 Změna cíle působení	25
3.4.2 Nepropustnost	25
3.4.3 Enzymatické upravení nebo zničení antibiotika.....	26
3.4.4 Vyplavování antibiotika z buňky	27
4 VYBRANÁ ANTIBIOTIKA S MOŽNOU ZÍSKANOU REZISTENCÍ U ENTEROBAKTERIÍ	28
4.1 AMPICILIN	29
4.2 MEROPENEM	29
4.3 CEFOTAXIM.....	30
4.4 CEFTAZIDIM	31
4.5 CEFOXITIN.....	31
4.6 CIPROFLOXACIN	32
4.7 PERFLOXACIN.....	32
4.8 GENTAMICIN	33

4.9	TIGECYKLIN	33
4.10	CHLORAMFENIKOL	34
	ZÁVĚR	35
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	36
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	44
	SEZNAM OBRÁZKŮ	45

ÚVOD

Motivací pro sepsání práce byl můj zájem o antibiotika, jejich historii a vývoj. Antibiotika byla a stále jsou významným lékem v medicínské a veterinární praxi, jejich používání zachránilo bezpočet životů.

Další pohnutkou byla skutečnost rostoucího rozšíření rezistence k antibiotikům, které představuje stále větší problém při léčbě onemocnění lidí i zvířat a na kterou byl tímto chtěla poukázat. Rezistence vzniká zčásti přirozeně, z velké části je ovšem způsobena špatnou praxí při používání antibiotik. Toto je podstatným problémem zejména kvůli omezeným možnostem vývoje nových antibiotik.

Cílem práce bylo shrnout poznatky o antibiotikách a jejich účinku, shrnout poznatky o antibiotické rezistenci, zejména rezistenci získané a poukázat na problém získané antibiotické rezistence u vybraných enterobakterií, konkrétně *Escherichia coli* a *Salmonella enterica*.

Práce je rešeršní v důsledku epidemiologické situace. Nedošlo tak k původně plánovanému screeningu rezistence na vybraná antibiotika u *Escherichia coli* a *Salmonella* spp. u izolovaných z kachního masa.

1 VYBRANÉ ENTEROBAKTERIE IZOLOVANÉ Z POTRAVIN A NÁPOJŮ

Čeď *Enterobacteriaceae* zahrnuje gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinkovité bakterie. Jsou kataláza pozitivní, oxidáza negativní a všechny fermentují glukózu a redukují dusičnany. Enterobakterie netvoří spory. Dají se nalézt ve většině prostředí, nejvíce jsou spojovány s intestinálním traktem a jeho infekcemi. Mezi enterobakterie se řadí například rody *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella* nebo *Yersinia*. (Corry, Curtis a Baird, 2012)

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli je součástí čeledi *Enterobacteriaceae*, vyznačuje se fermentací laktózy. Řadí se mezi koliformní bakterie. (Corry, Curtis a Baird, 2012)

Běžně se nachází v zažívacím traktu. V případě požití kontaminovaných potravin nebo nápojů může způsobit gastrointestinální onemocnění. Léčba těchto onemocnění většinou spočívá v doplňování tekutin, ve specifických případech je užitá medikace. Onemocnění většinou samo odezní bez následků, nebezpečí představují kmeny *Escherichia coli* O157:H7 a *Escherichia coli* O104:H4, které mohou způsobit krvavé průjmy, selhání ledvin a v některých případech i smrt. *Escherichia coli* také může způsobovat infekce močových cest. (Britannica, 2020)

Escherichia coli O157:H7 se řadí mezi kmeny *Escherichia coli* produkující shigatoxin. Tyto kmeny jsou dle odhadů celosvětově původci 2,8 milionu alimentárních onemocnění za rok. Po vyvolání krvavých průjmů se více než 10 % případů vyvine v hemolyticko-uremický syndrom, jehož smrtnost se pohybuje mezi 3-5 %. Kmeny *Escherichia coli* produkující shigatoxin patří do podskupiny enterohemoragických kmenů *Escherichia coli*. (Wooley a Byers, 2017)

Enterohemoragické kmeny *Escherichia coli* byly poprvé popsány ve Spojených státech v roce 1983. (Ambrožová a Marejková, 2012) Jedná se o producenty jednoho či více shigatoxinů. Shigatoxiny blokují syntézu proteinů, což má za následek cytotoxicitu. Při léčbě enterohemoragických kmenů *Escherichia coli* se používá podpůrná léčba, aby nedošlo k lýzi bakteriální buňky a uvolnění toxinů při použití antibiotik. (Wooley a Byers, 2017)

Mimo enterohemoragických kmenů *Escherichia coli* dále rozlišujeme kmeny enteropatogenní *Escherichia coli*, enterotoxigenní *Escherichia coli*, enteroinvazivní *Escherichia coli*, enteroagregativní *Escherichia coli* a difuzně adherentní *Escherichia coli*. (Amin a spol., 2018)

Enteropatogenní *Escherichia coli* jsou schopny adheze na střevní epitelové buňky pomocí fimbrií (Wooley a Byers, 2017) a tvorby bílkoviny působící jako receptor intiminu (adhezní molekula). Jejich působením dochází k narušení epiteliálních mikrokřků. Porušení střevního epitelu vede k horšímu vstřebávání živin a mohou způsobit těžkou dehydrataci. (Machala a Beneš, 2011) Způsobují vytrvalé průjmy, zejména u novorozenců. (Wooley a Byers, 2017) Enteropatogenní *Escherichia coli* jsou rozlišovány za pomoci charakteristických povrchových antigenů. (Machala a Beneš, 2011) Je popsáno více než 200 sérotypů. (Wooley a Byers, 2017)

Enterotoxigenní *Escherichia coli* způsobují nezánettivé vodnaté průjmy. Jedná se o výhradní lidské patogeny a nejčastější příčinu průjmů. Onemocnění je způsobeno jedním ze dvou toxinů, které jsou produkovány enterotoxigenní *Escherichia coli*, a to termolabilní a termostabilní enterotoxiny. Adheze ke střevním epitelovým buňkám je zajištěna nejméně 20 adhesiny. (Wooley a Byers, 2017)

Enteroinvazivní *Escherichia coli* se endemicky vyskytuje v tropech. Napadají enterocyty ve střevě, kde se množí a mohou vést k nekróze. Zároveň produkují toxiny, které podporují zánětlivé změny epitelu. Onemocnění se projevuje horečkami a vodnatými průjmy s krví a hlenem. (*Escherichia coli* průjmové infekce, 2021)

Enteroagregativní *Escherichia coli* jsou schopny adheze na střevní sliznici, kde tvoří plaky nebo tzv. bakteriální ostrůvky. Působí akutní i chronická průjmová onemocnění, k onemocnění dochází hlavně u pacientů se závažnými poruchami imunity a dětí. (Machala a Beneš, 2011) Bývají spojovány s chronickými záněty střev, které mohou vést k podvýživě a opožděnému růstu u dětí. (Amin a spol., 2018)

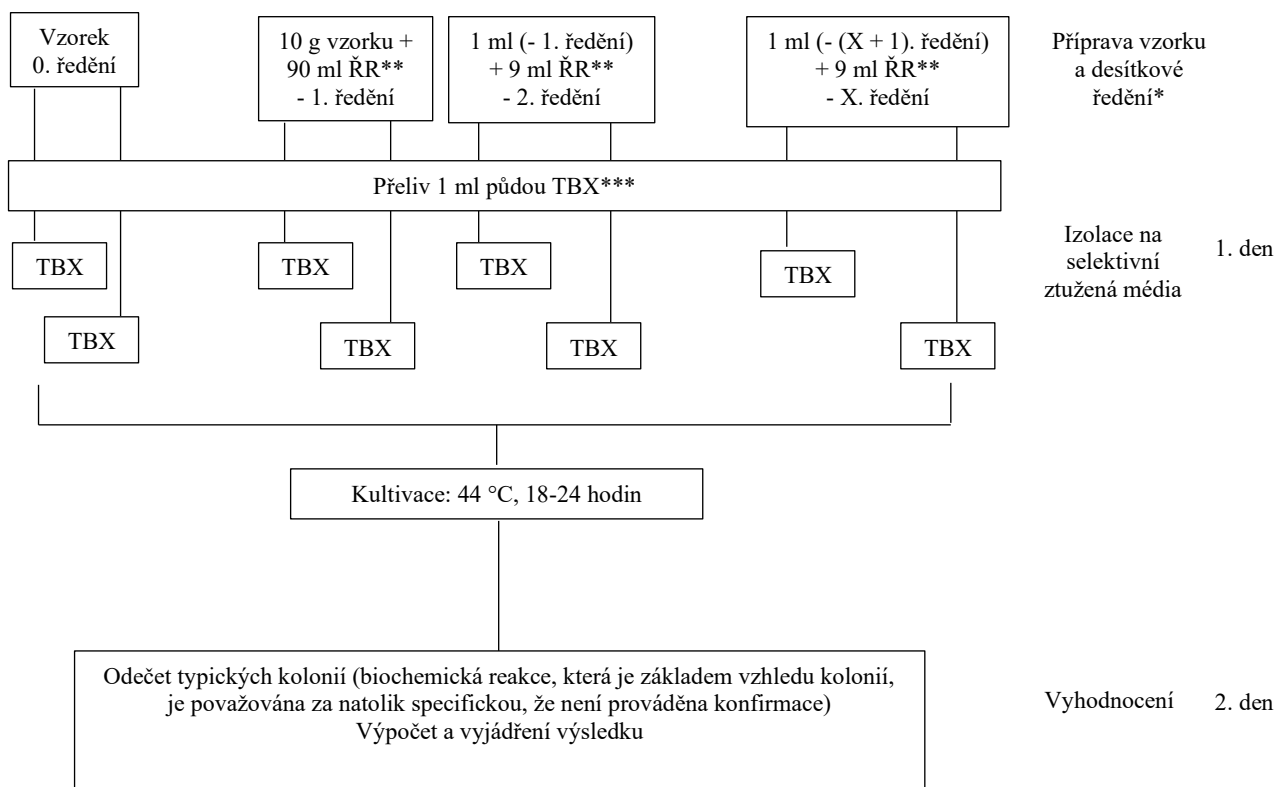
Difuzně adherentní *Escherichia coli* byly identifikovány na základě difuzně adherentního vzorce u buněk HeLa a HEP-2, kdy dochází k pravidelnému pokryvu buněčného povrchu. Difuzně adherentní jsou spojovány s akutními průjmy u dětí starších 6 měsíců. Je zde významný virulentní geneticky zaznamenaný gen pro enteroagregativní termostabilní toxin 1 stimulující guanylát-cyklázový receptor. (Javadi a spol., 2020)

Výskyt *Escherichia coli* je významný v souvislosti s kontaminací potravin, kde je považována za indikátor fekální kontaminace. Dle mikrobiologických kritérií pro potraviny je konkrétní přítomnost *Escherichia coli* ověřována v mase a masných výrobcích, čerstvých, zmražených, solených a uzených rybách a ostatních vodních živočiších určených k tepelné úpravě, v sýrech a másle, dále pak v krájené nebo strouhané čerstvé zelenině a čerstvé ovocné a zeleninové šťávě, sušené zelenině a ovoci, ovocných a zeleninových konzervovaných výrobcích, sušených skořápkových plodech, semenech rostlin, obilných výrobcích k přímé spotřebě nebo pekařských výrobcích s náplní, koření, čajích, lahůdkářských výrobcích a polotovarech určených ke spotřebě po ohřevu. Ve většině dalších potravin je testována přítomnost koliformních bakterií, do kterých *Escherichia coli* spadá, popřípadě se testuje přítomnost *Enterobacteriaceae* jako celku. (ČSN 56 9609, 2008)

Escherichia coli O157 a další verocytotoxin (shigatoxin) produkující *Escherichia coli* jsou v potravinách nepřipustné. (ČSN 56 9609, 2008)

Nedávné zjištěné případy výskytu *Escherichia coli* v potravinách jsou například v brojlerových kuřatech a vejcích. Studie zveřejněná v roce 2021 od autorů Silva a spol. uvádí izolování *Escherichia coli* u 82,0 % brojlerů z brojlerů vyřazených z produkčního řetězce. Bakterie byly souběžně detekovány v celulitidě a jaterních lézích u 40,0 % brojlerů. (Silva a spol., 2021) Studie z roku 2021 zaměřená na vejce prodávaná v maloobchodech v západní Austrálii zjistila přítomnost *Escherichia coli* v 19,8 % testovaných vzorků. (Sodagari a spol., 2021)

Průkaz přítomnosti bakterií *Escherichia coli* dle ČSN ISO 16649-2 (560079) je znázorněn na následujícím schématu (Obrázek 1). Jako první jsou připravena požadovaná ředění vzorku. Ta jsou přelita chromogenní půdou, trypton-žluč-X-glukuronidovým agarem (TBX). TBX v litru obsahuje 20 g peptonu, 1,5 g žlučové soli No. 3, 0,075 g X-β-D-glukuronidu a 15 g agaru. Doprovodná mikroflóra je inhibována žlučovými solemi a teplotou kultivace (44 °C). 96-97 % kmenů *Escherichia coli* syntetizuje enzym β-D-glukuronidázu, která štěpí X-β-D-glukuronid, kdy dochází k odštěpení chromoforu zbarvujícím kolonie *Escherichia coli* modrozeleně. Část glukuronidáza negativních kmenů *Escherichia coli* roste na TBX v podobě bezbarvých kolonií, část není schopná růstu kvůli vyšší kultivační teplotě. (Purkrťová, 2017)



*Minimálně dvě po sobě jdoucí ředění vyšetřá v paralele

**ŘR – ředící roztok (PPV)

***1 ml testované suspenze přelít asi 15 ml půdy TBX temperované na 44-47 °C

Obrázek 1 Horizontální metoda stanovení počtu β -glukuronidáza pozitivních *Escherichia coli* (Purkrťová, 2017)

1.2 *Salmonella enterica*

Salmonella enterica se řadí do čeledi *Enterobacteriaceae*, přičemž není schopná fermentace laktózy. (Corry, Curtis a Baird, 2012) Je běžně rozšířená v prostředí, primárně se nachází ve střevech živočichů. V prostředí přežívá dlouhodobě díky tvorbě biofilmu. (Afshari a spol., 2018)

Salmonella enterica může způsobovat vážné střevní infekce vedoucí až k sepsi s horečkou a nevolností odpovídající tyfu, zvracení, křečím v břiše a průjmům. Vážné infekce způsobují hlavně *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhi a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Paratyphi. Netyfoidní *Salmonella enterica* dále způsobuje méně závažnou salmonelózu, což je onemocnění gastrointestinálního traktu často vyvolanou požitím kontaminovaných potravin (syrového masa, mléka, vajec). (De Jong a spol., 2005) Pro příklad, celosvětově 20 % drůbežích produktů je kontaminováno *Salomonella* spp., přičemž většina nálezů salmonelózou má za původce *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Enteritidis. (Afshari a spol., 2018)

Infekce způsobené *Salmonella enterica* v současnosti jsou hlavním důvodem nemocnosti na jihu Afriky a Asie. V těchto oblastech je riziko úmrtí na tyto infekce zvyšováno kombinací s malárií, nemocí AIDS, spavou nemocí nebo podvýživou. K problému přispívá skutečnost, že je hlášen 30-75 % záchyt vícenásobně rezistentních kmenů s nižší citlivostí na fluorochinolony a cefalosporiny. (Wooley a Byers, 2017)

Dle mikrobiologických kritérií pro potraviny je konkrétní přítomnost *Salmonella* spp. ověřována v mase a masných výrobcích, polokonzervách, živočišném tuku s výjimkou másla, dále v uzených rybách a výrobcích z ryb hermeticky neuzavřených, zmražených měkkýchších a korýších. Dále se přítomnost *Salmonella* spp. zjišťuje ve vaječných výrobcích, sušených mléčných výrobcích včetně kojenecké a dětské výživy, čerstvých krémech a mléčných pudincích, krémech a dezertech. Další kontrolované potraviny jsou krájená nebo strouhaná čerstvá zelenina a čerstvé ovocné a zeleninové šťávy, zmražená zelenina, houby a ovoce a výrobky s předvařenou či nepředvařenou zeleninou a ovocem, strouhaný kokos, dětská výživa obilná a dětské piškoty, semena rostlin, obilné výrobky k přímé spotřebě, cukrářské a pekařské výrobky, výrobky z brambor, kakao, čokoláda a čokoládové cukrovinky, koření, čaje, zahušťující a želírující látky, čisté kultury a doplňky stravy, lahůdkářské výrobky a polotovary určené ke spotřebě po ohřevu. (ČSN 56 9609, 2008)

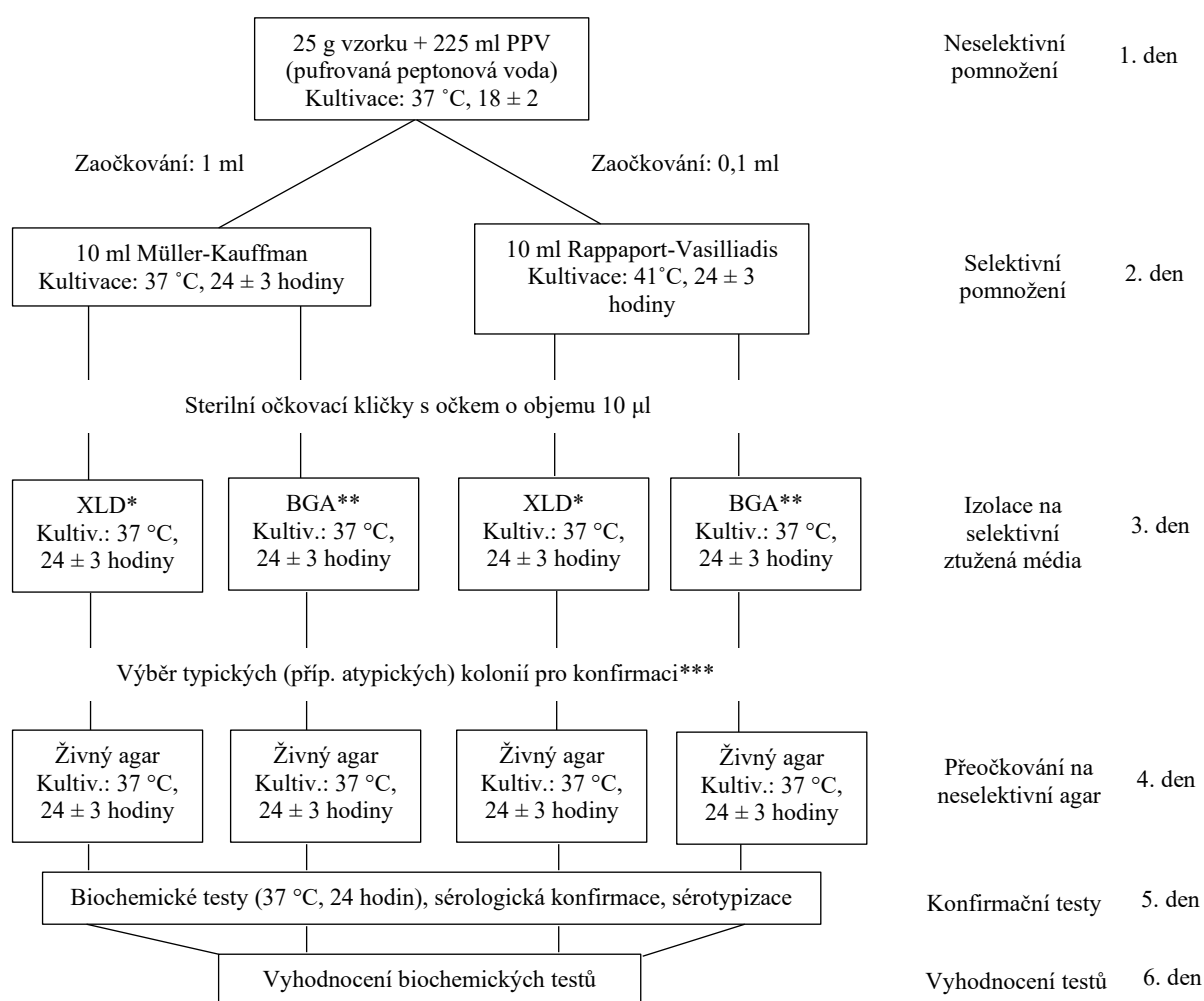
Nejvyšší mezní hodnota nálezu *Salmonella* spp. na g (ml) v potravinách určených pro kojeneckou a dětskou výživu je negativní nález v 50 g (ml) výrobku. U potravin určených k přímé spotřebě je vyžadován negativní nález v 25 g (ml) výrobku. (ČSN 56 9609, 2008)

Průkaz přítomnosti bakterií *Salmonella* spp. dle ČSN EN ISO 6579 je znázorněn na následujícím schématu (Obrázek 2). Pro neselektivní pomnožení je používána pufrovaná peptonová voda, která v litru obsahuje 10 g peptonu, 5 g chloridu sodného, 9 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného a 1,5 g dihydrogenfosforečnanu draselného. Pufrovaná peptonová voda slouží k resuscitaci buněk, které byly subletálně poškozeny nebo oslabeny vlivem zacházení s potravinou či přísadkami konzervačních látek. (Purkrtová, 2017)

Pro selektivní pomnožení jsou využívány Rappaport-Vassiliadis (RVS) bujón obohacené pro salmonely a Muller-Kauffmann (MK) bujón s tetrathionem. RVS bujón obsahuje na litr 4,5 g peptonu ze sóji, 29 g hexahydrátu chloridu hořečnatého, 8 g chloridu sodného, 0,4 g hydrogenfosforečnanu didraselného, 0,6 g dihydrogenfosforečnanu draselného a 0,036 g malachitové zeleně. Selektivní podmínky pro *Salmonella* spp. vycházejí z vyšší rezistence k malachitové zeleni a vyššímu osmotickému tlaku, nízkému pH, vyšší teplotě a

nižším nároku na živiny. RVS bujón není vhodný pro selektivní pomnožení *Salmonella* Typhi a *Salmonella* Paratyphi A. (Purkrtová, 2017)

MK bujón obsahuje na litr 0,9 g masového extraktu, 4,5 g peptonu z masa, 1,8 g kvasničného extraktu, 4,5 g chloridu sodného, 25 g uhličitanu vápenatého, 40,7 g thiosíranu sodného a 4,75 g volské žluči. Dále se přidává 5 g jodidu draselného, 4 g jódu a 0,01 g brilantové zeleně. Grampozitivní bakterie jsou inhibovány pomocí žluči a brilantové zeleně. Koliformní bakterie a ostatní *Enterobacteriaceae* jsou inhibovány tetrathionanem. (Purkrtová, 2017)



* XLD – povinný selektivní agar

**BGA – volitelný selektivní agar

***Vyočkovat z každé plotny nejméně jednu kolonii považovanou za typickou nebo suspektní na živný agar, další čtyři kolonie vybrat až poté, je-li první kolonie negativní

Obrázek 2 Schéma horizontální metody průkazu bakterií *Salmonella* spp. (Purkrtová, 2017)

Izolace na selektivních ztužených médiích se provádí na xylóza-lysin-deoxycholátovém agaru (XLD) a agaru s brilantovou zelení, fenolovou červení a laktózou (BGA). XLD obsahuje v litru 3 g kvasničného extraktu, 5 g chloridu sodného, 3,75 g D (+) xylózy, 7,5 g

laktózy, 7,5 g sacharózy, 5 g L (+) lysinu, 1 g deoxycholátu sodného, 6,8 g thiosíranu sodného, 0,8 g citrátu železitoamonného, 0,08 g fenolové červeni a 14,5 g agaru. Typické kolonie *Salmonella* spp. na tomto agaru jsou barvy media, průsvitné, s černým středem. Takovéto kolonie produkují sirovodík, jsou xylóza, laktóza a sacharóza negativní. (Purkrtová, 2017)

Litr BGA obsahuje 7 g peptonu z masa, 5 g chloridu sodného, 15 g laktózy, 0,04 g fenolové červeni, 0,005 g brilantové zeleně a 13 g agaru. Obsah brilantové zeleni inhibuje růst grampozitivních bakterií, *Salmonella* Typhi a rod *Shigella*. Deoxycholát sodný inhibuje plazivost kolonií rodu *Proteus*. Kolonie *Salmonella* spp. na tomto agaru mají světle růžovou barvu, jsou průsvitné a obklopené červenými zónami. (Purkrtová, 2017)

Po získání charakteristických kolonií jsou tyto kolonie přeneseny do živného média. Následně se provádí biochemická a sérologická konfirmace. (Purkrtová, 2017)

1.2.1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium

Salmonella enterica subsp. *enterica* sérovar Typhimurium (zkráceně *Salmonella* Typhimurium) se běžně vyskytuje v lidských a zvířecích střevech. (Afshari a spol., 2018)

Jedná se o sérovar způsobující ročně přibližně 1,3 bilionu gastroenteritid, 16 milionů případů typhiodní horečky a 3 miliony úmrtí. Typické příznaky infekce jsou v rozsahu od gastroenteritidy, zvracení, nevolnosti až po sepsi, osteomyelitidu nebo meningitidu. (Ji-Yeon a spol., 2021) *Salmonella* Typhimurium je hlavním původcem salmonelózy ve Spojených státech. (Afshari a spol., 2018)

V posledních letech dochází k rozšiřování kmenů *Salmonella* Typhimurium s vícenásobnou rezistencí. Jako příklad můžeme uvést *Salmonella* Typhimurium fagotyp DT104, který byl poprvé izolován na konci 80. let ve Velké Británii. V současnosti je rozšířený i u dalších hospodářských zvířat (ovce, drůbež, prasata), zároveň je původcem lidských infekcí způsobených konzumací produktů z těchto zvířat. *Salmonella* Typhimurium fagotyp DT104 je rezistentní hlavně k ampicilinu, chloramfenikolu, streptomycinu, sulfonamidům a tetracyklinům, přičemž geny pro tuto rezistenci jsou chromosomální. Příležitostně se vyskytuje rezistence přenášená plazmidy. (Cloeckaert a Schwarz, 2001)

Dále můžeme zmínit *Salmonella* Typhimurium kmen LT2. Byl izolován ve 40. letech a použit při prvních studiích fágy zprostředkované transdukce. (McClelland a spol., 2001)

1.2.2 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Enteritidis

Salmonella enterica subsp. *enterica* sérovar Enteritidis (zkráceně *Salmonella* Enteritidis) se také běžně vyskytuje v lidských a zvířecích střevech. (Afshari a spol., 2018)

Salmonella Enteritidis tvoří biofilm, což zvyšuje její rezistenci k sanitacím prostředkům. Vliv na úroveň této rezistence má vnější prostředí, například teplota, pH, osmolarita, živiny a úroveň kyslíku. (Yang a spol., 2016)

U případů salmonelózy v roce 2013 v Evropě byla *Salmonella* Enteritidis původcem v 39,5 % případů laboratorně potvrzených případů salmonelózy. (Yang a spol., 2016)

Pro *Salmonella* Enteritidis jsou hlavním vehikulem, v souvislosti s lidskými infekcemi, vaječné skořápky. Mezi lety 1985-2003 mělo ve Spojených státech 75 % případů onemocnění v důsledku *Salmonella* Enteritidis souvislost s kontaminovanými vejci. Vejce jsou nejčastěji kontaminovány *Salmonella* Enteritidis již ve vejcovodu slepice na rozdíl od *Salmonella* Typhimurium, která se do vajec zpravidla dostává přes skořápku z prostředí. (Andino a Hanning, 2015)

2 ANTIBIOTIKA

Hlavní význam antibiotik spočívá v prevenci infekčních onemocnění. Antibiotika můžeme zjednodušeně definovat jako organické sloučeniny produkované mikroorganismy. Mají schopnost v nepatrné koncentraci specificky potlačovat růst nebo usmrctvat jiné mikroorganismy, než jsou produkční mikroorganismy. (Herold a spol., 1953)

Aby byl pojem antibiotikum dostatečně definován, je definici potřeba rozšířit. První rozšíření se týká látek, které brzdí růst mikroorganismů, ale neřadíme je mezi antibiotika, protože působí až v řádově vyšších koncentracích než antibiotika. (Herold a spol., 1953)

Druhé rozšíření se týká látek, které v širším slova smyslu řadíme mezi antibiotika. Jedná se o antibioticky účinné látky izolované ze zelených rostlin nebo živočišného původu (preparáty z rybích orgánů, členovců). (Herold a spol., 1953)

Třetí rozšíření zahrnuje antibiotika vyráběná metodami organické syntetické chemie. (Herold a spol., 1953)

2.1 Historie

Již ve starověkém písemnictví se dají nalézt stopy po využití mikroorganismů a jejich zplodin látkové výměny v lidových léčebných prostředcích. Vědecké poznatky v tomto poli začaly být ve větší míře shromažďovány v druhé polovině 19. století, ovšem tyto poznatky nabyly ceny až po samotném objevu antibiotik, jelikož poznatky o antibiotických vlastnostech mikroskopických vláknitých hub rodu *Penicillium* nepronikly v té době do praxe. K objevu penicilinu vedlo až pozorování Alexandera Fleminga v roce 1928. Alexander Fleming zkoumal kmeny *Staphylococcus aureus* v nemocnici St. Mary v Londýně. Na jedné z Petriho misek mu narostla mikroskopická vláknitá houba, v jejímž okolí se vytvořila zóna, kde byly kolonie *Staphylococcus aureus* brzděny v růstu a autolysovaly. (Herold a spol., 1953)

Alexander Fleming mikroskopickou vláknitou houbu izoloval a zjistil u ní antibiotické vlastnosti. Alexander Fleming tuto kulturu původně pojmenoval *Penicillium rubrum* (Herold a spol., 1953), nyní je tato kultura známá jako *Penicillium notatum*. (Machala a Beneš, 2011) V roce 1940 se podařilo tzv. oxfordské pracovní skupině objevit technickou metodu izolace a čištění penicilinu. Kvůli probíhající 2. světové válce a nedostatku chemoterapeutických preparátů nabyl objev penicilinu velký význam. Výzkumem výroby a klinického použití penicilinu se začaly zabývat nejvíce Anglie a Spojené státy americké, výzkum ale probíhal

i v Sovětském svazu nebo Československu. Ještě před rozvojem výroby penicilinu ve velkém měřítku bylo známo několik dalších antibiotik, například v roce 1942 byl objeven aktinomycetin nebo v roce 1939 byly objeveny gramicidin a tyrocidin. Význam antibiotik, jiných než penicilin, byl vyzdvihnut až po úspěšném uplatnění penicilinu. Jejich objev byl výsledkem systematické práce. Jednalo se například o streptomycin (objeven v roce 1944), chloramfenikol (1947) nebo chlortetracyklin (1948). (Herold a spol., 1953)

2.2 Mechanismus účinku

Mechanismus účinku značí způsob zásahu antibiotika do bakteriální buňky. Máme pět základních skupin, rozdělených podle způsobu zásahu.

2.2.1 Inhibice syntézy buněčné stěny

Buněčná stěna bakterií je tvořena peptidoglykanem, který se skládá z polymerních sacharidů a aminokyselin. Polymer je tvořen střídajícím se β -(1,4)-*N* acetylglukosaminem a zbytky kyseliny *N*-acetylmuramové. Ke kyselině *N*-acetylmuramové je připojeno 3-5 aminokyselin, často propojených prostřednictvím postranních řetězců. (Schaefer a spol., 2018)

Antibiotika, která inhibují syntézu buněčné stěny bakterie, jsou skupiny β -laktamových antibiotik a glykopeptidy. β -laktamová antibiotika se váží na přítomná penicilin vazebná místa buněčné stěny. (Fakulta veterinárního lékařství Brno, 2017), (Kapoor a spol., 2017)

Předpokládá se, že β -laktamový kruh imituje část peptidového řetězce D-alanyl-D-alanin, který se běžně na penicilin vazebná místa váže a zpevňuje tak buněčnou stěnu. Penicilin vazebná místa po navázání β -laktamového kruhu nejsou schopná účasti na syntéze peptidoglykanu, což následně vede k lýzi buňky. (Kapoor a spol., 2017)

U glykopeptidů dochází k navázání na část peptidového řetězce D-alanyl-D-alanin, který tak není schopen navázání na penicilin vazebné místo, což vede k inhibici syntézy buněčné stěny. (Kapoor a spol., 2017)

2.2.2 Narušení membrán buňky

Buněčné membrány jsou tvořeny fosfolipidovou dvojvrstvou, jejichž hydrofobní konce směřují dovnitř. Vnější membrána gramnegativních bakterií je nepropustná pro nabitě molekuly, jejich pasivní transport do periplazmatického prostoru je zprostředkován poriny. Periplazmatický prostor má vysokou koncentraci proteinů a peptidoglykanu, transport

z periplazmatického prostoru probíhá pomocí transportních a signálních proteinů obsažených v cytoplazmatické membráně. (Mechanisms of Microbial Control)

U gramnegativních bakterií je důležitý průnik antibiotika skrz vnější membránu bakterií. Antibiotika ji narušují navázáním na lipopolysacharidy. Tato antibiotika mají lipofilní i hydrofilní skupiny, což jim umožní průnik do membrány bakterií. Hydrofobní konce mají způsob působení podobný detergentu. Dochází k porušení propustnosti membrány a iontové rovnováhy v buňce. Následně dochází k zániku buňky. (Mechanisms of Microbial Control), (Ceccarelli a spol., 2004)

Při odstranění hydrofobního konce antibiotik ztrácí baktericiditu, stále však zvyšuje permeabilitu pro jiná antibiotika. (Mechanisms of Microbial Control)

2.2.3 Inhibice syntézy nukleových kyselin

Antibiotika inhibující syntézu nukleových kyselin pomocí inhibice DNA-gyrázy, čímž zabrání transkripci deoxyribonukleové kyseliny. DNA-gyráza se skládá z dvou podjednotek A a dvou podjednotek B. Podjednotky A vykonávají stříh a zacelení deoxyribonukleové kyseliny, podjednotky B odstraňují negativní nadšroubovicové obrátky. Dále může docházet k inhibici RNA-polymerázy. (Fakulta veterinárního lékařství Brno, 2017), (Kapoor a spol., 2017)

Tímto způsobem účinkují fluorochinolony, kdy se váží na podjednotky A a zamezují jejich funkci. U gramnegativních bakterií dochází k vazbě na bakteriální topoizomerázu II, u grampozitivních bakterií je to vazba na topoizomerázu IV. Klasické fluorochinolony mají vysokou afinitu k topoizomeráze IV, k topoizomeráze II je afinita nízká. (Kapoor a spol., 2017), (Tejkalová, 2015)

2.2.4 Inhibice syntézy proteinů

Začátkem syntézy proteinů je transkripce uskutečněná DNA dependentní RNA polymerázou. (Šípek, 2014) Během transkripce dochází k překládání genetické informace z deoxyribonukleové kyseliny na mediátorovou ribonukleovou kyselinu. Následuje proces translace, kdy mediátorová ribonukleová kyselina se napojuje na ribozom. Ribozom je tvořen dvěma podjednotkami, 30S a 50S podjednotkami. (Kapoor a spol., 2017) Podjednotka 50S je tvořena přibližně 30 proteiny a 2 molekulami ribozomální ribonukleové kyseliny, 5S a 23S ribozomální ribonukleové kyseliny. Podjednotka 30S je tvořena přibližně 20 proteiny a molekulou 16S ribozomální ribonukleové kyseliny. (Šípek, 2014)

Antibiotika inhibují syntézu proteinů vazbou k ribozomálním podjednotkám, čímž snižují tvorbu proteinu. Mohou také zabraňovat vestavbě aminokyselin do bílkovin. (Fakulta veterinárního lékařství Brno, 2017), (Kapoor a spol., 2017)

K podjednotce 30S se váží aminoglykosidy a tetracykliny, jejich cílem je 16S ribozomální ribonukleová kyselina. 16S ribozomální ribonukleová kyselina se skládá z 1542 nukleotidů, obsahuje jak konzervované oblasti, tak oblasti variabilní. (VŠCHT Praha) Aminoglykosidy interagují s 16S ribozomální ribonukleovou kyselinou 30S podjednotky v blízkosti místa A pomocí vodíkových vazeb. Způsobují chybné čtení informace a předčasné ukončení translace. Tetracykliny působí na konzervované oblasti 16S ribozomální ribonukleovou kyselinou 30S podjednotky. Zabraňují navázání transferové ribonukleové kyseliny k místu A. (Kapoor a spol., 2017)

K podjednotce 50S se váží makrolidy, linkosamidy a chloramfenikol. Makrolidy a linkosamidy ovlivňují konzervované sekvence peptidyl transferázového centra 23S ribozomální ribonukleové kyseliny 50S podjednotky, což má za následek předčasné uvolnění aminokyselinového řetězce. Chloramfenikol také ovlivňuje konzervované sekvence peptidyl transferázového centra 23S ribozomální ribonukleové kyseliny 50S podjednotky, kdy zabraňují navázání transferové ribonukleové kyseliny k místu A. (Kapoor a spol., 2017)

2.2.5 Inhibice metabolismu

Tento mechanismus účinku vykazují sulfonamidy a trimethoprim. Jejich kombinace vykazuje synergii a snižuje tvorbu rezistence na ně. Antibiotika inhibují metabolismus kyseliny listové v bakteriální buňce. Mohou bránit tvorbě kyseliny listové, čímž brání v syntéze nukleotidů. Tento mechanismus vykazují sulfonamidy, kdy mají vyšší afinitu k enzymu než přirozený substrát. Další variantou je interference s reduktázou kyseliny dihydrolistové, což je mechanismus u trimethoprimu. (Fakulta veterinárního lékařství Brno, 2017), (Agropress.cz, 2017), (Kapoor a spol., 2017)

2.3 Metody zjišťování citlivosti mikroorganismů na antibiotikum

Pro vyšetřování citlivosti bakterií k antibiotiku se používají diluční metody/mikrometody nebo difúzní metody. (Urbášková, 2014)

2.3.1 Difúzní metoda

Difúzní metoda je jedním z nejstarších způsobů vyšetřování antibiotické citlivosti a jednou z nejpoužívanějších metod v klinických laboratořích. Pro stanovení *Enterobacteriaceae* je používán agar Muller Hinton (MH). (Urbášková, Jakubů a Žemličková, 2021) Jedná se o tuhé médium běžně používané pro stanovení citlivosti k antibiotikům. (Sigma-Aldrich, Inc., 2021)

U stanovovaných bakterií je připraveno inokulum se zákalom odpovídajícím stupni 0,5 McFarlandova zákalového standardu (přibližně $1-2 \times 10^8$ CFU/ml u *Escherichia coli*). McFarlandův zákalový standard odpovídá roztoku připraveném z 99,5 ml 0,18 mol/l kyseliny sírové a 0,5 ml 0,048 mol/l chloridu barnatého. Zákal suspenze se změří na spektrofotometru v kyvetě s optickou dráhou 1 cm. Absorbance při 625 nm by měla být v rozmezí od 0,08 do 0,13. U všech bakterií se využívá přímý roztěr. Následně se na misku umístí antibiotické disky v dostatečné vzdálenosti, aby nedošlo k překryvu inhibičních zón. Inkubace u *Enterobacteriaceae* probíhá při 35 ± 1 °C na vzduchu po dobu 18 ± 2 hodiny. Odečítání se u všech antibiotik provádí ve vzdálenosti 30 cm od oka, od bodu úplné inhibice viditelné pouhým okem. U obtížně viditelných zón pomůže naklonění plotny do úhlu 45 ° proti stolu. (Urbášková, Jakubů a Žemličková, 2021) Průměr inhibiční zóny vytvořené kolem antibiotického disku je udáván v milimetrech. (Urbášková, 2014)

2.3.2 Diluční metoda

Diluční metoda je využívána pro hodnocení účinku antibiotika stanovením minimální inhibiční koncentrace (MIC) v miligramech na litr (Urbášková, 2014), což je nejmenší naměřené množství inhibující růst a množení bakterií v testovacím médiu, a minimální baktericidní koncentrace (MBC), také v miligramech na litr, která odpovídá nejnižší naměřené koncentraci *in vitro*, schopnou usmrtit exponovanou bakteriální kulturu v průběhu dvaceti čtyř hodin (Fakulta veterinárního lékařství Brno, 2017)

U diluční metody je za referenční považována agarová diluční metoda. Dále je možno se setkat s bujónovou diluční metodou. Obě metody byly vytvořeny pro ve vodě rozpustné látky, u antibiotik jsou tedy aplikovatelné bez modifikace. Minimální inhibiční koncentrace se ovlivněna způsobem přípravy a koncentrací inokula, použitým médiem, dobou působení a určením konce testu. (Griffin, Markham a Leach, 2000) Při použití diluční metody se často přistupuje k použití mikrometody (Urbášková, 2014) za účelem snížení potřeby materiálů.

3 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE

Rezistence mikroorganismu k antibiotikům je největší nebezpečí spojené s rozšířeným používáním antibiotik. Antibiotická rezistence je buď přirozená, nebo získaná. Získaná rezistence je rozšířenější a představuje větší problém z hlediska použití antibiotik, protože antibiotika ztrácí účinnost k dříve citlivým bakteriím. (Spížek, 1999)

3.1 Přirozená antibiotická rezistence

Přirozená antibiotická rezistence je dána konkrétním druhem bakterie a jeho přirozenými vlastnostmi. Bakterie jsou rezistentní k antibiotiku díky absenci cílové struktury nebo neschopnosti antibiotika zasáhnout do struktury. Přirozená vícenásobná rezistence se může vyskytnout u bakterií dříve vystavených účinkům antibiotik. (Spížek, 1999)

3.2 Získaná antibiotická rezistence

Získaná antibiotická rezistence se objevuje u bakterií, které byly původně citlivé k antibiotiku, ale v důsledku mutací nebo přenosu genetické informace se k němu staly rezistentní. U mutací je může jednat o bodovou mutaci, delecii (odstranění části genu), substituci (nahrazení genu) nebo adici (přidání bází k deoxyribonukleové kyselině (DNA)). (Spížek, 1999)

Přenos genetické informace probíhá pomocí plazmidů, transpozonů nebo genových kazet. Plazmidy představují extrachromozomální DNA bakteriální buňky. Mohou přenášet rezistenci k jednomu nebo více antibiotikům. K jejich přenosu běžně dochází konjugací, může k němu docházet i transdukcí pomocí bakteriofágů nebo transformací DNA bez nosiče. Transpozony jsou sekvence DNA schopné pohybu z jedné replikační jednotky na druhou. Genové kazety se skládají pouze z jednoho genu kódujícího rezistenci k určitému antibiotiku a integronů. Integrony zprostředkovávají místo pro integraci kazety a kód enzymu pro její pohyb. Samy integrony jsou také schopny přemístění, což umožňuje přenos genů mezi širokým spektrem hostitelů. Integrony jsou schopné se spojit s transpozony nesoucími více genů pro rezistenci. Tato skutečnost vede ke vzniku vícenásobně rezistentních bakterií. (Spížek, 1999)

3.3 Příčiny vzniku antibiotické rezistence

Vznik antibiotické rezistence v letech následujících krátce po jejich zavedení měl původ ve víře v zázračnost jejich účinku. Pacienti se tak často sami dožadovali jejich použití, přestože bylo neadekvátní. (Herold a spol., 1953)

Antibiotika by se měla používat pouze v případě, kdy je jasně prokázána infekční povaha onemocnění. Mělo by být prokázáno, je-li to možné, že léčené onemocnění je způsobené mikroorganizmem, který je na použité antibiotikum citlivý. Antibiotika by se nikdy neměla poddávkovat a měly by být dodržovány předepsané intervaly mezi podávanými dávkami. Započatá léčba antibiotiky by se nikdy neměla předčasně ukončit. (Herold a spol., 1953)

Na vývoj antibiotické rezistence má vliv i využívání antibiotik k léčbě hospodářských zvířat a domácích mazlíčků, kde taktéž může docházet k nadužívání či řádnému nedoužívání antibiotik. U hospodářských zvířat jsou antibiotika používána v medicínsky odůvodněných případech. Využití antibiotik minimalizuje četnost, závažnost a zdravotní dopady výskytu infekčních onemocnění zvířat a s tím spojené nepříznivé ekonomické dopady. Od roku 2006 je v celé Evropské unii zakázáno používat antibiotika jako stimulatory růstu a produkce u potravinových zvířat. (Vorlíček, 2018)

Vlivu využívání antibiotické léčby u domácích mazlíčků se začala věnovat větší pozornost v posledních letech, neboť byla prokázána rostoucí rezistence mezi bakteriemi způsobujícími jejich infekční onemocnění. Rezistentní bakterie zahrnují např. *Staphylococcus intermedius* a *Escherichia coli*. (Lloyd, 2007)

Rezistence se nemusí týkat pouze původce léčeného onemocnění, ale mohou ji získat i saprofyti žijící v těle. (Herold a spol., 1953)

3.4 Mechanizmy antibiotické rezistence

Mechanismus rezistence se liší v závislosti na zkoumaném antibiotiku, ale obecně se dá rozčlenit na změnu cíle působení v buňce, enzymatické upravení nebo zničení antibiotika nebo omezení hromadění antibiotika v buňce jeho pasivním či aktivním vylučováním buňkou. (Poole, 2002)

3.4.1 Změna cíle působení

Změny v cíli působení antibiotik vedou k zamezení interakce antibiotik a brání jejich baktericidnímu či bakteriostatickému efektu. Změna často je způsobena spontánní mutací bakteriálního chromozomálního genu. (Kapoor a spol., 2017),

Tyto změny zahrnují změny v jejich vazném místě na ribozomu, produkci peptidu nebo proteinu s nízkou afinitou k antibiotiku, mutaci DNA-gyrázy a topoizomerázy IV. (Poole, 2002)

U změny vazného místa na ribozomu jde o zamezení inhibice proteosyntézy alternací podjednotek 30S a 50S. U gram pozitivních bakterií dochází k alternaci D-alanyl-D-alaninu, který se váže ke glykopeptidu antibiotika a dochází tak k inhibici syntézy buněčné stěny, na D-alanyl-laktát. Antibiotikum se na D-alanyl-laktát není schopno navázat. Tímto způsobem vzniká rezistence k vankomycinu nebo teikoplaninu. (Kapoor a spol., 2017)

Mutace genů kódujících DNA-gyrázu a topoizomerázu IV vede k selhání replikace a navázání antibiotika. Tímto způsobem vzniká rezistence k fluorochinolonům. (Kapoor a spol., 2017)

3.4.2 Nepropustnost

Aby antibiotika mohla být účinná, musí být schopná proniknout dovnitř bakteriální buňky. Molekuly látek se do buňky dostávají pomocí difúze přes poriny, dvojrvtvu membrány nebo samočinnou absorpci. Antibiotika s malou hydrofilní molekulou se do buňky dostávají pouze pomocí porinů. Rezistence spočívá v omezení propustnosti buněčné membrány pro antibiotikum pomocí snížení počtu porinů v membráně. (Kapoor a spol., 2017)

U gramnegativních bakterií je hlavní bariérou, co se týče propustnosti, vnější membrána. Vnější membrána se dá alespoň z části považovat za příčinu větší rezistence u gramnegativních bakterií. Zdá se však, že vnější membrána je významná v dodatečném mechanismu rezistence, působí synergicky s dalšími mechanismy rezistence. (Poole, 2002)

Další možností je tvorba biofilmu bakteriemi, kdy biofilm je přirozeně velmi odolný k pronikání antibiotik. (Poole, 2002)

3.4.3 Enzymatické upravení nebo zničení antibiotika

Rezistence vzniká přirozeným nebo mutačním odstraněním represí chromozomálních genů, nebo pokud buňka získá extrachromozomální genetický materiál nesoucí geny představující antibiotickou rezistenci. (Poole, 2002)

V buňce může docházet k syntéze enzymů inaktivujících molekulu antibiotika (např. β -laktamázy), což je mechanismus charakteristický pro gramnegativní bakterie. U grampozitivních bakterií dochází k modifikaci penicilin vazebných proteinů, čímž se snižuje afinita k β -laktamům. (Kapoor a spol., 2017)

β -laktamázy hydrolyzují β -laktamy, které mají esterovou a amidovou vazbu. V současnosti je známo přibližně 300 β -laktamáz, jsou rozdělovány dle struktury nebo funkce. Strukturálně jsou děleny na 4 skupiny – β -laktamázy tříd A, B, C, D. β -laktamázy třídy A jsou jinak nazývané penicilinázy. Dva běžně se vyskytující zástupci, TEM-1 a SHV-1, jsou předchůdci širokospektrých β -laktamáz. Byli objeveni v *Enterobacteriaceae*. (Kapoor a spol., 2017)

První případy produkce širokospektré β -laktamázy byly zjištěny v roce 1983, jejich produkce je dosud pozorována hlavně u *Enterobacteriaceae*. Většina širokospektrých β -laktamáz je kódována v plazmidech, jejich projev se liší intenzitou a vlivem na biochemické vlastnosti. (Giske a spol., 2017)

β -laktamázy třídy B představují metalo- β -laktamázy, které vyžadují pro činnost přítomnost zinku nebo těžkých kovů. (Kapoor a spol., 2017)

β -laktamázy třídy C jsou jinak nazývané cefalosporinázy. Produkují je všechny gramnegativní bakterie s výjimkou bakterií *Salmonella* a *Klebsiela*. Představitelem cefalosporináz je AmpC β -laktamáza, způsobující rezistenci ke všem β -laktamům kromě karbapenemům. (Kapoor a spol., 2017)

Poprvé byly pozorovány na konci 80. let 20 století, v současnosti je jejich frekvence výskytu v Evropě nižší než u širokospektrých β -laktamáz. AmpC β -laktamáza může být produkována jako přirozený enzym konstitutivně ve stopovém množství nebo indukovaně, dále se může vyskytovat jako získaný enzym, kdy je obvykle kódována v plazmidech. (Giske a spol., 2017)

β -laktamázy třídy D se běžně nacházejí v *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonas aeruginosa*. Jedná se o enzymy hydrolyzující oxacillin. (Kapoor a spol., 2017)

Další enzymatické působení vedoucí k rezistenci představují enzymy modifikující antibiotika. Jedná se o chemickou modifikaci aminoglykosidu odpovědného za navázání antibiotika k jejich vazném místě na ribozomu na 30S podjednotce. Tímto mechanismem vzniká rezistence k aminoglykosidům a fluorochinolonům. (Poole, 2002), (Kapoor a spol., 2017)

Malé množství gram pozitivních a gram negativních bakterií je rezistentních k chloramfenikolu. Rezistence je výsledkem působení enzymu chloramfenikol transacetyláza, který zabraňuje navázání antibiotika k 50S podjednotce ribozomu. (Kapoor a spol., 2017)

3.4.4 Vyplavování antibiotika z buňky

Bakterie se snaží o udržení nízké nitrobuněčné koncentrace antibiotika tím, že jsou antibiotika vylučována z buňky pomocí efluxních pump. Jedná se o membránové proteiny přítomné v cytoplazmatické membráně, jejichž účelem je vyloučit antibiotikum dříve, než dosáhne cílové struktury. (Kapoor a spol., 2017)

Geny zodpovědné za vylučování antibiotika z buňky jsou obvykle kódovány plazmidy nebo transpozony. Bakterie tak získávají tuto rezistenci z externích zdrojů. (Poole, 2002)

Nejčastěji se tento druh rezistence spojuje s tetracykliny a fluorochinolony jak u gram pozitivních, tak gram negativních bakterií. U fluorochinolonů se s touto rezistencí často spojuje rezistence na více antibiotik, díky široké substrátové specifitě. Dále se tato rezistence dá nalézt u makrolidů, β -laktamů, aminoglykosidů nebo tetracyklinu. (Poole, 2002) K vylučování pomocí efluxu není citlivý polymyxin. (Kapoor a spol., 2017)

4 VYBRANÁ ANTIBIOTIKA S MOŽNOU ZÍSKANOU REZISTENCÍ U ENTEROBAKTERIÍ

V této kapitole jsou zmíněná antibiotika, která jsou využívána jako indikátorová ke zjištění rezistence k dalším antibiotikům dané skupiny.

Studie prováděná na 100 výrobcích z drůbežního masa pocházejících z města Lugo v severozápadním Španělsku v období od září 2016 do září 2017 zjistila u izolované *Escherichia coli* rezistenci na ampicilin u 82,7 % izolátů, u ciprofloxacinu byla rezistence 71,8 %, u cefotaximu pak činila 47,7 %. Zjištěná rezistence pro ceftazidim byla 39,6 %, pro ceftoxitin činila 2,5 %. 19,8 % rezistence byla zjištěna pro gentamicin. U chloramfenikolu byla rezistence zjištěna u 32,2 % izolátů, u tigecyklinu byla rezistence 0,3 %. 79,9 % izolátů bylo vícenásobně rezistentních. (Díaz-Jiménez a spol., 2021)

Studie prováděná na drůbežích a prasečích farmách v Dar es Salaam v Tanzanii uvádí, že zjištěná rezistence u *Escherichia coli* izolované z drůbeže na ciprofloxacin byla 28,5 %, u chloramfenikolu byla 27,2 % a u gentamicinu 27,7 %. 39,0 % rezistence byla zjištěna pro ampicilin, u cefotaximu byla 36,4 % a u meropenemu 3,3 %. Celkem bylo zkoumáno 236 izolátů. U prasat byla rezistence na ciprofloxacin 28,6 %, u chloramfenikolu byla 27,3 % a u gentamicinu 26,0 %. 46,4 % rezistence byla zjištěna pro ampicilin, u cefotaximu byla 29,5 % a u meropenemu 3,6 %. Celkem bylo zkoumáno 225 izolátů. (Kimera a spol., 2021)

U *Salmonella* spp. izolované z jatečně upravených těl skotu a zpracovatelského prostředí na jatkách v Abuji v Nigérii byla zjištěna rezistence u 9 % izolátů na chloramfenikol. Bakterie byly 100 % citlivé na gentamicin. Byla zjištěna 100 % rezistence u ampicilinu. (Shaibu a spol., 2021)

Studie z 22 farem z provincie Hubei v Číně zjistila v 896 vzorcích přítomnost *Salmonella* spp. v 17,30 % případů, přičemž 95,33 % z nich bylo rezistentních k více než třem skupinám antibiotik. U chloramfenikolu byla rezistence 100 %, u cefotaximu činila 37,38 %, u gentamicinu pak 34,58 % a u ciprofloxacinu byla 24,3 %. (Xu a spol., 2021)

4.1 Ampicilin

Jedná se o polosyntetický penicilin, který má širší spektrum účinku. Poprvé byl připravený v roce 1961. Chemicky se jedná o α -aminobenzyl penicilin. Ampicilin je štěpen řadou β -laktamáz, proto se v posledních letech často využívá jeho kombinace s blokátory účinku penicilináz (například kyselina klavulanová, sulbaktam nebo tazobaktam). (Hejzlar, 1995)

Ampicilin narušuje syntézu enzymů nutných pro konečnou fázi výstavby buněčné stěny bakterií. K ampicilinu jsou přirozeně citlivé gramnegativní bakterie, přirozeně neprodukují penicilinázy. Rezistence na něj vzniká díky geneticky kódované produkci β -laktamáz. Rezistence může být řízena chromozomálně nebo plasmidy. (Hejzlar, 1995)

Ampicilin může antagonizovat bakteriostatický účinek chloramfenikolu, erytromycinu a tetracyklinů. Nesmí se podávat s aminoglykosidy kvůli vzájemné inaktivaci. (Fakulta veterinárního lékařství Brno, 2017)

Rezistence na ampicilin se určuje u *Escherichia coli*. Rezistence na ampicilin indikuje rezistenci k piperacilinu. (Urbášková, 2020) U diskové difúzní metody se používá disk s obsahem 10 μ g ampicilinu. Jako rezistentní se vyhodnocuje inhibiční zóna o průměru menším než 14 mm. Na některých šaržích MH agarů se projevuje růst jako úzká vnitřní zóna, která se ignoruje. (Urbášková a Žemličková, 2021)

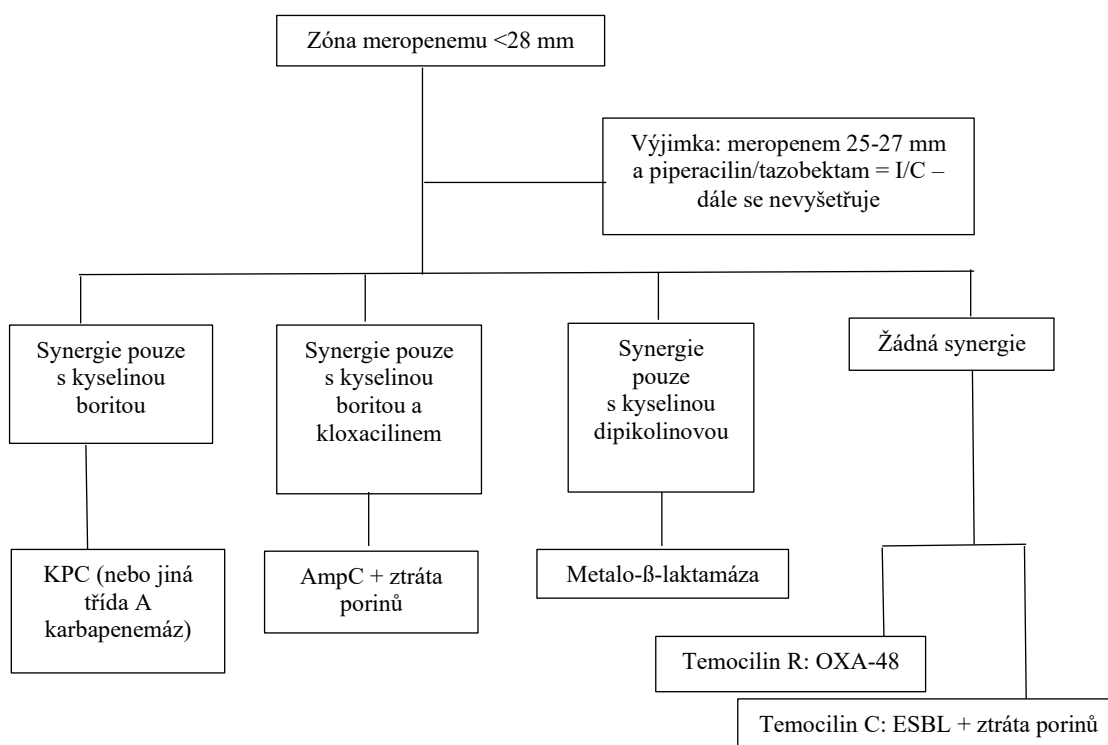
4.2 Meropenem

Meropenem je antibiotikum řadící se ke karbapenemům. Karbapenemy jsou β -laktamová antibiotika se širokým spektrem účinku. Představují rezervní antibiotika pro léčbu závažných infekcí. (Suchopár a Koblihová, 2008)

Meropenem inhibuje syntézu bakteriální stěny a snadno penetruje do bakterií. Rezistence na něj vzniká následkem snížení permeability vnější membrány gramnegativních bakterií a snížení afinity k cílovým penicilin-vazebným proteinům. Dále pak může dojít ke zvýšené expresi komponent efluxních pump a tvorbě β -laktamáz. Pokud se vyskytne rezistence v důsledku nepropustnosti nebo efluxu, bakterie budou pravděpodobně rezistentní i k jiným třídám antibiotik. (MEROPENEM ACCORD, 2019)

Rezistence na meropenem se určuje u *Escherichia coli* i *Salmonella* spp. Rezistence na meropenem indikuje produkci karbapenemázy. U diskové difúzní metody se používá disk s obsahem 10 μ g meropenemu. Inhibiční zóna o průměru menším než 25-27 mm poukazuje

na možnou produkci karbapenemáz. Pokud je zároveň zjištěna rezistence k piperacilinu/tazobaktamu a/nebo k temocilinu, provádí se další vyšetření na produkci karbapenemáz. U inhibiční zóny menší než 25 mm se vyšetření provádí vždy. Algoritmus pro detekci karbapenemáz je znázorněn na Obrázku 3. Žádná synergie se v dalším vyšetřování nemusí projevit při produkci několika karbapenemáz. (Giske a spol., 2017)



Obrázek 3 Algoritmus pro detekci karbapenemáz (Giske a spol., 2017)

4.3 Cefotaxim

Cefotaxim je cefalosporinové antibiotikum III. generace s baktericidním účinkem. Cefotaxim je odolný k působení β -laktamáz. Vykazuje účinnost u kmenů bakterií s vícenásobnou rezistencí k jiným antibiotikům. Antibakteriální účinnost je dána inhibicí syntézy mukopeptidů buněčné stěny bakterií. (SEFOTAK, 2018)

Inhibice syntézy bakteriální stěny je možná pomocí vysoké afinity k penicilin-vazebným proteinům. (Cefotaxime, 2021)

Rezistence na cefotaxim se určuje u *Escherichia coli* i *Salmonella* spp. U diskové difúzní metody se používá disk s obsahem 5 μ g cefotaximu. V kombinaci s ceftazidimem se používá při screeningu produkce širokospektré β -laktamázy (ESBL). Za rezistentní se považuje v případě, kdy je inhibiční zóna menší než 21 mm. Při vyhodnocení screeningu jako pozitivního k produkci ESBL se provádí konfirmace. *Escherichia coli* i *Salmonella* spp. patří

do 1. skupiny, která je prověřována pomocí cefotaximu a ceftazidimu +/- kyselina klavulanová. (Giske a spol., 2017)

Cefotaxim je také používán k detekci získané AmpC společně s cefoxitinem. Místo cefoxatimu je možné použít ceftazidim. (Giske a spol., 2017)

4.4 Ceftazidim

Ceftazidim patří mezi cefalosporinové antibiotikum III. generace. Mechanismus účinku ceftazidimu spočívá v inhibici syntézy stěny bakterií díky navázání k penicilin-vazebným proteinům. (CEFTAZIDIM KABI, 2017)

K rezistenci na ceftazidim může docházet prostřednictvím hydrolyzy antibiotika β -laktamázami, snížení afinity ceftazidimu k penicilin-vazebným proteinům nebo nepropustností vnější membrány u gramnegativních bakterií. Další možný mechanismus rezistence spočívá v bakteriální efluxní transmembránové pumpě. (CEFTAZIDIM KABI, 2017)

Rezistence na ceftazidim se určuje u *Escherichia coli* i *Salmonella* spp. U diskové difúzní metody se používá disk s obsahem 10 μ g ceftazidimu. V kombinaci s cefotaximem se používá při screeningu produkce širokospektré β -laktamázy (ESBL). Za rezistentní se považuje v případě, kdy je inhibiční zóna menší než 22 mm. Při vyhodnocení screeningu jako pozitivního k produkci ESBL se provádí konfirmace. *Escherichia coli* i *Salmonella* spp. patří do 1. skupiny, která je prověřována pomocí cefotaximu a ceftazidimu +/- kyselina klavulanová. (Giske a spol., 2017)

Ceftazidim je také používán k detekci získané AmpC společně s cefoxitinem. Místo ceftazidimu je možné použít cefoxatim. (Giske a spol., 2017)

4.5 Cefoxitin

Cefoxitin je cefalosporinové antibiotikum řadící se do II. generace. (Vorlíček, 1995) Jedná se o polosyntetické širokospektré antibiotikum.

Cefoxitin působí prostřednictvím inhibice syntézy buněčné stěny. (Cefoxitin, 2021) Rezistence k cefoxitinu vychází k jeho citlivosti k účinku β -laktamáz. (Vorlíček, 1995)

Rezistence na cefoxitin se určuje u *Escherichia coli* i *Salmonella* spp. U diskové difúzní metody se používá disk s obsahem 30 μ g cefoxitinu. V kombinaci s cefotaximem nebo ceftazidimem se používá při detekci získané AmpC. Za rezistentní se považuje v případě,

kdy je inhibiční zóna menší než 19 mm. Při detekování synergie s kloxacilinem je předpoklad přítomnosti AmpC. U *Escherichia coli* se pomocí polymerázové řetězové reakce rozliší, zda se jedná o AmpC plazmidovou a chromozomální. U *Salmonella* spp. chromozomální AmpC chybí, je zde detekován výskyt plazmidové AmpC. Pokud nedochází k synergii s kloxacilinem, jedná se o jiný mechanismus rezistence. (Giske a spol., 2017)

4.6 Ciprofloxacin

Ciprofloxacin se řadí mezi chinolonová antibiotika. Mechanismus účinku spočívá v inhibičním působení na topoizomerázu II (DNA-gyrázu) a topoizomerázu IV. Tyto dva enzymy jsou potřebné k replikaci, transkripci, opravě a rekombinaci bakteriální DNA. (CIFLOXINAL, 2020)

Rezistence na ciprofloxacin může vzniknout mutací cílového místa u obou topoizomeráz. Při jednotlivých mutacích nemusí dojít k následné rezistenci, u násobných mutací obvykle k rezistenci dochází na většinu aktivních látek nebo na všechny aktivní látky v rámci skupiny. Citlivost na ciprofloxacin může být ovlivněna efluxním mechanismem nebo nepropustností. Je také zaznamenána rezistence zprostředkovaná plazmidem. (CIFLOXINAL, 2020)

Rezistence na ciprofloxacin se určuje u *Escherichia coli* diskovou difúzní metodou. Používá disk s obsahem 5 µg ciprofloxacinu. Jako rezistentní se vyhodnocuje inhibiční zóna o průměru menším než 22 mm. Rezistence k ciprofloxacinu zde indikuje rezistenci ke všem flourochinolonům. (Urbášková, 2020) U *Salmonella* spp. není použití diskové difúzní metody s 5 µg diskem ciprofloxacinu spolehlivé k detekci nízkého stupně rezistence. (Urbášková a Žemličková, 2021) Může být použita metoda diluční, kdy minimální inhibiční koncentrace vyšší než 0,06 mg/l se vyhodnocuje jako rezistentní k ciprofloxacinu a nedoporučuje se použití dalších flourochinolonů k léčbě. (Urbášková, 2020)

4.7 Perfloxacin

Perfloxacin patří do skupiny fluorochinolonových antibiotik. Vyznačuje se efektivitou proti gramnegativním aerobním bakteriím (např. *Escherichia coli*) i grampozitivním bakteriím (např. *Staphylococcus aureus*). (Pefloxacin, 2021)

Účinek perfloxacinu spočívá v narušení aktivity bakteriálních enzymů topoizomerázy II (DNA-gyrázy) a topoizomerázy IV, které jsou potřebné k transkripci a replikaci DNA. U

gramnegativních bakterií je primárním místem účinku topoizomeráza II, u grampozitivních bakterií je primárním místem účinku topoizomeráza IV. (Pefloxacin, 2021)

U *Salmonella* spp. se pefloxacin nahrazuje ciprofloxacin u diskové difúzní metody u screeningu rezistence k flourochinolonům. Používá se disk s 5 µg pefloxacinu, kdy se jako rezistentní vyhodnocuje inhibiční zóna menší než 24 mm. (Urbášková a Žemličková, 2021)

4.8 Gentamicin

Gentamicin je produkován *Micromonospora purpurea*. Objeven byl v roce 1963. Vyznačuje se baktericidním působením na gramnegativní bakterie a stafylokoky. (Hejzlar, 1995)

Mechanismus účinku spočívá v ovlivnění proteosyntézy a částečně i funkce cytoplazmatické membrány. Rezistence ke gentamicinu je řízena chromozomálně nebo plazmidicky, převažuje enzymatická destrukce prostřednictvím acetyláz a fosfotransferáz. (Hejzlar, 1995)

Gentamicin může působit nefrotoxicky a ototoxicky, můžeme se také setkat s kumulací. Může docházet k prostupu placentární bariérou. Gentamicin vykazuje synergii s β-laktamy. (Fakulta veterinárního lékařství Brno, 2017)

Rezistence na gentamicin se určuje u *Escherichia coli* i *Salmonella* spp. Rezistence na gentamicin indikuje rezistenci k ostatním aminoglykosidům. U diskové difúzní metody se používá disk s obsahem 10 µg ampicilinu. Jako rezistentní se vyhodnocuje inhibiční zóna o průměru menším než 17 mm. (Urbášková, 2020)

4.9 Tigecyklin

Tigecyklin se řadí mezi glycylykliny, což je skupina antibiotik odvozená od tetracyklinů. Chemicky se jedná o 9-t-butylglycylamido derivát minocyklinu (minocyklin patří do II. generace tetracyklinů), který byl v České republice poprvé zaregistrován v roce 2006. (Vojtová a Urbánek, 2008) Účinek tigecyklinu je považován za bakteriostatický.

Tigecyklin inhibuje translaci proteinů vazbou na ribozomální podjednotku 30S. Měl by být schopný překonat mechanismy rezistence k tetracyklinům spočívající v ribozomální ochraně a efluxu. (TIGECYCLINE ACCORD)

Tigecyklin je náchylný k vzniku rezistence v důsledku chromozomálně kódovaných mnohočetných efluxních pump, může zde docházet ke zkřížené rezistenci u bakterií rezistentních na minocyklin. (TIGECYCLINE ACCORD)

Rezistence na tigecyklin se určuje u *Escherichia coli*, účinek tigecyklinu u *Enterobacteriaceae* se různí. Tigecyklin by se měl hlásit jako rezistentní bez ohledu na výsledek vyšetření citlivosti. Tigecyklin se také používá k předpovědi k citlivosti k doxycyklinu u *Yersinia enterocolitica*. U diskové difúzní metody se používá disk s obsahem 15 µg tigecyklinu. Jako rezistentní se vyhodnocuje inhibiční zóna o průměru menším než 18 mm. (Urbášková, 2020), (Urbášková a Žemličková, 2021)

4.10 Chloramfenikol

Chloramfenikol byl poprvé izolován v roce 1947, od svého uvedení se řadí v určitých indikacích k nejspolehlivějším antibiotikům. Chloramfenikol účinkuje na většinu grampozitivních i gramnegativních bakterií a většinu anaerobních bakterií. Inhibuje také chlamydie, hemofily a bordetely. (Hejzlar, 1995)

Chloramfenikol inhibuje bakteriální proteosyntézu (Hejzlar, 1995), zasahuje také do metabolismu tuků. (Fakulta veterinárního lékařství Brno, 2017) Rezistence k němu vzniká díky produkci acetyltransferáz nebo změnou konformace ribozomálních cílových struktur. Jedná se o chromozomální rezistenci, která představuje až 50 % všech případů. (Hejzlar, 1995) Často spojená s rezistencí na tetracykliny.

Použití chloramfenikolu je zakázáno u potravinových zvířat (Hejzlar, 1995) kvůli nebezpečí při jakékoliv koncentraci reziduí. (Chloramfenikol vytvářený bakteriemi v půdě, 2013)

Může vyvolat poruchy hematopoetického systému (aplastická anémie) (Fakulta veterinárního lékařství Brno, 2017), které se mohou projevit i několik měsíců po ukončení léčby. (Hejzlar, 1995)

Rezistence na chloramfenikol se určuje u *Escherichia coli* i *Salmonella* spp. U diskové difúzní metody se používá disk s obsahem 30 µg chloramfenikolu. Jako rezistentní se vyhodnocuje inhibiční zóna o průměru menším než 17 mm. (Urbášková a Žemličková, 2021)

ZÁVĚR

Práce shrnuje poznatky o dvou nejznámějších enterobakteriích izolovaných z potravin, *Escherichia coli* a *Salmonella enterica*. U těchto enterobakterií zmiňuje jejich charakterizaci, potraviny, ve kterých se zjišťuje jejich přítomnost a metody detekce v potravinách.

Práce se dále zabývala antibiotiky, konkrétně jejich objevem v roce 1928 Alexandrem Flemिंगem a jejich další historií. Poté jsou rozebírány mechanismy účinku spočívající v inhibici syntézy buněčné stěny, narušení membrán buňky, inhibici syntézy nukleových kyselin, proteinů a metabolismu.

Byly popsány dva přístupy k zjišťování citlivosti bakterie na antibiotikum, difúzní a diluční metoda. Obě tyto metody jsou uznávány za průkazné, v praxi se difúzní disková metoda používá častěji.

Jako další byla rozebrána antibiotická rezistence. Byla představena rezistence přirozená a získaná, přičemž více prostoru je věnováno rezistenci získané, která představuje problém v stále se rozšiřující rezistenci k antibiotikům. Byly zmíněny příčiny vzniku antibiotické rezistence a její mechanismy, a to změna cíle působení antibiotika, nepropustnost, enzymatické upravení nebo zničení antibiotika a vyplavování antibiotika z buňky.

V závěru práce byly zmíněny příklady jednotlivých antibiotik indikujících antibiotickou rezistenci, a to konkrétně ampicilin, meropenem, cefotaxim, ceftazidim, cefoxitin, ciprofloxacin, perfloracin, gentamicin, tigecyklin a chloramfenikol. U těchto antibiotik byla popsána jejich charakteristika a princip zjištění rezistence na ně u *Escherichia coli* a *Salmonella* spp. difúzní diskovou metodou.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AFSHARI, A. a spol., 2018. Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhimorium identification in poultry carcasses. *Iranian journal of microbiology* [online]. **10**(1), 45–50 [cit. 2021-5-9]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6004630/>

AGROPRESS.CZ, 2017. Antibiotika. In: *Agropress.cz* [online]. [Praha]: FARMCZSYSTEM, [cit. 2017-04-13]. Dostupné z: <http://www.agropress.cz/antibiotika/>

AMBROŽOVÁ, Helena a Monika MAREJKOVÁ, 2012. Enterohemoragické kmeny Escherichia coli – nebezpečné novější patogeny. *Časopis lékařů českých* [online]. (11), 514–518 [cit. 2021-5-6]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/casopis-lekaru-ceskych/2012-11-1/enterohemoragicke-kmeny-escherichia-coli-nebezpecne-novejsi-patogeny-39391>

AMIN, Mansour a spol., 2018. Antibiotic resistance pattern and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase producing enteroaggregative Escherichia coli isolates in children from southwest Iran. *Infection and drug resistance* [online]. (11) [cit. 2021-5-6]. Dostupné z: doi:10.2147

ANDINO, A. a I. HANNING, 2015. Salmonella enterica: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. *ScientificWorldJournal*. [online]. [cit. 2021-5-9]. Dostupné z: doi:10.1155/2015/520179

BRITANNICA, The Editors of Encyclopaedia, 2020. *E. coli* [online]. Encyclopedia Britannica [cit. 2021-5-6]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/E-coli>

CECCARELLI, Matteo a spol., 2004. Mechanism of Antibiotics Translocation through a Porin. *Biophysical Journal* [online]. **87**(1), 58–64 [cit. 2021-5-7]. ISSN 0006-3495. Dostupné z: <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.037283>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349504734967>)

Cefotaxime, 2021. *DrugBank* [online]. [cit. 2021-5-9]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00493>

Cefoxitin, 2021. *DrugBank* [online]. [cit. 2021-5-9]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01331>

CEFTAZIDIM KABI: SPC - Souhrn údajů o přípravku, 2017. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0131653&tab=texts>

CIFLOXINAL: SPC - Souhrn údajů o přípravku, 2020. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0108607&tab=texts>

CLOECKAERT, Axel a Stefan SCHWARZ, 2001. Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *Veterinary Research* [online]. **32**(3-4), 301-310 [cit. 2021-5-9]. Dostupné z: <https://www.vetres.org/articles/vetres/pdf/2001/03/v1303.pdf>

CORRY, Janet E. L., Gordon D. W. CURTIS a Rosamund M. BAIRD, 2012. *Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology: 12.3 Enterobacteriaceae* [online]. 3rd Edition. Royal Society of Chemistry [cit. 2021-5-6]. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00AA0ZW2/handbook-culture-media/enterobacteriaceae>

ČSN 56 9609: Pravidla správné hygienické a výrobní praxe - Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace, 2008. Praha: Český normalizační institut.

DE JONG, Wim H. a spol., 2005. *Salmonella, Assessment of Infection Risk. Encyclopedic Reference of Immunotoxicology* [online]. Springer Science & Business Media, s. 573-578 [cit. 2021-5-7]. ISBN 9783540441724. Dostupné z: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=0&sid=f1047d71-9069-4ef1-bc33-6cb4d1321015%40pdc-v-sessmgr02>

DÍAZ-JIMÉNEZ, Dafne a spol., 2021. Microbiological risk assessment of Turkey and chicken meat for consumer: Significant differences regarding multidrug resistance, mcr or presence of hybrid aEPEC/ExPEC pathotypes of *E. coli*. *Food Control* [online]. 123 [cit. 2021-5-20]. ISSN 0956-7135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107713>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713520306290>)

Escherichia coli průjmové infekce, 2021. *Dětské infekční lékařství* [online]. Institut biostatistiky a analýz Masarykovy univerzity [cit. 2021-5-6]. Dostupné z:

<https://telemedicina.med.muni.cz/pdm/detske-infekcni-lekarstvi/index.php?pg=vyukove-texty--alimetarni-nakazy--bakterialni-prujmy--escherichia-coli-prujmove-infekce>

FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ BRNO. Přehled antibiotik ve veterinární medicíně (II. semestr FVL v Brně – 4.přednáška). In: *Webzdarma.cz* [online]. Liberec: webzdarma.cz, 2017 [cit. 2017-04-13]. Dostupné z: <http://farmakologie.webzdarma.cz/farmacka4.ppt>

GISKE, Christian G. a spol., 2017. Návodů EUCAST pro detekci mechanismů rezistence a specifické rezistence s klinickým a/nebo epidemiologickým významem. *Státní zdravotní ústav* [online]. [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/EUCAST_mechanismy_rezistence_v2_2017.pdf

GRIFFIN, Shane G., Julie L. MARKHAM a David N. LEACH, 2000. An Agar Dilution Method for the Determination of the Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research* [online]. **12**(2), 249-255 [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: doi:10.1080/10412905.2000.9699509

HEJZLAR, Miroslav, 1995. *Antibiotika v praxi*. 2. přeprac. a rozš. vyd., (1. v nakl. Makropulos). Praha: Makropulos. Galén. ISBN 80-901-7764-6.

HEROLD, Miloš a spol., 1953. *Antibiotika*. Dotisk 1. vyd. Praha: Přírodovědecké vydavatelství.

Chloramfenikol vytvářený bakteriemi v půdě. In: Informační centrum bezpečnosti potravin [online]. [Praha]: Ministerstvo zemědělství, 2013 [cit. 2017-04-13]. Dostupné z <http://www.bezpecnostpotravin.cz/chloramfenikol-vytvareny-bakteriemi-v-pude.aspx>

JAVADI, K. a spol., 2020. Characterization and antibiotic resistance pattern of diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC), isolated from paediatric diarrhoea in Shiraz, southern Iran. *New Microbes and New Infections* [online]. [cit. 2021-5-6]. ISSN 2052-2975. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100780> (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2052297520301323>)

JI-YEON, Kim a spol., 2021. Physiological changes and stress responses of heat shock treated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Food Control* [online]. **124** [cit. 2021-5-

7]. ISSN 0956-7135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107915>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713521000530>)

KAPOOR, Garima a spol., 2017. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology* [online]. **33**(3), 300-305 [cit. 2021-5-7]. Dostupné z: doi:10.4103/joacp.JOACP_349_15

KIMERA, Zuhura I. a spol., 2021. Multidrug-Resistant, Including Extended-Spectrum Beta Lactamase-Producing and Quinolone-Resistant, *Escherichia coli* Isolated from Poultry and Domestic Pigs in Dar es Salaam, Tanzania. *Antibiotics* [online]. 10(4), 406 [cit. 2021-5-20]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040406>

LLOYD, David H., 2007. Reservoirs of Antimicrobial Resistance in Pet Animals. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 45(2), 148–152 [cit. 2021-5-20]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1086/519254>

MACHALA, Ladislav a Jiří BENEŠ, 2011. Dobrý sluha, ale zlý pán: aneb Poučení z epidemie *Escherichia coli* EHEC O104:H4. *Vesmír* [online]. **90**(9) [cit. 2021-5-6]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2011/cislo-9/dobry-sluha-zly-pan.html>

MCCLELLAND, M. a spol., 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* [online]. **413**, 852–856 [cit. 2021-5-9]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/35101614>

Mechanisms of Microbial Control. *Boundless Microbiology* [online]. Lumen Candela [cit. 2021-5-7]. Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/boundless-microbiology/chapter/mechanisms-of-microbial-control/>

MEROPENEM ACCORD: SPC - Souhrn údajů o přípravku, 2019. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0242276&tab=texts>

Pefloxacin, 2021. *DrugBank* [online]. [cit. 2021-5-9]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00487>

POOLE, K., 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol* [online]. **92**, 55-64 [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.8.x>

PURKRTOVÁ, Sabina, 2017. *Kultivační metody v potravinářské mikrobiologii* [online]. VŠCHT Praha [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: http://old-biomikro.vscht.cz/vyuka/mzp/2017-03-17_MZP_KULTIVACNI_METODY.pdf

SEFOTAK: SPC - Souhrn údajů o přípravku, 2018. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0201030&tab=texts>

SHAIBU, Arome Ohiemi a spol., 2021. Isolation and antibiogram of Salmonella species from slaughtered cattle and the processing environment in Abuja abattoirs, Nigeria. *Food Control* [online]. 125 [cit. 2021-5-20]. ISSN 0956-7135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107972>.

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713521001109>)

SCHAEFER, Amy K. a spol., 2018. Chapter 14 - Pathogen and Microbial Associated Molecular Patterns (PAMPs/MAMPs) and the Innate Immune Response in Crohn's Disease. *Immunity and Inflammation in Health and Disease* [online]. Academic Press, s. 175-187 [cit. 2021-5-7]. ISBN 9780128054178. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805417-8.00014-7>.

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128054178000147>)

SIGMA-ALDRICH, INC., 2021. Mueller Hinton Agar. *Merck KGaA* [online]. [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/70191?lang=en&ion=CZ&gclid=EAIaI QobChMI5DrrL3_7wIVFZzVCh2YBQN2EAAYASAAEgJNQvD_BwE

SILVA, R. M a spol., 2021. Co-relationship between Escherichia coli in broiler cellulitis and liver lesions. *Brazilian Journal of Biology* [online]. **81**(3), 714-718 [cit. 2021-5-7]. ISSN 1678-4375. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.230243> (<http://www.scielo.br/pdf/bjb/2020nahead/1519-6984-bjb-1519-6984230243.pdf>)

SODAGARI, Hamid Reza a spol., 2021. Antimicrobial resistance and genomic characterisation of Escherichia coli isolated from caged and non-caged retail table eggs in

Western Australia. *INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY* [online]. 340 [cit. 2021-5-7]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109054>

SPÍŽEK, Jaroslav, 1999. Rezistence na antibiotika: Je třeba hledat nové látky a nové postupy. *Vesmír* [online]. 78(1) [cit. 2021-5-20]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1999/cislo-1/rezistence-antibiotika.html>

SUCHOPÁR, Josef a Helena KOBLIHOVÁ, 2008. Karbapenemy: přehled a porovnání základních údajů. *REMEDIA* [online]. (3), 247-251 [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Farmakologie/Karbapenemy-prehled-a-porovnanizakladnich-udaju/8-10-jy.magarticle.aspx>

ŠÍPEK, Antonín, 2014. Bakterie a prokaryota obecně: Prokaryota obecně. *Genetika - Biologie* [online]. [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/prokaryota>

TEJKALOVÁ, Renata, 2015. *Základy antimikrobiální terapie 6: Chinolony, Rifampicin, Endokarditidy* [online]. Mikrobiologický ústav LF MU a FN u sv. Anny v Brně [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/med/jaro2015/VSAT081/6__INT_Antimikrobialni_terapie__7.4._2015_.._chinolony__rifa.pdf

TIGECYCLINE ACCORD: SPC - Souhrn údajů o přípravku. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0238937&tab=texts>

URBÁŠKOVÁ, Pavla a Helena ŽEMLIČKOVÁ, 2021. Klinické breakpointy - breakpointy a návody: Tabulky breakpointů EUCAST pro interpretaci MIC a průměrů inhibičních zón (v.11.0). *Státní zdravotní ústav* [online]. [cit. 2021-5-11]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/klinicke-breakpointy>

URBÁŠKOVÁ, Pavla, 2014. Metodika sběru dat. *Státní zdravotní ústav* [online]. [cit. 2021-02-14]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/ears-net-4/metodika-sberu-dat?highlightWords=plazmidov%C3%A1+rezistence>

URBÁŠKOVÁ, Pavla, 2020. Expertní pravidla a přirozená rezistence: Enterobacterales. *Státní zdravotní ústav* [online]. [cit. 2021-5-11]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/expertni-pravidla-eucast-v3-0?highlightWords=coli+rezistence>

URBÁŠKOVÁ, Pavla, 2020. Expertní pravidla a přirozená rezistence: *Salmonella* spp.. *Státní zdravotní ústav* [online]. [cit. 2021-5-11]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/expertni-pravidla-eucast-v3-0?highlightWords=coli+rezistence>

URBÁŠKOVÁ, Pavla, Vladislav JAKUBŮ a Helena ŽEMLIČKOVÁ, 2021. Disková difuzní metodologie EUCAST: EUCAST Disková difuzní metoda - Příručka. *Státní zdravotní ústav* [online]. [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Diskova_metoda/2021/EUCAST_Diskova_difuze_Manual_v_9.0.pdf

VOJTOVÁ, Vladimíra a Karel URBÁNEK, 2008. GLYCYLCYKLINY – LYCYLCYKLINY – NOVÁ SKUPINA ANTIBIOTIK. *KLINICKÁ FARMAKOLOGIE A FARMACIE* [online]. **22**(3), 113–115 [cit. 2021-5-9]. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2008/03/06.pdf>

VORLÍČEK, Jiří, 1995. Recenze: Aktuálně farmakoterapeutiká VII - Cefalosporiny. *Klinická onkologie* [online]. **8**(3) [cit. 2021-5-9]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/1995-06-15-3/recenze-aktualne-farmakoterapeutika-vii-cefalosporiny/>

VORLÍČEK, Petr, 2018. Zodpovědný přístup k antibiotikům. Státní veterinární správa [online]. [cit. 2021-5-20]. Dostupné z: <https://www.svs-cr.cz/zodpovedny-pristup-k-antibiotikum/>

VŠCHT PRAHA. *Identifikace mikroorganismů pomocí sekvence jejich genu pro 16S rRNA* [online]. [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Identifikace+mikroorganism%C5%AF+pomoc%C3%AD+sekvence+jejich+genu+pro+16S+rRNA.pdf?redirected>

WOOLEY, Dawn P. a Karen B. BYERS, 2017. *Biological Safety - Principles and Practices: 8.5.4.1 Escherichia Coli* [online]. 5th Edition. American Society for Microbiology [cit. 2021-5-6]. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt011EE7F1/biological-safety-principles/escherichia-coli>

WOOLEY, Dawn P. a Karen B. BYERS, 2017. *Biological Safety - Principles and Practices: 8.5.4.1 Salmonella* [online]. 5th Edition. American Society for Microbiology [cit. 2021-5-6]. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt011EE7F1/biological-safety-principles/salmonella>

XU, Zhen a spol., 2021. Prevalence and Antimicrobial Resistance of Salmonella and Staphylococcus aureus in Fattening Pigs in Hubei Province, China. *Microbial Drug Resistance: Ahead of Print* [online]. Mary Ann Liebert [cit. 2021-5-20]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0585>

YANG, Yishan a spol., 2016. Biofilm formation of Salmonella Enteritidis under food-related environmental stress conditions and its subsequent resistance to chlorine treatment. *Food Microbiology* [online]. 54, 98-105 [cit. 2021-5-10]. ISSN 0740-0020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.010>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002015001951>)

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AIDS syndrom získaného imunodeficitu

AmpC Ampicilin C β -laktamáza

BGA agar s brilantovou zelení, fenolovou červení a laktózou

CFU kolonie tvořící jednotka

ČSN Česká technická norma

DNA deoxyribonukleová kyselina

EN Evropská norma

ESBL širokospektrá β -laktamáza

ISO Mezinárodní organizace pro normalizaci

KPC *Klebsiella pneumoniae* karbapenemáza

MBC minimální baktericidní koncentrace

MH Muller Hinton agar

MIC minimální inhibiční koncentrace

MK Muller-Kauffmann bujón

No. číslo

RNA ribonukleová kyselina

RVS Rappaport-Vassiliadis bujón

spol. spolupracovníci

spp. druh

St. svatý

supsp. poddruh

TBX trypton-žluč-X-glukoronidový agar

tzv. takzvaně, takzvaný

XLD xylóza-lysin-deoxycholátový agar

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Horizontální metoda stanovení počtu β -glukuronidáza pozitivních <i>Escherichia coli</i> (Purkrtová, 2017)	13
Obrázek 2 Schéma horizontální metody průkazu bakterií <i>Salmonella</i> spp. (Purkrtová, 2017)	15
Obrázek 3 Algoritmus pro detekci karbapenemáz (Giske a spol., 2017)	30

