

Antibiotická rezistence kmenů *Escherichia coli* a její význam v potravním řetězci

Bc. Tomáš Valenta

Diplomová práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tomáš VALENTA**
Osobní číslo: **T09567**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Antibiotická rezistence kmenu Escherichia coli a její význam v potravním řetězci**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Antibiotika, jejich účinek a rezistence na antibiotika.
2. Chinolonová antibiotika a jejich využití.
3. Escherichia coli, její význam a rezistence na antibiotika.

II. Praktická část

1. Metodika stanovení mikrobiální rezistence.
2. Stanovení antibiotické rezistence Escherichia coli.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] ČECHOVÁ, L., JANALÍKOVÁ, M. *Obecná mikrobiologie*, 1. vyd., Zlín: UTB ve Zlíně, Academia Centrum, 2007, ISBN 978-80-7318-516-9.

[2] WALSH, CH. *Antibiotics. Actions, origins, resistance*, 1. vyd., Washington D.C.: ASM Press, 2003, ISBN 20036-2904.

[3] *Potravinářská mikrobiologie - Vzdělávací portál Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně*. Dostupné na: <http://utb.cepac.cz/Screens/Explorer.aspx?id=7>.

[4] ČEJKA, K., HOFMAN, J., HUBÁČEK, J. a kol. *Vybrané metody v mikrobiologii*, Praha: Academia, nakladatelství Československé akademie věd, 1981, ISBN 104-21-852.

Vedoucí diplomové práce:

MVDr. Ivan Holko, Ph.D.

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

25. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2011

Ve Zlíně dne 21. března 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: VALENTA TOMÁŠ

Obor: TECHNOLOGIE, HYGIENA A EKONOMIKA
VÝROBY POTRAVIN

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 užít 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 ...16. 5. 2011...

Tomáš Valenta

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 nevdělečně 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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

ABSTRAKT

Abstrakt česky

Diplomová práce je zaměřena na popis antibiotické rezistence bakteriálních kmenů *Escherichia coli*, zabývá se zvláště rezistencí *Escherichia coli* na chinolonová antibiotika. Ve své teoretické části obecně popisuje bakteriální rezistenci na antibiotika. Pojednává o působení a využití chinolonových antibiotik, především veterinárních fluorochinolonů. Popisuje bakterii *Escherichia coli*, zejména její patogenní kmeny a význam této bakterie v potravním řetězci. Diplomová práce obsahuje studie vývoje rezistence *Escherichia coli* na antibiotika se zaměřením na fluorochinolony. V praktické části se zabývá laboratorním stanovením antibiotické rezistence *Escherichia coli*, interpretací a diskusí zjištěných výsledků.

Klíčová slova: antibiotika, antibiotická rezistence, bakterie, *Escherichia coli*, fluorochinolony, chinolony, infekce

ABSTRACT

Abstrakt ve světovém jazyce

The master thesis is focused on the description of antibiotic resistance of bacterial strains *Escherichia coli*, the work deals especially with the resistance of *Escherichia coli* to quinolones. In its theoretical part the work describes bacterial resistance to antibiotics. It discusses the operation and use of quinolones, mainly veterinary fluoroquinolones. This work describes the bacterium *Escherichia coli*, particularly its pathogenic strains and the importance of this bacterium in the food chain. The master thesis includes studies of the development of resistance of *Escherichia coli* to antibiotics with a focus on fluoroquinolones. In the practical part the work deals with the laboratory determination of antibiotic resistance of *Escherichia coli*, interpretation and discussion of obtained results.

Keywords: antibiotics, antibiotic resistance, bacteria, *Escherichia coli*, fluoroquinolones, quinolones, infection

Poděkování, motto

Dovoluji si touto cestou poděkovat za odborné vedení, cenné rady, podporu a návrhy k vypracování diplomové práce svému vedoucímu MVDr. Ivanu Holkovi, Ph.D.

Čestné prohlášení

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 ANTIBIOTIKA	13
1.1 REZISTENCE NA ANTIBIOTIKA	15
1.1.1 Mechanismy rezistence na antibiotika	16
1.1.2 Genetická podstata získané (sekundární) rezistence	16
1.1.3 Obnova citlivosti bakterií na antibiotika	18
1.2 HODNOCENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍHO ÚČINKU.....	19
1.3 ANTIMIKROBIÁLNÍ REZISTENCE JAKO BIOLOGICKÉ RIZIKO Z POTRAVIN.....	20
2 PŮSOBENÍ A VYUŽITÍ CHINOLONOVÝCH ANTIBIOTIK.....	21
2.1 CHINOLONOVÁ ANTIBIOTIKA	21
2.2 MECHANISMUS ÚČINKU CHINOLONOVÝCH ANTIBIOTIK.....	23
2.3 CHINOLONY 1. A 2. GENERACE V LÉČBĚ INFEKČÍ DOLNÍCH MOČOVÝCH CEST.....	24
2.4 VYUŽITÍ VETERINÁRNÍCH FLUOROCHINOLONŮ	25
3 ESCHERICHIA COLI.....	28
3.1 STŘEVNÍ MIKROFLÓRA – <i>ESCHERICHIA COLI</i>	28
3.2 VÝZNAM <i>ESCHERICHIA COLI</i> JAKO MODELOVÉHO ORGANISMU	29
3.3 PATOGENNÍ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	30
3.3.1 Enteropatogenní kmeny <i>Escherichia coli</i>	30
3.3.2 Verotoxigenní kmeny <i>Escherichia coli</i>	32
3.3.3 Extraintestinální (septikemické) kmeny <i>Escherichia coli</i>	32
3.4 <i>ESCHERICHIA COLI</i> A ENTERÁLNÍ INFEKCE U HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT	33
3.5 ALIMENTÁRNÍ INFEKCE VEROTOXIGENNÍ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	35
4 REZISTENCE <i>ESCHERICHIA COLI</i> NA ANTIBIOTIKA.....	37
4.1 REZISTENCE U <i>ESCHERICHIA COLI</i> NA β -LAKTAMOVÁ ANTIBIOTIKA.....	37
4.2 VETERINÁRNÍ FLUOROCHINOLONY A CHINOLONOVÁ REZISTENCE	38
4.3 PLAZMIDOVÁ CHINOLONOVÁ REZISTENCE U <i>ESCHERICHIA COLI</i>	39
4.4 PROBLEMATIKA MECHANISMŮ REZISTENCE <i>ESCHERICHIA COLI</i> K FLUOROCHINOLONŮM	40
4.5 VÝVOJ CHINOLONOVÉ REZISTENCE U <i>ESCHERICHIA COLI</i> V EVROPSKÝCH ZEMÍCH A V ČESKÉ REPUBLICCE	42
4.6 VÝVOJ MIKROBIÁLNÍ REZISTENCE VŮČI VETERINÁRNÍM FLUOROCHINOLONŮM	44
4.7 VÝVOJ REZISTENCE NA CHINOLONOVÁ ANTIBIOTIKA U <i>ESCHERICHIA COLI</i> IZOLOVANÝCH OD BROJLERŮ NA SLOVENSKU.....	45

4.8	REZISTENCE <i>ESCHERICHIA COLI</i> U SYNANTROPNÍHO PTACTVA A JEJÍ VÝZNAM V POTRAVNÍM ŘETĚZCI	46
4.9	REZISTENCE <i>ESCHERICHIA COLI</i> IZOLOVANÝCH Z CHOVŮ TELAT A DRŮBEŽE	48
4.10	INCIDENCE MULTIREZISTENTNÍCH IZOLÁTŮ <i>ESCHERICHIA COLI</i> ZE SYROVÉHO MLÉKA, MASA A MASNÝCH VÝROBKŮ	51
4.11	REZISTENCE <i>ESCHERICHIA COLI</i> NA ANTIBIOTIKA – DISKOVÉ METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI	52
II	PRAKTICKÁ ČÁST	54
5	CÍL PRAKTICKÉ PRÁCE	55
5.1	PRACOVNÍ MATERIÁL A POMŮCKY	55
5.2	METODIKA PRAKTICKÉ PRÁCE	57
5.3	VÝSLEDKY VÝZKUMU	59
6	DISKUSE	63
	ZÁVĚR	69
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	71
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	76
	SEZNAM OBRÁZKŮ	80
	SEZNAM TABULEK	81
	SEZNAM PŘÍLOH	82

ÚVOD

Diplomová práce pojednává o působení a využití chinolonových antibiotik, zvláště veterinárních fluorochinolonů. Zabývá se rezistencí bakteriálních kmenů *Escherichia coli* na antibiotika, především na chinolony.

Ve své praktické části popisuje laboratorní stanovení antibiotické rezistence kmenů *Escherichia coli* pocházejících z výtěrů bažantů z volné přírody i farmového chovu na Moravě, jež bylo provedeno v letech 2010 - 2011 na Ústavu technologie a mikrobiologie potravin Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, provádí diskusi zjištěných výsledků.

Escherichia coli je jedním z nejdůležitějších zástupců střevní mikroflóry teplokrevných živočichů a její přítomnost je nezbytná pro správný průběh trávicích procesů v tlustém střevě člověka. Náleží do čeledi *Enterobacteriaceae*, je nejčastějším zástupcem koliformních bakterií. Jejich přítomnost ve vodě je důkazem znečištění odpadními látkami a značí možnost kontaminace patogenními bakteriemi. *Escherichia coli* je široce rozšířeným střevním patogenem savců a ptáků, některé její kmeny jsou patogenní pro člověka a zvířata a způsobují septické infekce (zvláště uroinfekce) a průjemová onemocnění. Většina epidemií je spojena s konzumací potravin bovinního původu (výrobky z hovězího masa a mléčnými produkty). Další častou možností je konzumace zeleniny zalévané fekálně znečištěnou vodou.

Antibiotika jsou přirozené látky produkované mikroorganismy, které v malých koncentracích potlačují životní procesy buňky. Mají mikrobistatický nebo mikrobicidní účinek.

Chinolonová antibiotika 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, tedy inhibice bakteriální *gyrasy*, enzymu zodpovědného za správné splétání a rozplétání řetězců bakteriální nukleové kyseliny v průběhu G fáze buněčného cyklu.

Nárůst spotřeby fluorochinolonů v nemocničním prostředí i v lidské komunitě byl následován rychlým vzestupem a šířením rezistence mikroorganismů. Závažnost situace nejlépe dokumentuje trend v rezistenci *Escherichia coli*. Chinolony patří k nejrizikovějším skupinám antibiotických léčiv, poněvadž rezistence k nim vzniká velmi rychle, u některých původců infekcí už v průběhu léčby, a je povětšinou zkřížena mezi všemi zástupci.

Kritická je situace v chinolonové rezistenci u invazivních kmenů *Escherichia coli* vyvolávajících sepsi. Rychlý vzestup rezistence na chinolony nastává v mnoha zemích, jeden z nejstrmějších trendů zaznamenává Česká republika. Mezi léty 2001 a 2005 došlo v ČR k dvojnásobnému vzestupu antibiotické rezistence *E. coli* k fluorochinolonům, projevil se např. nárůst rezistence *E. coli* k ciprofloxacinu z 8 % na více než 20 % a tento vzestup nadále pokračuje.

Cílem diplomové práce je popsat rezistenci bakterie *Escherichia coli* vůči antibiotikům, zejména chinolonům. Práce se snaží dokázat závažnost situace rostoucí rezistence *Escherichia coli* k fluorochinolonům, které ztrácejí postavení účinného léku pro úvodní léčbu většiny infekcí. Vyjadřuje přesvědčení, že fluorochinolony by měly v současné době sloužit jako léky rezervní, indikované jen v situacích, kdy jsou jiná antibiotika *in vitro* neúčinná nebo nevhodná pro léčbu infekcí z důvodu toxicity či nežádoucích účinků.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ANTIBIOTIKA

Antibiotika jsou přirozené látky produkované mikroorganismy (případně vyššími organismy), které v malých koncentracích potlačují životní procesy buňky. Mají tedy toxický účinek nejen na buňky mikroorganismů, ale i rostlinné a živočišné buňky. Vyznačují se selektivní toxicitou, tj. působí jen na některé buňky. Selektivní toxicita je dána strukturou molekuly účinné látky, propustností membrán pro antibiotikum a ve schopnosti buňky obejít metabolickou dráhu blokovanou antibiotikem [1].

Antibiotika mají mikrobistatický nebo mikrobicidní účinek [1]. To znamená, že inhibují růst (množení) mikroorganismů (navozují bakterioostázu), nebo je usmrcují (působí baktericidně) [2]. Souhrn všech mikrobiálních druhů, na které antibiotikum působí, se označuje jako spektrum účinnosti antibiotika [1].

Rozdělení antibiotik na bakteriostatické a baktericidní není zcela přesné, protože mnoho bakteriostatických antibiotik působí ve vyšších koncentracích rovněž baktericidně (např. chloramfenikol u meningokokové infekce). Naopak některá baktericidní antibiotika neusmrcují určité bakterie ani ve vysokých koncentracích (např. penicilin G enterokoky) [2].

Antibiotika jsou většinou sekundární metabolity bakterií a mikroskopických hub. Převážná většina je produkována aktinomycetami, zejména rodem *Streptomyces*, menší část pak plísněmi a sporulujícími bakteriemi. Jeden typ antibiotika může být produkován větším počtem mikroorganismů. Příkladem mohou být peniciliny, které jsou produkovány např. zástupci rodů *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichophyton*, *Spiroidium*, *Acromonium*, *Streptomyces*. Na druhé straně stojí mikroorganismy, které produkují větší počet typů antibiotik, např. *Bacillus subtilis* 42, *Streptomyces griseus* 48 [1].

Antibiotika lze třídit podle chemické struktury a podle způsobu účinku na buňku mikroorganismů. Antibiotika chemicky podobná mají podobný mechanismus účinku, ale neplatí to naopak, podobný mechanismus účinku mohou mít i antibiotika s různou chemickou strukturou (např. penicilin a vankomycin) [1].

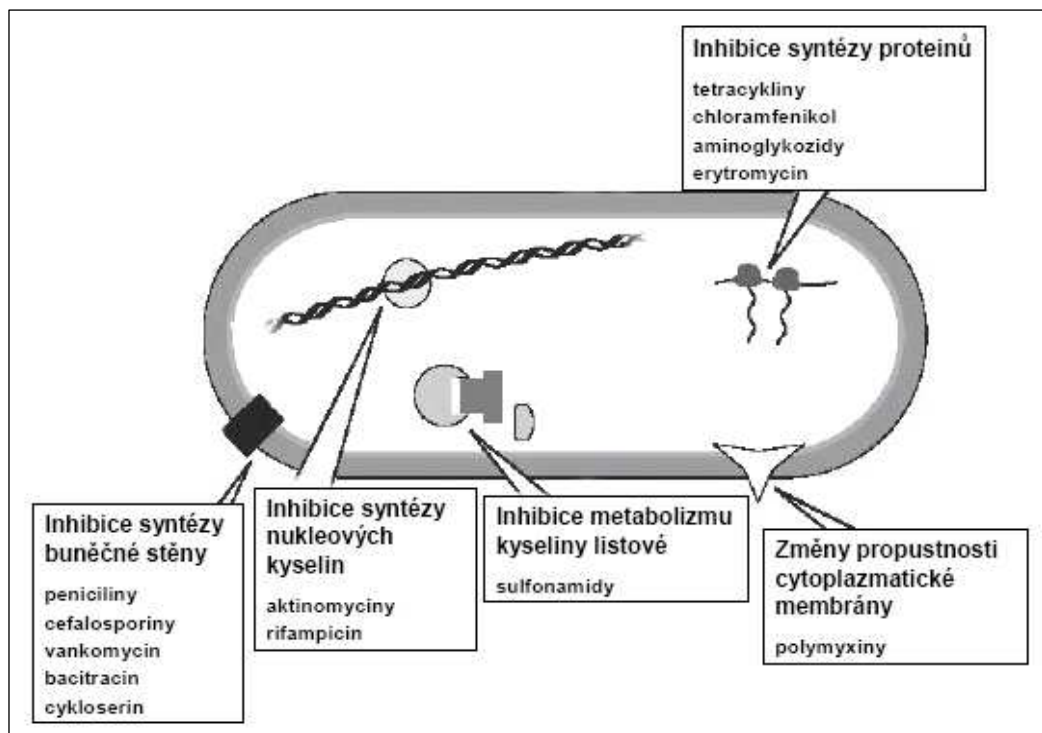
Vzhledem k tomu, že antibiotika jsou látky chemicky rozdílné, není u nich jednotný mechanismus účinku. Pro třídění a porovnání základních mechanismů účinků jsou antibiotika řazena do skupin, které zasahují do:

- a) syntézy buněčné stěny,
- b) funkce cytoplazmatické membrány,
- c) syntézy bílkovin,
- d) syntézy nukleových kyselin [1].

Tabulka 1. Rozdělení antibiotik podle mechanismu jejich účinku v buňce [2]

Mechanismus účinku	Antibiotika
Inhibice syntézy buněčné stěny	Peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy, karbapenemy, vankomycin, bacitracin
Porucha funkce cytoplazmatické membrány	Amfotericin B, azoly, polyeny, polymyxiny
Inhibice syntézy bílkovin	Aminoglykosidy, chloramfenikol, makrolidy, tetracykliny, linkomycin
Inhibice syntézy nukleových kyselin	Chinolony, sulfonamidy, trimetoprim, rifampicin, pyrimetamin

Obrázek 1. Místo účinku antibiotik v buňce [3]



1.1 Rezistence na antibiotika

V současné době většina států použití antibiotik jako aditiv do potravin zakazuje a i malá množství reziduí antibiotik v potravinách živočišného původu se považují za nepřijatelná. Jednou z hlavních příčin je vznik rezistence mikroorganismů vůči antibiotikům. Mikroorganismy přítomné v potravinách se mohou stát rezistentními a kolonizovat střevní obsah lidí a zvířat. Rezidua antibiotik mohou též vytvořit selektivní tlak na mikroorganismy, který vyústí v převahu rezistentních mikroorganismů přítomných ve střevním obsahu. Jeden z hlavních důvodů rezistence mikroorganismů je mnohdy neodůvodněné používání antibiotik v humánní a veterinární medicíně [3].

Bylo zjištěno, že v některých případech jsou dokonce hospodářská zvířata z ekologické produkce více náchylná k bakteriální kontaminaci než z konvenční produkce, neboť se v ekologické produkci obecně zakazuje použití antibiotik. Zákazem používání antimikrobiálních prostředků se naopak vysvětluje podstatně nižší výskyt antimikrobiální rezistence u hospodářských zvířat z ekologické produkce [4].

Bakterie mohou být rezistentní vůči účinku antibiotik. Může to být vlastnost druhová nebo vlastnost získaná selekcí buněk, které přežily působení daného faktoru. Tato vlastnost může být determinována chromozomálně nebo plazmidově [1].

Primární rezistence vůči danému antibiotiku je poměrně vzácná. Je dána druhem bakterie a přirozenými vlastnostmi druhu. Tento druh bakterie je rezistentní vůči danému antibiotiku bez jakékoliv genetické změny, poněvadž nenese pro dané antibiotikum zásahové místo [1]. Například antibiotika, která narušují syntézu bakteriální buněčné stěny, jsou primárně neúčinná vůči mykoplazmám, které buněčnou stěnu vůbec nemají [5]. Příkladem mohou být také některé gramnegativní bakterie, které jsou ve srovnání s grampozitivními méně citlivé na penicilin, příkladem volně žijící patogenní bakterie s vysokým stupněm rezistence je *Pseudomonas aeruginosa*. Naproti tomu sekundární (získaná) rezistence vzniká jako důsledek mutací ovlivňujících geny na chromozomu nebo tím, že bakterie získá geny přenášející rezistenci (plazmidy a transpozony) na původně citlivé mikroorganismy [1]. Přenosná rezistence je častější u gramnegativních bakterií. Genetický materiál může být předáván z jednoho mikroorganismu na druhý konjugací (spájením bakterií a translokací DNA) nebo transdukcí (DNA plazmidu je převzata do bakteriálního viru a je jím přenesena do další bakterie) [2].

Sekundární rezistence vzniká až v průběhu antibiotické terapie nebo následkem předchozího podávání antibiotika. V přítomnosti antibiotika se selektují rezistentní kmeny, které se nacházejí v každé velké bakteriální populaci. Rychlost rozvoje sekundární rezistence závisí na frekvenci mutací a na množství bakterií s určitým stupněm rezistence [2].

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].

1.1.1 Mechanismy rezistence na antibiotika

Biochemické mechanismy, které způsobují možnost rezistence bakterií na antibiotika jsou následující: bakterie tvoří enzym destrující antibiotikum, nastává změna permeability (propustnosti) cytoplazmatické membrány, nadprodukce cílového proteinu nebo metabolitu antagonistického s inhibitorem. Bakterie mohou mít také změněnou cílovou molekulu díky mutaci v příslušném genu. Častou příčinou rezistence na antibiotika je také vytvoření náhradní metabolické dráhy [1].

Bakterie získávají rezistenci na antibiotika (chemoterapeutika) čtyřmi hlavními způsoby:

- a) destrukcí či inaktivací léčiva (např. pomocí β -lactamasy)
- b) zamezením průniku antibiotika do cílového místa uvnitř buňky mikroorganismu (častý mechanismus pro tetracyklinovou rezistenci)
- c) pozměněním cílových míst pro antibiotika (např. jediný aminokyselinový řetězec v ribosomu může stačit k zajištění rezistence mikroorganismu na určitá makrolidová antibiotika)
- d) náhlým a aktivním vypuzením antibiotika, které je odstraněno z buňky dříve, než se projeví jeho účinek [6].

1.1.2 Genetická podstata získané (sekundární) rezistence

Získaná rezistence vzniká buď vinou mutací ovlivňujících geny na bakteriálním chromozomu, nebo tím, že bakterie získá geny přenášející rezistenci na (původně) citlivé mikroorganismy [7].

Mutace může představovat bodové mutace, odstranění části genu (deleci), jeho náhradu (substituci), anebo přidání (adici) jednoho či několika párů bází v deoxyribonukleové kyselině, které mají za následek výměnu jedné nebo více aminokyselin v zásahové peptidové struktuře. Syntetisuje se tak bílkovinný produkt, který má omezenou schopnost vázat antibiotikum. Jako příklad může sloužit rezistence *Mycobacterium tuberculosis*, původce tuberkulózy, vůči streptomycinu, způsobená mutací, která ovlivňuje specifickou bílkovinu vázající streptomycin [7].

Přenos rezistence na mikroorganismy, které byly původně na antibiotikum citlivé, se odehrává za pomoci plazmidů, transpozonů či genových kazet. Plazmidy jsou nezávisle se replikující molekuly kyseliny deoxyribonukleové, které mohou existovat mimo bakteriální chromozom a mohou nést rezistenci vůči jednomu nebo více antibiotikům. Přenášejí se konjugací, transdukci pomocí bakteriofágů nebo transformací DNA bez jakéhokoli nosiče. Dva poslední případy přenosu rezistence jsou v přírodě dosti vzácné, zatímco přenos konjugací je běžný. Plazmidy mají obvykle omezené spektrum hostitelů, např. plazmidy z gramnegativních bakterií většinou nemohou přenášet rezistenci na grampozitivní druhy [7].

Transpozony jsou zvláštní sekvence DNA, které se mohou pohybovat z jedné replikační jednotky (chromozomu nebo plazmidu) na druhou, proto se jim také říká „přeskakující geny“. Mohou kódovat rezistenci vůči širokému spektru antibiotik, podobně však mohou určovat i řadu jiných vlastností [7].

Nedávno byl popsán systém genových kazet, které umožňují pohyb rezistenčních genů. Kazety obsahují pouze jeden gen kódující rezistenci vůči určitému antibiotiku a celou rodinu receptorových prvků, integronů, které poskytují místo pro integraci kazety, ale kódují i enzym, který je odpovědný za pohyb genu. Pohyb genových kazet, tj. jejich vnesení a vytržení z integronů, se odehrává specifickou rekombinací. Integrony se však mohou také přemísťovat, což je velmi důležité pro pohyb rezistenčních genů mezi různými bakteriálními druhy. Umožňuje to totiž integronům a rezistenčním genům připojení na řadu plazmidů se širokým spektrem hostitelů [7].

Kazety se mohou integrovat do receptorových elementů (integronů), nebo se z nich vydělit, anebo se integrovat na jiných místech chromozomu. Tak může vzniknout sestava několika rezistenčních genů. Schopnost integronů přijímat více než jednu kazetu kódující rezistenci, spojení integronů s většími transpozony, které mohou nést další rezistenční geny, a spojení

vícenásobných transpozonů v tomtéž plazmidu vysvětluje nyní již zcela obecný výskyt klinických kmenů patogenních bakterií, jež jsou rezistentní vůči mnoha různým antibiotikům zároveň [7].

1.1.3 Obnova citlivosti bakterií na antibiotika

Populace bakterií, které jsou vůči určitému antibiotiku rezistentní, se mohou někdy stát opět citlivými, když se antibiotikum přestane užívat. Tato možnost se studovala experimentálně: při pětidenním použití tetracyklinu je počáteční odolnost bakterií v zažívacím traktu velmi nízká a dosahuje vrcholu po dvou dnech. Když je po pěti dnech léčení tetracyklinem ukončeno, citlivost rezistentních bakterií vůči tetracyklinu se začne pomalu obnovovat. Trvá obvykle 15 dní, než se ustálí počáteční hladina rezistence [7].

Antibiotika velmi účinně selektují nové rezistentní kmeny, ale obrácený proces je obvykle velmi pomalý. Skutečnost, že bakterie nese geny rezistence vůči určitému antibiotiku, je velmi výhodná v případě, že prostředí toto antibiotikum obsahuje. Odolnost vůči antibiotiku však může jít také na úkor jiných vlastností a procesů, které v bakteriální buňce probíhají, a může v jeho nepřítomnosti vést ke snížené konkurenceschopnosti rezistentních bakterií vzhledem k citlivé části populace [7].

Kdyby tomu tak skutečně bylo, stačilo by přestat brát antibiotika po dobu, než se výskyt odolných kmenů sníží na minimum a tak by bylo možno kontrolovat šíření rezistence. V řadě prací bylo skutečně ukázáno, že rezistentní kmeny jsou v nepřítomnosti antibiotika málo schopné konkurovat citlivým kmenům, což ukazuje, že rezistence může být v těchto případech nevýhodná. V nepřítomnosti antibiotika rostou rezistentní kmeny často pomaleji než jejich citliví partneři. Mutační změny, které vedou k rezistenci, většinou porušují některé normální fyziologické procesy v buňce, což může mít pro takovou bakteriální buňku škodlivé důsledky. Při rezistenci kódované na plazmidech musí buňka produkovat další nukleové kyseliny a bílkoviny, a tato syntéza představuje pro buňku energetickou zátěž. Navíc mohou syntetizované produkty narušit buněčnou fyziologii. Odolné bakterie tak mohou být skutečně v prostředí bez antibiotika oproti buňkám citlivým v nevýhodě [7].

1.2 Hodnocení antimikrobiálního účinku

Hodnocení antimikrobiálního účinku se provádí *in vitro* stanovením minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) [2].

MIC je nejmenší naměřené množství (koncentrace) antibiotika, které inhibuje růst a množení bakterií v testovacím mediu. MBC odpovídá nejnižší naměřené koncentraci antibiotika *in vitro*, která usmrtí exponovanou bakteriální kulturu v průběhu 24 hod. Obě koncentrace se stanovují pro látky baktericidní i bakteriostatické. U silně působících baktericidních antibiotik jsou rozdíly mezi MIC a MBC malé. Průkaz spolehlivosti baktericidního účinku podává následný kultivační test na agarových půdách, kde nemají vyrůst žádné kolonie bakterií [2].

Aby účinek antibiotika *in vivo* byl dostatečný, je třeba, aby minimální koncentrace antibiotika v cílových tkáních odpovídaly hodnotám MIC a MBC. V některých případech (chinolony, aminoglykosidy) je intenzita antibakteriálního účinku přímo úměrná koncentraci v plazmě a cílové tkáni. Vysoké koncentrace nebývají pro terapeutický efekt přínosné, naopak zatěžují nemocného riziky nežádoucích a toxických reakcí. U většiny antibiotik je pro terapeutický efekt důležitá doba expozice [2].

Významnou vlastností některých antibiotik (aminoglykosidů a β -laktamů) je postantibiotický efekt (PAE). Tím se rozumí doba, po kterou přetrvává zástava množení bakterií za podmínek, kdy bakterie už nejsou vystaveny účinkům antibiotika (není měřitelná koncentrace antibiotika v tělesných tekutinách či tkáních) [2].

1.3 Antimikrobiální rezistence jako biologické riziko z potravin

Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA, European Food Safety Authority) požádal svůj vědecký panel pro biologická rizika (BIOHAZ), aby určil z hlediska veřejného zdraví, v jakém rozsahu jsou potraviny zdrojem bakterií rezistentních vůči antimikrobiálním prostředkům (AMR) nebo genů antimikrobiální rezistence z bakterií [8].

Podle BIOHAZ je v současné době obtížné určit rozsah expozice bakterií AMR a úloha potravin v transferu genů rezistence není dostatečně studována. Přesto bakterie z potravin ukazují na rostoucí rezistenci k antimikrobiálním prostředkům pro humánní a veterinární účely. Jakékoliv další šíření rezistence mezi bakteriemi v potravinách bude mít pravděpodobně vliv na expozici člověka [8].

Rezistentní salmonela kontaminuje hlavně drůbeží maso, vejce, vepřové a hovězí maso. U kampylobakteru je to hlavně kontaminované drůbeží maso. Dobytek je hlavním zdrojem VTEC (verotoxigenní *Escherichia coli*). Rezistentní kmeny se usidlují u člověka častěji prostřednictvím kontaminovaného hovězího masa než jiných potravin. Potraviny živočišného původu jsou potenciálním zdrojem meticilin-rezistentního *Staphylococcus aureus* (MRSA). MRSA z potravin tak může představovat nově se objevující problém. Potraviny jsou také důležitým zdrojem humánních infekcí způsobených rezistentní *Shigella* spp. a *Vibrio* spp. [8].

Antimikrobiální rezistencí jsou ohroženi především vážně nemocní lidé na jednotkách intenzivní péče a lidé staršího věku. Česká republika má vlastní Národní program antibiotické politiky, v rámci evropského srovnání je v ČR relativně vysoká rezistence u bakterií *E.coli*, problémem je např. bakteriální rezistence na fluorochinolony [9].

2 PŮSOBENÍ A VYUŽITÍ CHINOLONOVÝCH ANTIBIOTIK

2.1 Chinolonová antibiotika

Množství antibiotik zasahuje do procesu replikace a transkripce DNA v buňkách mikroorganismů. Některá léčiva s tímto účinkem mají velmi omezené využití, poněvadž zasahují i do savčí DNA a RNA. Jiná antibiotika, jako rifampicin a chinolony, mají mnohem širší využití díky jejich selektivnímu toxickému působení [6].

Chinolonová antibiotika kyselina nalidixová, kyselina oxolinová, ciprofloxacin jsou inhibitory *DNA-gyrasy*, v DNA působí lokálně specifické dvouřetězcové zlomy. Rifampicin blokuje iniciaci transkripce tím, že se váže na *RNA-polymerasu*. Klinicky nepoužitelná jsou antibiotika aktinomycin D, který blokuje transkripci i replikaci DNA, a mitomycin C, který vytváří kovalentní vazbu mezi oběma řetězci DNA. Obě tato antibiotika působí mimo bakterie i na živočišné buňky [1].

Ačkoliv má kyselina nalidixová (první připravené chinolonové antibiotikum) pouze omezené využití (lze ji aplikovat při infekcích močové soustavy), vedla k vývoji bohaté skupiny syntetických fluorochinolonů. Nejvíce užívané fluorochinolony jsou norfloxacin a ciprofloxacin. Ciprofloxacin je lépe známý pod jeho obchodním názvem *Cipro* a získal rozsáhlou publicitu díky svému využití proti anthraxové infekci. Přestože jsou fluorochinolony poměrně bezpečné pro dospělé, nepříznivě ovlivňují vývoj chrupavek a jejich užití je omezeno u dětí, dospívajících a těhotných žen. Třetí generace fluorochinolonů zahrnuje moxifloxacin a gatifloxacin, které vykazují rozsáhlejší spektrum antimikrobiálního účinku, zvláště vůči grampozitivním bakteriím a mohou být podány ústně. Gatifloxacin je též dostupný v kapalně formě k léčbě očních infekcí [6].

Chinolonová chemoterapeutika se používají v léčbě močových infekcí od 60. let dvacátého století. V průběhu posledních 25 let jsou do klinického používání zaváděny jejich deriváty se systémovým účinkem, souhrnně nazývané fluorochinolony (podle připojení atomu fluoru k základní molekule). Současné fluorochinolony lze charakterizovat jako baktericidní přípravky se širokým antimikrobním spektrem, vysokou biologickou dostupností perorálních forem, dlouhým biologickým poločasem a dobrou snášenlivostí. Pro dosud nevyjasněné působení na vyvíjející se pohybový aparát dětí, případně další nežádoucí účinky, platí

pro všechny chinolony kontraindikace použití do 8 let věku, a také v období těhotenství a kojení [10].

Fluorochinolony v organismu nekumulují ani nevytvářejí rezidua. Pro buňky savců, které jsou tisíckrát méně citlivé než buňky mikrobiální, nejsou toxické. V kombinaci s β -laktamovými antibiotiky vykazují synergický antibakteriální účinek [11].

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 *gyrasy*, enzymu zodpovědného za správné splétání a rozplétání řetězců bakteriální nukleové kyseliny v průběhu G fáze (generační fáze) buněčného cyklu [2].

S výjimkou chinolonů 1. generace (a případně některých 2. generace) se všichni ostatní zástupci označují jako fluorochinolony. Většina chinolonových přípravků je dostupná v perorální i parenterální aplikační formě. Zařazení přípravků do generací se může podle různých pramenů lišit [10].

1. generace chinolonů zahrnuje dnes již většinou překonané přípravky pro léčbu infekcí močových cest vyvolaných *Escherichia coli* a dalšími gramnegativními střevními tyčinkami. 2. generace chinolonů má vyšší aktivitu na mikroby než 1. generace, širší antimikrobiální spektrum a spolehlivou systémovou distribuci (výjimkou je norfloxacin) [10].

Chinolony 1. generace (kyselina nalidixová, oxolinová) a 2. generace (kyselina pipemidová, norfloxacin, rosoxacin) působí především na gramnegativní mikroorganismy. Používají se především k terapii infekcí močových cest, včetně kapavky. Využívá se jejich schopnosti rychlého vyloučení do urogenitálního traktu, a to asi 20 % v nezměněné podobě s původní schopností baktericidního působení v moči. Jejich sérová koncentrace je nízká a nedosahuje dostatečných hladin pro léčbu systémových infekcí. Pouze norfloxacin vykazuje vyšší terapeutické hladiny v některých tkáních, léčebně se však nevyužívá [2].

Přechod mezi chinolony 2. a 3. generace tvoří svými vlastnostmi a působením fluorovaný chinolon flumechin, který vykazuje v případech dlouhodobé aplikace častou získanou rezistencí u kmenů *Escherichia coli* [11].

4. generace chinolonů se vyznačuje zesílenou aktivitou proti grampozitivním kokům (včetně *Streptococcus pneumoniae*), a některým anaerobům. Do této generace patří moxifloxacin a další přípravky, které však nejsou v ČR (České republice) registrovány (gemifloxacin,

trovafloxacin, sitafloxacin). Moxifloxacin a další zástupci 3. a 4. generace jsou někdy pro svou aktivitu na pneumokoky označovány jako „respirační“ fluorochinolony [10].

2.2 Mechanismus účinku chinolonových antibiotik

Tisíce fluorochinolonů bylo syntetizováno na základě planárního heterocyklického jádra, které dalo skupině těchto antibiotik její jméno (Wolfson a Hooper, 1989). Rozsáhlá analýza ukázala, že chinolony ovlivňují rovnováhu štěpení a opětovného spojení (religaci) dvojšroubovice DNA v katalytických cyklech *DNA-gyrasy* a *topoisomerasy* typu IV tak, že akumulují (hromadí) štěpený komplex. DNA-5'-P-Tyr₁₂₂ kovalentní meziproducty na každé podjednotce *gyrA* jsou chráněny před reverzibilní religací v přítomnosti fluorochinolonů. Uvažovalo se, zda chinolony urychlují dvojřetězcový zlom na vázané DNA nebo selektivně zpomalují dvojitou religaci, ovšem ani jeden výklad nezískal jednoznačný důkaz. Mechanismus, kterým chinolony způsobují hromadění dvojnásobně štěpeného kovalentního meziproductu DNA-enzym je rovněž stále nevyřešen [12].

Na obou podjednotkách *gyrA* a *gyrB* se nacházejí účinná místa, která indukují chinolonovou rezistenci, což naznačuje interakci obou podjednotek enzymu s vázaným antibiotikem, a je také pravděpodobné, že chinolony interagují s rozštěpenou DNA [12].

Úvahy ohledně skládání obou basí rovinných fluorochinolonových heterocyklů a hořčnatých kationtů Mg²⁺ zprostředkovávajících komplexaci na jednu nebo více fosfátových skupin DNA velmi pokročily, spolu s myšlenkou, že chinolonový kruh se ukládá na 3' konci zlomu DNA, který je v prostoru uvolněn od 5' konce zlomu DNA. Rentgenová analýza chinolonově-enzymového meziproductu štěpené DNA může být jediným způsobem, jak vyřešit tuto nejasnost a přivést návrh chinolonových antibiotik na novou úroveň. [12].

Jelikož chinolonově-kovalentní *gyrasa* štěpící dvojitě DNA hromadí příslušné meziproducty, je hlavní působení tohoto bloku uvažováno v navazujícím účinku, který má tento blok na vývoj replikační DNA vidličky, která je jím zastavena (Maxwell, 1997). Je možné, že DNA reparační systém je posílen, pokouší se zachránit a selže, když odolný chinolonově stabilizovaný *gyraza*-DNA meziproduct přetrvává. To může být signálem, jenž spouští signalizační procesy, které vedou k rychlému usmrcení bakterií vyvolanému chinolony [12].

2.3 Chinolony 1. a 2. generace v léčbě infekcí dolních močových cest

Chinolonová chemoterapeutika 1. generace byla dlouhá léta oblíbenou a ekonomicky nenáročnou možností urologa v léčbě nekomplikovaných infekcí dolních močových cest u žen. Kyselina nalidixová (*acidum nalidixicum*) i kyselina oxolinová (*acidum oxolinicum*) se po perorálním podání téměř 100% vstřebávají a rychle dosahují vysokých koncentrací v moči, ve které se vylučují v nezměněné formě z 20 % a 80 % ve formě glukuronátu. Efekt je bakteriostatický. Nevýhodou však je vysoké procento nežádoucích účinků - nauzea, zvracení, kožní reakce, křeče, neurotoxicita a poruchy rovnováhy. V experimentech na zvířatech je prokázán chondropatický efekt, a proto jsou chinolony u mladých jedinců v růstu kontraindikovány. Chinolony I. generace mají i poměrně nízké antibakteriální spektrum (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp.) a nulový průnik do tkání a sekretů [13].

Přelomem v léčebné praxi bylo uvedení norfloxacinu (*Gyrablock 400*) do léčebné praxe. Fluorovaný chinolon 2. generace si ponechal vysoké hladiny v moči s rychlým nástupem, ale proti 1. generaci proniká i do tkání urogenitálního traktu (prostata). Je více než chinolony 1. generace vhodný i k léčbě gonorey (kapavky). Má baktericidní efekt a středně dlouhý biologický poločas (2 - 4 hodiny). Fascinující je antibakteriální spektrum norfloxacinu - *Streptococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Citrobacter* spp. a *Proteus* spp. [13].

Piippo a spol. (1999) z Tampere ve Finsku prováděl dvojité slepou studii u žen s akutní cystitidou. Ženy byly náhodně rozděleny do 2 skupin (po 200 nemocných) a norfloxacin byl podáván první skupině 3 dny dvakrát 400 mg a druhé identická dávka 7 dnů. Kultivační nález při kontrole 13. den se téměř nelišil - více než 80 % žen bylo bez obtíží a kultivačně negativní. Stejně procento žen bylo kultivačně a klinicky negativní i v dlouhodobém sledování. Norfloxacin je také podáván jako profylaxe infekce v subinhibičních dávkách u žen s predispozičními faktory pro recidivu infekce dolních močových cest. Nejdéle publikované nepřerušované podání je 36 měsíců. Dle kontrolních kultivací je signifikantní pouze nárůst rezistence vůči rodu *Enterococcus* spp [13].

Norfloxacin je bezpečný lék, který má své nezastupitelné místo v urologii i přes nástup 3. a 4. generace fluorovaných chinolonů. Je nemocnými dobře tolerován a léčba může být dle

klinického stavu zkrácena (3 dny) či prodloužena snížením dávky na 400 mg *pro die* (deně) [13].

2.4 Využití veterinárních fluorochinolonů

V posledních deseti letech došlo v klinické veterinární medicíně k důraznému nástupu jedné skupiny antimikrobiálních chemoterapeutik, jejichž rozšíření na trhu bylo předznamenáno uvedením enrofloxacinu, prvního původního veterinárního fluorovaného chinolonu pro malozvířecí praxi, v roce 1992 do České republiky [14].

Fluorochinolony se od té doby rozšířily nejen ve spektru účinných látek (marbofloxacin, difloxacin, orbifloxacin aj.), ale především v běžné praxi. Tato skutečnost je potom často v rozporu s požadavkem racionálního přístupu v používání antimikrobiálních léčiv ve veterinární praxi, podle něhož by fluorochinolony měly být nasazovány až po selhání obvyklejších antibiotik (např. betalaktamů) a to cíleně na známého původce s prokázanou rezistencí na běžná antimikrobika. Na některé patogeny obecně (zejména uropatogenní pseudomonády) je nutné při podání fluorochinolonů dosáhnout vyšších koncentrací především v tkáni. Jen tak je dosaženo dostatečného baktericidního účinku, protože MIC fluorochinolonů pro pseudomonády bývá zpravidla významně vyšší než pro ostatní patogeny [14].

Specifické postavení fluorochinolonů v terapii urologických infekcí (onemocnění močové soustavy) je ve skutečnosti dáno už historií jejich vývoje. Na počátku byla kyselina nalidixová, první chinolon využívaný v humánní praxi a to jako uroantiseptikum, avšak působící jen proti gramnegativním patogenům a nedosahující účinné hladiny v krvi. Zdokonalením základní molekuly vznikla druhá generace chinolonů s typickým zástupcem kyselinou oxolinovou, která ve svém účinném spektru zahrnuje i grampozitivní mikroby, ovšem opět jen s dosahem v močovém aparátu. Kyselina oxolinová je dodnes využívána v české humánní urologické praxi [14].

Teprve zařazení fluoru do chinolonové molekuly zdokonalilo farmakokinetické vlastnosti chinolonů a dalo tak na počátku 80. let 20. století vzniknout jejich třetí generaci. V humánní praxi se následně rozšířilo používání pefloxacinu, ciprofloxacinu, ofloxacinu, norfloxacinu a dalších antimikrobik. Zejména ciprofloxacin, ale i norfloxacin jsou i dnes hojně využívanými antimikrobiky ve veterinární malozvířecí praxi; jednoznačným důvodem pro jejich použití je ekonomický aspekt léčby. Zůstávají totiž významně levnějšími než nabídka

producentů veterinárních generik, kteří vyrábí enrofloxacin; ceny později vyvinutých veterinárních fluorochinolonů jsou však ještě nákladnější [14].

Enrofloxacin je nejstarším fluorovaným chinolonem registrovaným pro veterinární použití, bývá doporučován především na léčbu recidivujících nebo komplikovaných uroinfektů. Vyznačuje se vysokou účinností na téměř všechny hlavní uropatogeny u psů (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*), výjimkou je pouze skupina *Streptococcus* spp./*Enterococcus* spp. Vykazuje baktericidní *in vitro* účinnost dokonce i u většiny neobvyklých a obtížně léčitelných uroinfekcí způsobených *Corynebacterium urealyticum* [14].

Difloxacin je veterinární fluorochinolon připravený se záměrem dosažení zlepšeného průniku antimikrobika do tkání, prodloužení poločasu eliminace a vyšší antibakteriální aktivity. Při srovnávacím testování amerických a evropských patogenních kmenů měly difloxacin i enrofloxacin stejnou baktericidní aktivitu vůči všem testovaným běžným patogenům s výjimkou *Staphylococcus intermedius*, u něhož byl difloxacin účinnější [14].

Orbifloxacin je v ČR registrován výlučně v indikaci močové infekce způsobené citlivými kmeny *E. coli* nebo *Proteus mirabilis*, a to jen v případě nekomplikovaných infekcí močového měchýře. Proti *Pseudomonas aeruginosa* má z veterinárních fluorochinolonů nejlepší *in vitro* antibakteriální aktivitu marbofloxacin [14].

Flumequin, chinolon zastoupený v ČR řadou přípravků, má hlavní využití v chovech hospodářských zvířat (ryb, drůbeže aj.). Byla testována jeho účinnost při diagnostice uroinfekcí u psů sledovaných v letech 1981 – 1985 ve Francii: 100% citlivost *in vitro* tehdy vykazovaly z obvyklých uropatogenů jen *E. coli*. Vysoká citlivost byla také zjištěna u *Proteus mirabilis* (93 %) i u stafylokoků (97 %), poněkud menší efekt byl zaznamenán u pseudomonád (72 %). Naopak nepřekvapila vysoká rezistence u streptokoků (83 – 90 %), tedy patrně společně s enterokoky [14].

Ibafloxacin je dalším fluorochinolonem registrovaným v ČR v indikaci uroinfekcí u psů. Na základě farmakodynamické studie s patogenními izoláty močových infektů ze psů byla prokázána dobrá aktivita proti *E. coli*, *Proteus* spp., *Staphylococcus* sp. a *Klebsiella* sp., střední aktivita proti *Enterococcus* spp. a nízká aktivita proti *Pseudomonas* spp. a *Streptococcus* spp. [14].

Levnější ekonomiky veterinární fluorochinolonové terapie lze dosáhnout použitím humánních preparátů (ciprofloxacin, ofloxacin) s nejistou biologickou dostupností a tím i bakteriocidní účinností nebo nasazením méně potentního veterinárního přípravku (flumequin) anebo použitím veterinárního generického přípravku (enrofloxacin), případně nestandardním injekčním podáním v jednorázovém či třikrát opakovaném dávkovacím schématu (marbofloxacin) [14].

3 *ESCHERICHIA COLI*

3.1 Střevní mikroflóra – *Escherichia coli*

Fyziologická mikroflóra trávicího traktu má významný vliv na mnohé fyziologické, imunologické a biochemické charakteristiky makroorganismu. Syntetizuje a exkretuje vitaminy v nadbytku vlastních potřeb, které mohou být absorbovány jako výživa pro hostitele. Střevní mikroflóra předchází kolonizaci trávicí soustavy patogenními mikroorganismy tím, že soutěží o receptory epiteliálních buněk a esenciální složky výživy. Antagonisticky působí proti bakteriím produkcí látek, které inhibují růst a nebo přímo usmrcují jiné (nepůvodní) bakterie. Střevní bakterie produkují různé látky, a to od relativně nespecifických mastných kyselin až po vysoko specifické bakteriociny. Stimulují vývoj některých tkání, např. slepého střeva nebo lymfatického systému v gastrointestinálním traktu [15].

Escherichia je rod gramnegativních, fakultativně anaerobních, bičíkatých bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*, žijící v trávicím traktu teplokrevných živočichů [16]. *Escherichia coli* je jedním z nejdůležitějších zástupců střevní mikroflóry a její přítomnost je nezbytná pro správný průběh trávicích procesů v tlustém střevě [17]. Produkuje vitamin K a některé B vitaminy [15].

Escherichia coli je primárně citlivá na většinu antibiotik (s výjimkou benzylpenicilinu), ale zejména nemocniční kmeny mají sekundární rezistenci přenosového typu. Terapie extraintestinálních infekcí spočívá v léčbě antibiotiky, u intestinálních forem je nutno dbát na rehydrataci [18].



Obrázek 2. *Escherichia coli* při 1000násobném zvětšení [17]

3.2 Význam *Escherichia coli* jako modelového organismu

Escherichia coli je díky jednoduché kultivaci a rychlému růstu svých kolonií významný modelový organismus na úrovni genetiky i molekulární biologie. Umožňuje studium základních mechanismů života jako je replikace DNA či kódování genetické informace.

Konjugace je jedinou metodou genetické výměny u bakterií, která umožňuje přenos velké části chromosomu z jedné buňky do druhé – pomocí rekombinační analýzy byla vytvořena úplná vazbová mapa bakteriálního chromosomu. Konjugace je schopna zajistit přenos plazmidové DNA z donorové do recipientní buňky. Bakteriální genom může vedle základního genetického vybavení (genoforu, chromosomu) obsahovat menší genetické elementy (plasmidy) o molární hmotnosti 3 – 50 mg/mol a v některých případech i větší. Toto dodatečné genetické vybavení buňky není pro životaschopnou buňku nutné, jejich přítomnost však může poskytovat buňce řadu nových fenotypových vlastností, jako je schopnost konjugace (sex-faktory), zvýšená rezistence k antibiotikům (faktory R), schopnost tvořit kolonice (faktory C) a jiné vlastnosti. Z různých fertálních neboli sex-faktorů je nejvíce prostudován faktor F u *Escherichia coli* K 12 [19].

Escherichia coli je jako modelový organismus vhodná pro detekci mutagenních a karcinogenních účinků nejrůznějších látek vyskytujících se ve vnějším prostředí, eventuálně používaných v průmyslu, k prevenci i k terapii lidských a zvířecích onemocnění apod. Mutace je vyvolána změnou pořadí basí v DNA. Mutace mohou vznikat jednak v jednom směru, kdy vznikne např. auxotrofní mutant, ale také ve směru opačném. Tyto mutace v opačném směru (u kterých je indukován původní charakter) se nazývají *reverse*. Tato *reverse* vzniká buď jako výsledek zpětné mutace v původní poloze, nebo jako výsledek jiné mutace v nukleotidové oblasti odlišné od té, která původně mutovala – v tomto případě se jedná o supresorovou mutaci [19].

Při izolaci mutantů rezistentních na antibiotika a jiné látky se obvykle buněčná suspenze exponovaná mutagenem po inkubaci v tekuté kompletní půdě očkuje po patřičném naředění do vhodné selekční půdy; může se též použít metoda replikace kolonií z pevné kompletní půdy na půdu s příslušnou látkou [19].

3.3 Patogenní *Escherichia coli*

Escherichia coli je široce rozšířeným střevním patogenem savců a ptáků, a ačkoli je vázána na fekální kontaminaci, nevyskytuje se samostatně mimo živočišné tělo. Některé kmeny jsou patogenní pro člověka a zvířata a způsobují septické infekce a průjemová onemocnění. Většina epidemií je spojována s konzumací potravin bovinního původu – to znamená s výrobky z hovězího masa a mléčnými produkty. Další častou možností je konzumace zeleniny zalévané fekálně znečištěnou vodou [3].

Druh *Escherichia coli* zahrnuje 2 biotypy, z nichž biotyp I tvoří 95 %, biotyp II tvoří 5 % kmenů. Jednotlivé kmeny jsou charakterizovány kombinacemi O (stěnových), K (kapsulárních) a H (bičíkových) antigenů. Kmeny EEC (enteropatogenní *Escherichia coli*) tvoří 32 skupin sérovarů. Některé jsou rozšířeny po celém světě, jiné sérovary se vyskytují pouze v určitých geografických oblastech [3].

3.3.1 Enteropatogenní kmeny *Escherichia coli*

Kmeny EEC lze rozdělit do několika skupin podle typu onemocnění, které způsobují [3]. Mezi základní patogenní typy *E. coli*, které se uplatňují u živočichů patří EPEC, ETEC, EIEC (ExPEC), EHEC, APEC, NTEC (tab. 2). V humánní medicíně jsou to také EAEC, DAEC [20].

Kmeny EPEC (enteropatogenní *E. coli*) způsobují kojenecké průjmy. Adherují k buňkám střevního epitelu, ve kterém působením cytotoxinů narušují transport kapalin a elektrolytů [3]. EPEC indukují akumulaci cytoskeletových proteinů pod místem jejich přilnutí k epiteliální buňce, což se projevuje charakteristickými změnami „oholení epitelu“ (A/E léze, Attaching and Effacing). Sekreční aparát typu III (T3SS) enteropatogenních *E. coli* umožňuje inzerci širokého spektra proteinů do epiteliální buňky, které spouští změnu sekrece elektrolytů, poškození těsných spojů mezi enterocyty, zánět a průjem. Infekce epiteliální kultury enteropatogenními *E. coli* stimuluje fosforylaci lehkého myozinového řetězce (MLC20) [21]. Adherence bakterií EPEC je blokována různými cukry, jako jsou galaktóza, N-acetylgalaktosamin, N-acetylglukosamin a fukozylované oligosacharidy a gangliosidy z mléka, které jsou receptory v glykoproteinech hostitelských buněk [15].

Kmeny ETEC (enterotoxigenní *E. coli*) jsou endemické v zemích třetího světa, kde způsobují průjemová onemocnění kojenců, dětí a podvyživených dospělých s vysokým procentem

úmrtnosti [3]. ETEC se adherují na enterocyty tenkého střeva a vodnatý průjem spouštějí sekrecí termolabilního a/nebo termostabilního enterotoxinu [15].

Kmeny EIEC (enteroinvazivní *E. coli*) vyvolávají u člověka onemocnění typu úplavice. Nemají živočišné hostitele. Biologicky i antigeně jsou blízce příbuzné shigelám [3]. EIEC zasahují epitel tračníku, způsobují lýzy fagozomů a procházejí buňkou jádrem aktinových mikrofilamentů. Mohou procházet i bočně přímo přes epitel mezi buňkami a znovu vstupovat bazolaterální plazmatickou membránou [15].

Kmeny EHEC (enterohemoragické *E. coli*), jejichž hlavním epidemiologickým reprezentantem je v současné době sérotyp O157:H7, způsobují u člověka onemocnění typu dyzenterie, často komplikované uremicko – hemoragickým syndromem. Jako původci alimentárních infekcí se začaly objevovat v posledních cca 25 letech [3]. Enterohemoragické *Escherichia coli* O157:H7 produkují *Shigelle* podobné toxiny Stx1 a Stx2, kolonizují epitel tračníku tlustého střeva a indukují akutní zánět tračníku, ale nepoškozují epiteliální buňky. Povrchový protein intimin kódovaný *eae* geny způsobuje charakteristické A/E léze na apikální buněčné membráně colonocytů (buněk tračníku) [22].

Obecně vyvolávají kmeny EPEC a ETEC gastroenteritidy obdobné salmonelózám, kmeny EIEC a EHEC jsou původci onemocnění typu shigelové dyzenterie [3].

Kmeny EAEC (enteroadherentní) se adherují na epitel tenkého a tlustého střeva v podobě tenkého biofilmu a tvoří enterotoxiny a cytotoxiny. Kmeny DAEC (*Escherichia coli* s difuzní adhezí) vyvolávají charakteristický efekt signální transdukce v enterocytech tenkého střeva, které se projevují růstem dlouhých palců podobných útvarů [15].

Tabulka 2. Výskyt patogenních *E. coli* u mláďat [15]

Onemocnění (věk)	Kategorie	Lokalizace
Novorozenecký průjem (0-1 týden)	ETEC	Tenké střevo
Průjem selat (2-4 týden)	ETEC	Tenké střevo
Poodstavový průjem (4-8 týden)	ETEC/APEC	Tenké střevo
Edémová choroba (4-8 týden)	VTEC	Tenké střevo
Septikémie (0-4 týden)	ExPEC/ETEC	Systémová

3.3.2 Verotoxigenní kmeny *Escherichia coli*

Konowalchuck a kol. (1977) popsali bakteriální toxin způsobující cytopatický efekt na Vero buňkách a navrhli pojmenování verotoxin. Verotoxigenní kmeny *E. coli* (VTEC) se řadí do vícero skupin. První skupina je označována jako enterohemoragické *E. coli* (EHEC). Nejznámějším a diagnosticky nejvýznamnějším představitelem této skupiny je kmen *E. coli* O157:H7 [15]. Kmeny této skupiny způsobují u lidí hemoragickou kolitidu (HC), hemolyticko-uremický syndrom (HUS) a vyhlazení střevního epitelu, tzv. attaching-effacing (A/E) léze. Infekční dávka pro člověka u těchto patogenů je velmi nízká, porovnatelná se šigelami, pro *E. coli* O157:H7 byla stanovena na méně než 50 bakterií [23]. Druhou skupinou jsou tzv. EHEC podobné animální kmeny (hlavně telecí), které způsobují enteritidu a krvavý průjem. Třetí skupinu tvoří tzv. atypické EHEC, do níž patří např. kmeny izolované z edémové choroby prasat a produkující StIIe toxin [15].

Z hlediska diagnostiky je potřebné se zabírat kromě O157 *E. coli* i tzv. non-O157 *E. coli*, které se vyskytují především u přežvýkavců. Tyto verotoxické kmeny jsou u dobytka přítomné ve dvou případech. Zaprvé u novorozených telat až po věk čtyř měsíců a za druhé u zdravých zvířat (mladých telat a dospělého dobytka). Kromě toho se verotoxické kmeny *E. coli* vyskytují i v truse jiných druhů domácích a divoce žijících přežvýkavců buď ve spojení s chorobou a nebo u zdravých zvířat. Přežvýkavci představují rezervoár *E. coli* O157:H7 pro lidskou populaci. Hlavní cestou šíření je kontaminace masa z EHEC z trávicího traktu dobytka během porážky. Podobnou fekální cestou může být kontaminováno i mléko počas dojení. Proto konzumace nedostatečně tepelně upraveného hovězího masa (hamburgery) a nepasterizovaného mléka představuje hlavní cestu šíření *E. coli* O157:H7. Taktéž zelenina a ovoce mohou být kontaminovány kravským trusem a po hygienických chybách při zpracování se mohou přenášet např. nepasterizovaným jablečným džusem. *E. coli* O157:H7 jsou totiž acidotolerantní a přežívají i při pH okolo 4,0 [15].

3.3.3 Extraintestinální (septikemické) kmeny *Escherichia coli*

Extraintestinální patogenní *Escherichia coli* (ExPEC) reprezentují širokou skupinu kmenů, které způsobují systémové infekce krevního řečiště (sepsu), dýchacího aparátu, močového traktu, peritoneální dutiny a meningitidy. Jsou charakterizovány širokým spektrem faktorů virulence, jmenovitě adhezemi, toxiny a akumulací železa. Oproti ostatním patogenním *E.*

coli působícím na úrovni střeva nemají specifický faktor virulence a nevyvolávají charakteristické klinické příznaky [15].

Aviárně patogenní *E. coli* (APEC) způsobují hlavně extraintestinální infekce drůbeže. Aviární kolibacilóza začíná jako infekce horních cest dýchacích a často vede k celkové infekci vnitřních orgánů: pericarditis, perihepatitis, peritonitis a salpingitis. Mezi nejdůležitější sérotypy APEC patří O1, O2 a O78. Důležitým krokem v infekčním procese je adherence APEC na epitel trachey, pomocí které překonávají obranný mechanismus (vrstvu tracheálního hlenu) a umožňují úspěšnou kolonizaci. Tento fenomén adherence je zprostředkovaný F1 pili-proteinovými strukturami (fimbriemi) přítomnými na vnější membráně většiny kmenů *E. coli* a dalších členů čeledi *Enterobacteriaceae* [24].

Nekrotoxigenní *E. coli* (NTEC) jsou charakterizovány produkcí dvou typů cytotoxických nekrotoxických faktorů a to CNF1 a CNF2. Kmeny produkující CNF1 se vyskytují při průjmech, extraintestinálních a uro-infekcích u lidí, dobytka, selat, psů, koček a koní. CNF2 pozitivní kmeny byli izolovány od telat a jehňat trpících průjmem [15].

3.4 *Escherichia coli* a enterální infekce u hospodářských zvířat

Z hlediska patogeneze je základní cestou přenosu původců infekcí távicího traktu zvířat fěkálně-orální kontakt. Patogenní mikroorganismus přichází do těla jako výsledek příjmu potravy. Při vstupu mikroorganismů do žaludku jsou podrobeny dekontaminujícímu účinku žaludeční kyseliny. Jestliže se střevní patogen dostane do tenkého střeva, musí obstát v konkurenci s komenzálními mikroorganismy, zvláště anaerobními bakteriemi (*Bacteroides*), laktobacily, bifidobakteriemi a enterokoky. Žluč a trávicí enzymy přítomné v dvanáctníku omezují růst většiny patogenních bakteriálních druhů. Normální střevní motilita jakož i přítomnost hlenu (mucinu) reguluje růst bakterií ve střevě. Odlupování nejvrchnější vrstvy střevní sliznice může též ovlivnit hustotu komenzálních bakterií právě adherovaných k epiteliálnímu povrchu [25].

Výskyt enterálních chorob je často podmíněn kvalitou chovu mláďat, zoohygienickými podmínkami, špatnou technikou krmení (studený nápoj, nadměrné množství mléka) ve spojení s infekčními agens. Nejčastější jsou novorozenecké průjmy u selat a telat způsobené enteropatogenní *E. coli*, dále nekrotická enteritida u kuřat, selat a telat způsobená *Clostridium perfringens* typu A, C a konečně také podstavový průjem a edémová choroba

u odstavených nekojených mláďat (hemolytické *E. coli*). Příčinou infekčních průjmů jsou v prvních dvou týdnech života telat *Escherichia coli* (39 %), rota a corona viry (9 %) a kryptosporidie (11 %), resp. u 35 % mikrobiálních průjmů je příčinou smíšená infekce [15].

Vědečtí pracovníci z Massachusettského institutu se zabývali rizikem pramenícím z enterolytických bakterií *E. coli*. Autoři ve své studii poukazují na to, že králíci jsou rezervoárem *E. coli* (EHEC), což by mohlo představovat riziko zoonózy (přenosného onemocnění) pro člověka. Onemocnění probíhá nejčastěji jako mírný průjem, který bývá jen zřídka diagnostikován. U malých dětí, starších lidí a pacientů s oslabeným imunitním systémem se může vlivem infekce enterolytických bakterií vyvinout tzv. hemolyticko-uremický syndrom (HUS), charakterizovaný poškozením ledvin a hemolýzou [26].

V jiné vědecké publikaci byl zkoumán vliv jednorázové intramuskulární injekce kombinace ampicilinu, colistinu a dexametazonu na klinicko-patologický vývoj experimentální mastitidy (zánětu vemene) krav, vyvolané endotoxinem *E. coli*. Klinický pokus byl proveden u 30 vysokoprodukčních krav, které byly rozděleny do pěti skupin po šesti zvířatech. 24 dojnicím byl infundován *E. coli* endotoxin do dvou čtvrtí vemene [27].

Infuze *E. coli* endotoxinu vyvolala u všech 48 čtvrtí vemene krav výrazné lokální zánětlivé projevy, charakterizované difúzním otokem, zvýšenou teplotou a bolestivostí. Již dvě hodiny po infuzi *E. coli* endotoxinu byla u 35 % čtvrtí vemene pozorována změna sekretu, která byla po čtyřech hodinách znatelná již u všech čtvrtí. Tyto změny zahrnovaly přítomnost krevních sraženin a vloček v hustém, mléku nepodobném sekretu nebo ve vodnatém sekretu. Systemické změny byly pozorovány u všech krav s infuzí *E. coli* endotoxinu. Počet buněčných elementů se zvýšil velice významně u všech 48 čtvrtí kravského vemene. Množství buněčných elementů kulminovalo 24 - 32 hodin po infuzi *E. coli* endotoxinu. Produkce mléka byla výrazně alterována (narušována) u všech skupin s infuzí endotoxinu *E. coli* [27].

Vliv jednorázové intramuskulární aplikace kombinace ampicilin/colistin/dexametazon na lokální i systemické projevy mastitidy byl vyhodnocen jako signifikantní (významný). Zejména doba zvýšeného počtu buněčných elementů v mléce se signifikantně zkrátila a signifikantně rychlejší byl i návrat k mléčné produkci před infuzí *E. coli* endotoxinu. Výsledek tohoto klinického pokusu zřetelně ukázal možnost zvýšit terapeutickou odezvu u akutních koliformních mastitid krav použitím kombinace colistin/dexametazon [27].

3.5 Alimentární infekce verotoxigenní *Escherichia coli*

Zoonózy jsou infekční onemocnění přenosná ze zvířat na lidi. Infekci je možné získat kontaktem se zvířaty nebo požitím kontaminovaných potravin jako tzv. alimentární infekci. Vážnost těchto onemocnění u lidí kolísá od mírných symptomů až k život ohrožujícím stavům. Významnou úlohu mezi původci těchto alimentárních infekcí sehrávají gramnegativní bakterie (např. *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Escherichia coli*, *Yersinia* sp., *Brucella* sp.). Pro prevenci nálezů je důležité zjistit, která zvířata, a které potraviny jsou hlavními zdroji těchto infekcí. Pro tyto účely jsou z celé Evropské unie (EU) shromažďovány informace, které se následně analyzují, aby bylo možné včas přijmout správná opatření na ochranu lidského zdraví [28].

Ze 17 členských států EU bylo v roce 2004 hlášeno celkem 4 143 případů infekce verotoxigenní *Escherichia coli* (VTEC). Incidence v EU byla 1,3 případů na 100 000 obyvatel. Celkový počet nahlášených humánních případů se oproti roku 2003 zvýšil. Větší část tohoto nárůstu byla hlášena Českou republikou, která se podílela na celkovém počtu případů z 42 %. Při srovnání pouze těch členských států EU, které nahlásily údaje za oba roky, se celkový počet od roku 2003 do roku 2004 ve skutečnosti snížil o 3 %. Počet případů HUS (hemolyticko-uremického syndromu) způsobeného VTEC zůstal obdobný jako počet hlášený v roce 2003. Procento případů způsobených sérotypem VTEC O157 značně kolísalo, avšak v 6 zemích tvořil sérotyp O157 více než dvě třetiny z izolátů [28].

Údaje o výskytu VTEC v potravinách nahlásilo celkem 18 členských států a Norsko. Většina pozitivních vzorků pocházela z nezpracovaného mléka a hovězího masa. Několik členských států však nahlásilo VTEC i z vepřového, drůbežího a skopového masa a některých rybích produktů. Rozdílly ve velikosti vzorků a v druhu a kvalitě údajů však neumožňovaly srovnání mezi jednotlivými zeměmi [28].

VTEC byla zjištěna u několika druhů zvířat. Většina pozitivních vzorků byla izolována ze skotu, což naznačuje, že skot slouží jako důležitý zdroj expozice verotoxigenní *Escherichia coli* u lidí. Pozitivní nálezy byly také hlášeny u koz, ovcí, prasat a drůbeže [28].

Celkem bylo v roce 2004 v EU ohlášeno 6 860 veškerých alimentárních nálezů, které postihly 42 447 osob, ze kterých 9,8 % bylo hospitalizováno. V rámci těchto alimentárních infekcí bylo ohlášeno třináct úmrtí. Největší počet nálezů nahlásila Česká republika (2 334) a Německo (2 647), což představuje 72,6 % všech nálezů za rok 2004. Česká republika

nahlásila proporcionálně více nálezů salmonelou, než kterákoliv jiná země. Po *Salmonella* sp. byl druhým nejčastějším původcem nálezů v EU v roce 2004 *Campylobacter* sp. Dalšími významnými původci alimentárních onemocnění v EU byly patogenní *Escherichia coli* (1,3 % nálezů) a *Yersinia* spp. (0,7 % nálezů) [28].

Na základě výsledků cíleného vyšetření surovin a potravin živočišného původu (monitoring zoonóz) ve Státním veterinárním ústavu (SVÚ) Olomouc lze orientačně vyhodnotit situaci na Moravě [28].

V rámci výše uvedeného monitoringu zoonóz bylo v roce 2005 na SVÚ v Olomouci vyšetřeno 8 587 vzorků potravin a surovin, ze kterých bylo izolováno 13 kmenů salmonel (4x *Salmonella enteritidis*). Vzhledem k tomu, že ČR je brucelózy prostá, potraviny se v rámci monitoringu na *Brucella* sp. nevyšetřují. Na přítomnost *Yersinia enterocolitica* bylo vyšetřeno 181 vzorků s negativním výsledkem. Na verotoxinogenní *Escherichia coli* (VTEC) bylo vyšetřeno 169 vzorků potravin, žádný vzorek nebyl pozitivní [28].

4 REZISTENCE *ESCHERICHIA COLI* NA ANTIBIOTIKA

4.1 Rezistence u *Escherichia coli* na β -laktamová antibiotika

Nejdůležitější mechanismus bakteriální rezistence vedoucí k inhibici baktericidního účinku β -laktamových antibiotik (penicilinů, cefalosporinů, monobaktamů a karbapenemů) představují v současné době β -laktamasy. Tyto bakteriální enzymy mohou uplatnit svoji katalytickou účinnost dvojitým způsobem: 1) pomocí reaktivního serinového rezidua v aktivním místě, 2) účinkem těžkých kovů, nejčastěji Zn^{2+} , spolu s rezidui histidinu a (nebo) cysteinu [29]. β -laktamasy inaktivují β -laktamová antibiotika hydrolýzou jejich β -laktamového kruhu [30].

U řady gramnegativních bakterií se přirozeně vyskytovala produkce chromozomálně kódovaných β -laktamas, jejichž vývoj byl pravděpodobně podmíněn selekčním tlakem některých půdních bakterií produkujících antimikrobiální látky s β -laktamovým kruhem. První plasmidem kódovaná β -laktamasa byla na začátku 60. let 20. století TEM-1. Další „klasickou“ β -laktamasou je SHV1, jejíž produkce je kódována plasmidem u kmenů *Escherichia coli* a chromozomem u většiny kmenů *Klebsiella pneumoniae* [29].

K překonání hydrolytické aktivity TEM1 a SHV1 bylo vyvinuto mnoho β -laktamových antibiotik. K těmto přípravkům patřily, mimo jiné, oxyiminocefalosporiny (např. cefotaxim, ceftriaxon, ceftazidim), které se v průběhu 80. let masivně používaly v terapii infekcí způsobených gramnegativními bakteriemi. Velmi rychle se proto objevila rezistence podmíněná produkcí β -laktamas. Prvním z těchto enzymů byl enzym SHV2 popsáný v roce 1985. Širokospektré β -laktamasy schopné hydrolyzovat oxyiminocefalosporiny, jejichž účinek je inhibován kyselinou klavulanovou, jsou označovány jako ESBL [29]. Tyto β -laktamasy širokého spektra jsou schopny hydrolýzy cefalosporinů 3. i 4. generace a monobaktamů [30], nejsou však aktivní proti cefamycinům a většina ESBL-pozitivních kmenů je z tohoto důvodu citlivá na cefoxitin a cefotetan. Většina ESBL jsou deriváty původních TEM a SHV enzymů, nejčastěji jsou identifikovány u kmenů *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae*. V současné době existuje více jak 100 TEM typů β -laktamas a více jak 50 SHV typů (Bush K., Jacoby G.A.). K novější skupině ESBL patří CTXM enzymy, které hydrolyzují především cefotaxim [29].

Rezistence na β -laktamová antibiotika u čeledi *Enterobacteriaceae* se stává stále významnějším problémem. Nejčastějším mechanismem jejího vzniku je produkce zmíněných β -laktamas. Kromě původních β -laktamas, které se u gramnegativních mikrobů objevily počátkem 60. let, se stále více objevují enzymy se širokým spektrem účinku (ESBL). Geny pro ně jsou většinou nesené na plasmidech. Nejčastěji se vyskytují u *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli*, byly také nalezeny u dalších rodů čeledi *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*, *Proteus* aj.). Většina ESBL patří do skupiny SHV nebo TEM a vzniká bodovou mutací genu původních enzymů (SHV1, TEM1). Důsledkem je záměna aminokyseliny v aktivním centru enzymu a tím i ovlivnění jeho aktivity [30].

Detekce ESBL je prováděna většinou fenotypickými testy (MIC, double disc synergy a Etestem). Metody molekulární biologie mohou v určitých případech významně přispět k prvotnímu záchytu (urychlení detekce) nebo potvrzení již fenotypicky diagnostikované ESBL. Velký význam mají z hlediska epidemiologického pro studium šíření a charakterizaci jednotlivých typů ESBL [30]. V běžném provozu mikrobiologické laboratoře je výhodné používat vyhledávací „screening“ pro ESBL-pozitivní kmeny. Lze použít například standardní diluční mikrometodu poskytující hodnoty MIC pro některé cefalosporiny 3. generace a současně pro kombinace některých β -laktamových antibiotik s inhibitory β -laktamas. Na základě zhodnocení antibiogramu je možné u vybraných kmenů předpokládat produkci ESBL. K dalším vyhledávacím metodám pro produkci ESBL patří diskový test s cefpodoximem (CPD). Při rezistenci vyšetřované enterobakterie k CPD (zóna kolem CPD <17 mm) a rovněž v korelaci s klinickým významem testovaného kmene, je vhodné stanovit produkci ESBL [29].

4.2 Veterinární fluorochinolony a chinolonová rezistence

Mezi veterinárně používané fluorochinolony patří flumechin, enrofloxacin, norfloxacin, marbofloxacin, danofloxacin. Fluorochinolony jsou aktivní vůči grampozitivním a gramnegativním bakteriím. Je známo vícero mechanismů rezistentního účinku. Do roku 1998 to byly jen chromozomální mutace v QRDR genové oblasti (Quinolone Resistance-Determining Region) u genů *gyrA* (*DNA-gyrasa A*), *gyrB*, *parC*, *parE*. Z hlediska mechanismu účinku blokují replikaci DNA tvorbou reverzibilních komplexů s *topoisomerasami* typu II (*DNA-gyrasa*) a typu IV [15].

Ačkoliv je *Escherichia coli* citlivá na fluorochinolony, existují kmeny s nižší citlivostí resp. též rezistentní kmeny. Chinolonová rezistence je v korelaci s mutacemi lokalizovanými na QRDR oblasti genu *gyrA*. Nejčastěji byly pozorovány u laboratorních mutantů *E. coli* změny v aminokyselinovém složení v Ser-83 (na Leu, Phe, Tyr nebo Ala) a/nebo v Asp-87 (na Gly, Asn či Tyr) na *gyrA* [31], přičemž kmeny měly vysoké hladiny rezistence na kyselinu nalidixovou a sníženou citlivost na fluorochinolony. V případě jednoduché mutace měla většina uropatogenních kmenů *E. coli* (UPEC) hladinu MIC (minimální inhibiční koncentrace) na ofloxacin 0,39 - 3,13 mg/l, zatímco u dvojitě mutace až 6,25 – 100 mg/l [32].

4.3 Plazmidová chinolonová rezistence u *Escherichia coli*

V roce 1998 byl objeven nový mechanismus účinku chinolonové rezistence a to plazmidem kódovaná rezistence *qnr* genů u *Klebsiella* v USA, roku 2003 byl *qnr* objeven i u *Escherichia coli* v Číně. V letech 2007 – 2008 se objevily *qnr* geny na plazmidech kódujících multirezistenci v nových druzích bakterií. Kromě toho byly objeveny i nové varianty genů a to *qnrA* – šest variant, *qnrB* – šest variant a *qnrS* – dvě varianty. Roku 2006 byl objeven další mechanismus účinku: plazmidem kódovaná enzymatická inaktivace určitých chinolonů. Varianta genu *aac(6′)-Ibr-cr* kóduje aminoglykosidovou *acyltransferasu*, která poskytuje redukovanou citlivost na ciprofloxacin N-acetylací jeho piperazinylationu. Jestliže jsou oba geny *qnrA* a *aac(6′)-Ibr-cr* přítomny v jedné buňce, hladina rezistence způsobená samotným *qnrA* stoupne 4krát na hodnotu MIC ciprofloxacinu 4 mg/l. Přítomnost samotného genu *aac(6′)-Ibr-cr* podstatně zvyšuje frekvenci selekce chromozomálních mutací po expozici ciprofloxacinem [15].

Geny *qnr* kódují proteiny které blokují působení ciprofloxacinu na bakteriální *DNA-gyrasu* a *topoisomerasu* typu IV [33]. Výsledkem je 8 – 32 násobné zvýšení hladiny MIC ciprofloxacinu např. z hladiny 0,016 mg/l u divokého kmene *E. coli* J53 na hladinu 0,25 mg/l. Tato redukováná citlivost je důležitá při selekci chromozomálních mutantů s vysokou hladinou rezistence [34].

4.4 Problematika mechanismů rezistence *Escherichia coli* k fluorochinolonům

Kromě nemocničního prostředí, kde lze evidovat rychlé zvyšování počtu rezistentních kmenů například u enterobakterií, acinetobakterů, pseudomonád a stafylokoků, se projevuje rezistence k fluorochinolonům i u původců komunitních infekcí jako *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, pneumokoků, stafylokoků a dalších. Také většina závažných fenotypů rezistence (MRSA (metilicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*), VRE (vankomycin-rezistentní *Enterococcus*), produkce ESBL (β -laktamas širokého spektra) aj.) je ve vysokém procentu spojena s rezistencí k chinolonům [35].

Mechanismy, kterými jsou bakterie schopny vzdorovat účinku chinolonů lze rozdělit do tří základních skupin:

- a) mutace vedoucí k alteraci cílových struktur v bakteriální buňce – *topoisomerasy*,
- b) mutace s následkem omezené akumulace chinolonů intracelulárně (vnitrobuněčně),
- c) plasmidicky kódovaná rezistence [35].

Hlavní mechanismus účinku chinolonů spočívá v reversibilní inhibici syntézy DNA prostřednictvím vazby na *topoisomerasy*, konkrétně *DNA-gyrasu* a *topoisomerasu* typu IV. Změna konfigurace vazebných míst těchto enzymů následně vede v různé míře ke snížení afinity a snižování citlivosti k chinolonům. Velká část výzkumu mechanismu rezistence gramnegativních bakterií k chinolonům probíhala u enterobakterií, především *Escherichia coli*. Alterace podjednotky *gyrA DNA-gyrasy* na podkladě jednobodové mutace genu *gyrA* vede nejčastěji k vysokému stupni rezistence ke kyselině nalidixové, ale u vyšších generací chinolonů má za následek pouze snížení citlivosti a je třeba dalších mutací v *gyrA* a/nebo v *parC topoisomerasy* IV k dosažení jednoznačné laboratorní rezistence. V bakteriální populaci s vytvořenou rezistencí k nalidixinu pravděpodobnost vzniku následných mutací výrazně narůstá. Prokázaná rezistence *in vitro* k nalidixinu je tedy varováním před terapeutickým použitím jakéhokoliv dalšího chinolonu. U grampozitivních bakterií je většinou, na rozdíl od gramnegativních mikroorganismů, primárním cílovým enzymem *topoisomerasa* typu IV [35].

Mutace s následkem omezené akumulace chinolonů intracelulárně, buďto na podkladě sníženého průniku do bakterie, nebo aktivním transportem antibiotika extracelulárně, případně

kombinací obou mechanismů. Chinolony pronikají do bakteriální buňky dvěma různými cestami, jednak prostřednictvím specifických porinů (všichni zástupci) nebo prostou difúzí přes fosfolipidovou vrstvu. Stupeň průniku je ovlivněn povahou základní molekuly, hydrofobní látky přestupují snadněji a ve vyšším kvantu. Zevní membrána *E. coli* obsahuje tři druhy porinů (OmpA, OmpC a OmpF). Jejich redukce snižuje citlivost k chinolonům na velmi rozdílné úrovni [35].

Mnohočetná antibiotická rezistence podmíněná mutacemi *mar* (multiple antibiotic resistance) genů se týká kromě chinolonů i dalších antibiotik jako chloramfenikolů, tetracyklinů. Nitrobuněčnou dostupnost chinolonů výrazně snižuje zejména aktivace tzv. *acrAB* efluxního systému [35].

Složení zevní cytoplasmatické membrány u acinetobakterů nebo *Pseudomonas aeruginosa* již primárně snižuje dostupnost chinolonů („intrinsic“ rezistence). Tato skutečnost vysvětluje rozdíly v rozmezí citlivosti k ciprofloxacinu běžných kmenů *E. coli* (MIC 0,006 – 0,25 mg/l) a acinetobakterů (MIC 0,12 – 1 mg/l). Odhaduje se, že zevní membrána *P. aeruginosa* je desetkrát až stokrát méně propustná pro chinolony ve srovnání s *E. coli* [35].

Plasmidicky kódovaná rezistence je popisována zatím sporadicky, jedná se o nízký stupeň rezistence a zřejmě je podmíněna různými mechanismy včetně degradace [35].

Získaná rezistence k chinolonům je nejčastěji způsobena mutací genů řídících replikaci a segregaci chromozomální DNA, méně často aktivním efluxem chinolonů z bakteriální buňky. Druhy bakterií, jejichž divoké populace jsou inhibovány hodnotami MIC v blízkosti hraniční koncentrace pro daný chinolon (např. stafylokoky nebo nefermentující gramnegativní tyčinky), se stanou rezistentní již v důsledku jedné mutace, zatímco vznik rezistence u druhů inhibovaných velmi nízkými koncentracemi (např. *E. coli*, nebo salmonely) vyžaduje mutace další [10].

Subinhibiční koncentrace fluorochinolonů, které jsou vytvářeny v důsledku podání nízkých dávek nebo nedostatečné systémové distribuce některých starších přípravků, selektují rezistentní buňky z původně citlivé populace bakterií. Tento jev akceleruje dlouhodobé, případně opakované podávání fluorochinolonů (např. u pacientů s chronickými infekcemi, jako jsou cystická fibróza, infekce kloubních implantátů, osteomyelitida apod). Svůj podíl na nízkých koncentracích může mít také jejich omezená penetrace do infikovaných tkání v důsledku snížené vaskularity, přítomnosti abscesů, nebo cizorodého materiálu. Bylo proká-

záno, že fluorochinolony v nízkých koncentracích akcelerují adhezi kmenů MRSA (meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*) k povrchům obsahujícím fibronektin, jako jsou například lidská tkáň nebo zavedené pomůcky a jsou tudíž významným faktorem pro kolonizaci a infekci pacientů těmito kmeny. Fluorochinolony tedy slouží jako léky rezervní, indikované jen v situacích, kdy jsou jiná antibiotika *in vitro* neúčinná nebo nevhodná pro léčbu z důvodu toxicity či nežádoucích účinků [10].

4.5 Vývoj chinolonové rezistence u *Escherichia coli* v evropských zemích a v České republice

V České republice se rezistence k ciprofloxacinu u invazivních kmenů *Escherichia coli* zvýšila v průběhu pěti let z 8 % v roce 2000 na 20 % v roce 2005. Ještě rychlejší vzestup frekvence rezistence byl pozorován u druhů *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa*, kde po počáteční dobré účinnosti je v současné době k fluorochinolonům rezistentní třetina, respektive polovina invazivních kmenů. K fluorochinolonům jsou u nás rezistentní téměř všechny kmeny MRSA (meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*) [10].

V nemocnicích, kde je zavedena nekompromisní restrikce zbytečných aplikací fluorochinolonů, je rezistence k této skupině léků, ale také výskyt MRSA nižší, než v nemocnicích, kde se fluorochinolony aplikují bez omezení. Další znehodnocení fluorochinolonů rezistencí lze odvrátit pouze zpřesněním jejich indikací [10].

Výhodné farmakokinetické vlastnosti, dobrá klinická účinnost, snadné perorální podávání a nízká cena vedly postupně k masivnímu nadužívání chinolonů v primární, ambulantní i nemocniční péči. Nebezpečným důsledkem je alarmující a překvapivě rychlý vzestup rezistence k této lékové skupině, která způsobuje ztrátu její účinnosti. Důležité je, že rezistence je zkřížená, to znamená, že ve vysokém stupni zasahuje všechny generace chinolonů bez výjimky. Nastupuje někdy velmi rychle, v některých případech lze pozorovat vznik rezistence během léčby (*intra therapiam*), např. u pseudomonád je tento fenomén častý, především při delším podávání. Podobný problém vzniká také u jiných bakterií (*Escherichia coli* aj.), a to zejména při dlouhodobém, preventivním podávání nízkých dávek, kdy v poslední době nahradil norfloxacin tradičně používaný nitrofurantoin při prevenci recidivujících a chronických uroinfekcí. Ztráta základních léků volby, které mizí z obchodního trhu, je další

podstatnou příčinou nadužívání fluorochinolonů (např. nitrofurantoin chybějící na trhu v letech 2004 a 2005) [36].

Chinolony ovlivňují nejenom předpokládaného původce infekce, ale také tzv. rezidentní mikroflóru, přítomnou na sliznicích dýchacích cest, ve střevě atp. Tak může docházet k postupnému nárůstu rezistence u některých bakterií, u nichž dosud nejsou chinolony terapeuticky užívány a přípravky vyšších generací se rezervují pro období, kdy budou ztrácet účinnost základní léky volby. Toto nebezpečí se může týkat např. pneumokoků, které mají v českých podmínkách dlouhodobě vynikající citlivost k penicilinu i běžným alternativním antibiotikům a léčba chinolony základních generací je zde klinicky neúčinná. Dlouhodobě vysoká spotřeba chinolonů v populaci může vést k nárůstu rezistence kmenů pneumokoků osidlujících sliznice dýchacích cest dříve, než bude epidemiologická situace vyžadovat terapeutické použití alternativních léků vyšší generace (moxifloxacin). Dalším specifickým fenoménem je používání chinolonů ve veterinární oblasti, zejména v chovech drůbeže, kde existuje rezervoár pro rezistentní kampylobakterové, nebo vzácněji salmonelové infekce. Z výše uvedeného vyplývá, že v současnosti nelze fluorochinolony bezpečně používat pro *empirickou* léčbu infekcí [36].

Údaje z Evropského systému sledování antibiotické rezistence EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) dokumentují extrémně nebezpečnou situaci v rezistenci gramnegativních bakterií vyvolávajících sepsi (reakce organismu na infekci). Bezmála polovina invazivních kmenů *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa* izolovaných v České republice z hemokultur během roku 2005 je rezistentní k fluorochinolonům. Podobná je situace v celé střední a východní Evropě. Prakticky všechny kmeny invazivních MRSA (metilicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*) izolované v ČR jsou rezistentní k chinolonům [36].

Závažnost situace nejlépe dokumentuje trend v rezistenci *Escherichia coli*, což je nejčastější původce komunitních močových infekcí (uoinfekcí). V letech 2001 a 2005 byly provedeny studie, jejichž cílem bylo zjištění situace a trendu v rezistenci původců komunitních infekcí močových cest. Jednalo se o plošnou studii, kterou organizovala NRL (Národní referenční laboratoř) pro antibiotika na celém území České republiky. Mezi roky 2001 a 2005 došlo k dvojnásobnému vzestupu antibiotické rezistence *E. coli* k fluorochinolonům (z 6,2 na 12,2 % k ciprofloxacinu u kmenů z moči – viz příloha I), ale také ke kotrimoxazolu, zatímco na minimálních hodnotách pod 3 % zůstává nitrofurantoin. Kritická

je situace v rezistenci invazivních kmenů *Escherichia coli* vyvolávajících sepsi. V EARSS je dokumentován rychlý vzestup rezistence k chinolonům v mnoha zemích, jeden z nejstrmějších trendů zaznamenává Česká republika. Mezi roky 2000 a 2005 došlo v ČR k nárůstu rezistence *E. coli* k ciprofloxacinu z 8 % na více než 20 % (viz příloha II) a vzestup dále pokračuje. Výsledky přitom vycházejí z vysoce relevantních podkladů. Jedná se o tisícové sestavy kmenů získaných v laboratořích, které spádově pokrývají bezmála 90 % české populace [36].

4.6 Vývoj mikrobiální rezistence vůči veterinárním fluorochinolonům

Fluorochinolony jsou dobrá antimikrobika první volby – podobná nesprávná konstatování bylo možné v 90. letech 20. století slyšet nebo číst poměrně často, což nepochybně vedlo i k rozšířené praxi nasazování fluorochinolonů na nekomplikované případy primárních cystitid, obvykle bez znalosti mikrobiologického pozadí případu. Tento přístup se ostatně v praxi netýkal jen močových infekcí, ale infekcí obecně. Tomu, zdá se, nebrání ani skutečnost, že všechny veterinární fluorochinolony jsou registrovány a také označeny jako přípravky s omezeným indikačním spektrem [14].

Ještě v roce 1999 nebyla zaznamenána zvyšující se rezistence vůči enrofloxacinu, na rozdíl od snižující se klinické účinnosti proti některým mikroorganismům (zejména *E. coli*, *Pseudomonas* spp. a *Staphylococcus* spp.). Dnes je ovšem tato situace jiná, jak dokládají četná nezávislá pozorování po roce 2000. Při srovnání míry rezistence psích uropatogenů (*E. coli*, *Proteus mirabilis* a *Staphylococcus intermedius*) za období 1992 – 2001 bylo zjištěno významné zvýšení rezistence proti ciprofloxacinu i enrofloxacinu; jejich účinnost však i nadále zůstala vyšší než 80 %. Rovněž analýzou kalifornských izolátů uropatogenních *E. coli* ze psů byla potvrzena zvyšující se rezistence těchto kmenů proti enrofloxacinu. U 100 psů s rekurentními uroinfekty (převážně *E. coli* a *Streptococcus/Enterococcus* spp.) byla nedávno zaznamenána rezistence na sérové koncentrace antibiotik včetně enrofloxacinu na úrovni 29,5 % [14].

Situace u ostatních fluorochinolonů je nejasná, protože údajů o bakteriální rezistenci vůči nim je nedostatek. Při posuzování 59 izolátů z psích uroinfektů byla zaznamenána rezistence vůči marbofloxacinu pouze u dvou případů infekce rodem *Enterococcus*. Během let 1994 – 2001 nedošlo u uropatogenních *E. coli* v Evropě k nárůstu rezistence vůči marbofloxacinu. Při *in vitro* posuzování citlivosti 183 kmenů *Pseudomonas aeruginosa* na sérové koncen-

trace antibiotik byl u 94 % izolátů účinný ciprofloxacin i marbofloxacin, zatímco enrofloxacin jen u 71 % [14].

Vzestup incidence mikrobiální rezistence vedl u mezinárodních agentur k hledání souvislostí mezi používáním antiinfektiv u zvířat a klesajícím efektem těchto látek u lidí. Nedávný výzkum antibiotické rezistence stafylokokových kmenů ze zvířat i lidí však tuto souvislost neprokázal; rezistence na fluorochinolony byla v rozsahu 0,5 – 3 % u zvířecích izolátů oproti 5 – 18 % u kmenů lidského původu. Ani hledání podobného vztahu u enterokoků a vankomycinu neprokázalo data svědčící pro přenos rezistence, nicméně odhalilo vysokou míru rezistence psích a kočičích kmenů enterokoků proti enrofloxacinu, ciprofloxacinu a ofloxacinu (77 %, 73 % a 64 % izolátů bylo rezistentních) [14].

Není známo, jakou měrou jsou jednotlivé skupiny antiinfektiv v české veterinární malozvířecí praxi používány, fluorochinolony by však měly být nasazovány až na rezistentní infekce s prokázanou *in vitro* účinností určitého preparátu. V tomto směru by mohlo být vzorem Finsko, v jehož veterinárních fakultních nemocnicích představují fluorochinolony jen 2,8 % z použitých antimikrobik u psů, přičemž u uroinfekcí močového aparátu (UTI, Urinary Tract Infection) je nejvíce nasazována dle celostátního doporučení kombinace trimetoprim/sulfonamid [14]. Studie v Kalifornii prokázala rostoucí rezistenci *E. coli* k enrofloxacinu, který se běžně používá k léčbě UTI u psů. V letech 1994 – 1996 ještě nebyl zjištěn signifikantní nárůst kmenů *E. coli* rezistentních na enrofloxacin. Ten byl zaznamenán u psů s UTI až mezi léty 1996 a 1997. Nárůst rezistentních kmenů v roce 1997 následoval po zintenzivnění používání enrofloxacinu v roce 1996 [37].

4.7 Vývoj rezistence na chinolonová antibiotika u *Escherichia coli* izolovaných od brojlerů na Slovensku

Rezistence na fluorochinolony u zvířecích *E. coli* na Slovensku je velmi vysoká, zvláště u brojlerů a to na úrovni až 50 %, přičemž převládají kmeny s vysokou hladinou MIC na enrofloxacin. Plazmidem kódovaná rezistence na chinolony typu *qnrA* a *aac(6′)-Ibr-cr* nebyla u zvířecích *E. coli* izolovaných od slovenských brojlerů do r. 2007 zjištěna [38].

Izoláty (z let 2006/2007/2008) vykazovaly vysokou rezistenci na nalidixovou kyselinu (87/85/67 %), ciprofloxacin (49/54/29 %) a enrofloxacin (52/42/22 %). Izoláty rezistentní vůči kyselině nalidixové s vysokou hladinou minimální inhibiční koncentrace (MIC) k ci-

profloxacinu a enrofloxacinu vykazovaly jednu genovou mutaci; střední MIC pro ciprofloxacin a enrofloxacin se vztahovala ke dvěma mutacím, zatímco MIC s vysokým stupněm rezistence na ciprofloxacin (≥ 4 mg/l) a enrofloxacin (≥ 16 mg/l) reprezentovala tři genové mutace u *Escherichia coli* (dvě v *gyrA* a jednu v *parC* daného genu) [38] [39].

Plazmidově zprostředkovaná rezistence *qnrS* genu byla detekována r. 2008 u jednoho kmenu *Escherichia coli* s vysokým stupněm rezistence k ciprofloxacinu. Získané výsledky dokazují nárůst výskytu multirezistentních kmenů *E. coli* s vysokým stupněm chromozomální i plazmidové rezistence na fluorochinolony [39].

Vysoký podíl vysokostupňové chinolonové rezistence byl pozorován během všech tří let výzkumu. Kmeny rezistentní k ciprofloxacinu s vysokým stupněm chinolonové rezistence byly též rezistentní k ostatním antibiotikům, např. v r. 2008 k ampicilinu (64 %), tetracyklinu (39 %), streptomycinu (60 %), neomycinu (14 %), spectinomycinu (21 %), gentamycinu (14 %), cotrimoxazolu (39 %) a chloramfenikolu (7 %). Na druhé straně, kmeny *E. coli* byly citlivé k ampicilinu + sulbactamu, ceftiofuru, ceftriaxonu, ceftazidimu, ceftazidimu + klavulanové kyselině, apramycinu a florfenicolu. Nebyly stanoveny žádné ESBL pozitivní kmeny [39].

Oproti telatům (35% rezistence na enrofloxacin r. 2008) je rezistence na chinolonová antibiotika (ciprofloxacin a enrofloxacin) u brojlerů na Slovensku výrazná – její úroveň činila 80 %, resp. 50 % (kyselina nalidixová se používá jen jako indikátor). Tento výskyt chinolonové rezistence převyšuje i západoevropské státy. Z hlediska mechanismu rezistence se jedná o chromozomálně kódovanou rezistenci, která byla způsobena častým podáváním laciného enrofloxacinu, jenž způsobuje mutaci v *gyrA* a *parC* genu *Escherichia coli* [38].

4.8 Rezistence *Escherichia coli* u synantropního ptactva a její význam v potravním řetězci

Volně žijící ptáci mohou sloužit jako významné rezervoáry patogenních bakterií. V jejich střevním traktu se mohou tyto mikroorganismy množit a šířit se na člověka mnoha cestami. V tomto směru jsou významní především ptáci synantropní, využívající prostředí pozměněně člověkem. Obývají prostředí zemědělských farem, které jim poskytuje dostatek potravy i útočiště před nepříznivým počasím, ve městech v blízkosti lidských obydlí konzumují odpadky všeho druhu a lidé je často přikrmují. Z nejčastějších bakteriálních patogenů člo-

věka osídlujících trávicí trakt synantropních ptáků mají význam především salmonely, escherichie, kampylobaktery, listerie a chlamydie. Synantropní ptáci mohou být rovněž zdrojem parazitů a virových onemocnění, například ptačí chřipky [40].

Racci chechtaví představují velké riziko kontaminace povrchových zdrojů pitné vody, vodních ploch určených pro rekreační účely a vody a potravy zvířat na farmách. Byly vyšetřovány tři hnízdní populace racků chechtavých v intenzivně hospodářsky obdělávané krajině Moravy a Slezska. Téměř 30 % izolátů symbiotické *E. coli* vykazovalo rezistenci k antibiotikům a byly dokonce nalezeny i kmeny s rezistencí k pěti či více antibiotikům, což je číslo srovnatelné se situací v chovech hospodářských zvířat i v lidské populaci. Jako nejvyšší se ukázala rezistence k tetracyklinu a ampicilinu. Volně žijící zvířata nejsou pod selekčním tlakem antibiotik, původ rezistentních bakterií u racků musí být v lidské populaci a u zvířat zemědělských farem [40].

Ve vyšetřované zimní populaci havranů polních poblíž Brna byla prokázána přítomnost salmonel a ve 14 % vzorků trusu také *E. coli* rezistentní k antibiotikům. Jeden izolát vykazoval rezistenci dokonce k šesti antibiotikům zároveň. Nejčastější se – stejně jako u racků chechtavých – ukázala rezistence k tetracyklinu a ampicilinu. O původu rezistentních *E. coli* u havranů je možné pouze spekulovat. Odpověď by mohlo poskytnout zjištění, jak dlouho rezistentní bakterie ve střevě havrana přežívají. Zda po primární kolonizaci střeva po vylíhnutí přežívají rezistentní kmeny *E. coli* ve střevě týdny, měsíce, roky, nebo jsou v důsledku absence selekčního tlaku antibiotik v krátkém časovém období vytlačeny bakteriemi citlivými, které se nemusí vyrovnávat s biologickou zátěží danou přítomnými geny rezistence. Havrana polního je však nutné považovat za epidemiologicky významného potenciálního přenašeče jak patogenních bakterií, tak determinant genů antibiotické rezistence vázané na *E. coli* na dlouhé vzdálenosti v rámci celé Evropy [40].

Vrabec domácí i jiříčka obecná v ČR dnes hnízdí téměř výhradně ve vazbě na lidská obydlí a patří k nejhojnějším synantropním ptákům. Často je nalézáme především na farmách, vrabce jako semenožravého (granivorního) ptáka, jiříčku jako hmyzožravý (insektivorní) druh. Studie se soustředila na ptáky obývajících prostředí mléčných farem, kde se chovají dojnice, u nichž byla dokumentována intenzivní antibiotická terapie a prokázán četný výskyt rezistentních *E. coli* v trávicím traktu telat. Kontakt vrabců s dobyt看em, podestýlkou a krmivem na farmách byl bezprostřední, dalo se tedy předpokládat vysoké procento rezistentních bakterií. Přesto se semenožraví vrabci neprojeví jako významné rezervoáry rezis-

tence. U vrabců činila prevalence rezistentních kmenů *E. coli* 9 %, u mláďat hmyzožravých jiříček jen 5 %. Důvod nižší prevalence rezistentních *E. coli* může být ve zcela odlišné potravě v porovnání s racky a havrany příživujícími se na odpadcích často živočišného původu, popřípadě ve větší stabilitě běžné střevní mikroflóry vrabců a jiříček, která brání usídlení jiných bakterií zvenčí. Vrabcí i jiříčky jsou příležitostně kolonizováni rezistentními kmeny *E. coli*, ale v porovnání s racky a havrany nejsou za významné rezervoáry ani přenašeče rezistentních bakterií považováni [40].

Ferální (volně žijící, zdivočelý) holub domácí se vyskytuje velmi početně ve všech větších městech, za potravou vylétá každodenně do jejich okolí nebo je hojně přikrmován lidmi. Je považován za významný rezervoár infekčních nemocí, ale zjištěný výskyt rezistentních *E. coli* u tohoto synantropního ptáka byl velmi nízký, z vyšetřených druhů ptáků dokonce nejnižší (prevalence pouze 3 %), a je pravděpodobně odrazem odlišné ekologie tohoto druhu. Hlavní složkou potravy holubů je potrava rostlinná, která není kontaminovaná rezistentními bakteriemi. V zimě se často živí obilninami uskladněnými v silech, ale příživuje se i odpadky, které připadají v úvahu jako potenciální zdroj rezistentních bakterií a mohou tak vysvětlovat nízkou prevalenci rezistentních bakterií u zdivočelých domácích holubů [40].

4.9 Rezistence *Escherichia coli* izolovaných z chovů telat a drůbeže

Cílem studie byla analýza a srovnání rezistence druhů *Escherichia coli* a *Proteus mirabilis*, izolovaných z chovů telat a drůbeže, k vybraným antibiotikům. Testované bakteriální kmeny *Escherichia coli* a *Proteus mirabilis* byly izolovány ze dvou farem telat a pěti farem drůbeže v období let 2003-2005. Kmeny byly izolovány z rektálních a kloakálních výtěrů provedenými odběrovou soupravou Transystem Amies (tampóny „transbac“). Tampóny byly vyočkovány na pevné půdy (krevní agar, Endovu půdu a XLD agar), které byly inkubovány 24 hodin při 37 °C [41].

K identifikaci uvedených bakteriálních druhů byly použity standardní mikrobiologické postupy. Výběr kmenů byl realizován tak, že od jednoho telete nebo slepice byl zařazen vždy jen jeden kmen daného druhu. Citlivost k antibiotikům byla stanovena standardní diluční mikrometodou. Referenční kmeny *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218 a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sloužily ke kontrole kvality. Hodnoty MIC₅₀ a MIC₉₀ byly vypočteny jako 50%, resp. 90% percentil hodnot minimálních inhibičních koncentrací příslušných antibiotik [41].

Z chovů drůbeže bylo izolováno 239 kmenů *Escherichia coli* a 127 kmenů *Proteus mirabilis*. Tabulka 5. uvádí výsledky stanovení rezistence k testovaným antimikrobiálním přípravkům [41].

Tabulka 3. Rezistence izolátů *Escherichia coli* a *Proteus mirabilis* z chovů drůbeže k antibiotikům [41]

Antibiotikum	<i>Escherichia coli</i> (n=239)				<i>Proteus mirabilis</i> (n=127)			
	Rozmezí MIC (mg/l)	MIC ₅₀ (mg/l)	MIC ₉₀ (mg/l)	% rezistence	Rozmezí MIC (mg/l)	MIC ₅₀ (mg/l)	MIC ₉₀ (mg/l)	% rezistence
amikacin	0,125-64	1	4	1	0,5-16	1	4	2
ampicilin	0,5-128	2	128	29	0,25-128	1	4	9
ampicilin/sulbactam	0,125-8	1	4	0	0,125-4	0,5	2	0
cefazolin	0,5-64	2	4	4	1-128	2	8	7
cefotaxim	0,06-0,5	0,03	0,125	0	0,03-1	0,03	0,125	0
ceftazidim	0,03-0,5	0,03	0,125	0	0,03-0,5	0,03	0,125	0
cefuroxim	0,25-32	0,25	2	1	0,25-4	0,25	1	0
ciprofloxacin	0,03-8	0,03	0,25	3	0,03-8	0,06	2	19
chloramfenikol	0,25-128	1	4	4	0,5-128	1	4	17
gentamicin	0,125-32	0,5	2	2	0,125-128	0,5	4	13
kolistin	0,06-2	0,25	1	0	≥64	-	-	100*
kotrimoxazol	0,5-512	8	128	10	0,5-512	8	64	28
kys. oxolinová	0,125-64	1	4	5	0,25-128	2	16	19
meropenem	0,03-2	0,125	0,5	0	0,06-0,5	0,06	0,25	0
nitrofurantoin	0,5-32	2	8	0	≥64	-	-	100*
ofloxacin	0,03-16	0,06	1	3	0,03-32	0,5	4	19
tetracyklin	0,25-128	2	64	48	≥64	-	-	100*

Legenda: n = počet vyšetřených kmenů, * přirozená rezistence, - hodnoty nestanoveny

Z výsledků vyplývá vyšší četnost rezistentních kmenů *Escherichia coli* k ampicilinu (29 %), tetracyklinu (48 %) a u *Proteus mirabilis* ke kotrimoxazolu (28 %). Překvapujícím výsledkem byl zdokumentovaný výskyt fluorochinolonrezistentních kmenů u obou species. V případě *Proteus mirabilis* byla rezistence k ofloxacinu a ciprofloxacinu prokázána u 24 kmenů, přičemž 20 pocházelo ze stejného chovu [41].

Z chovů telat bylo izolováno 247 kmenů *Escherichia coli* a 57 kmenů *Proteus mirabilis*. Rezistence k antibiotikům u obou species je uvedena v tabulce 6. Z výsledků vyplývá relativně dobrá citlivost kmenů *Escherichia coli*. Vyšší četnost rezistentních izolátů byla prokázána pouze v případě tetracyklinu (68 %) a ampicilinu (48 %). Rovněž kmeny *Proteus mirabilis* vykazovaly nízkou úroveň rezistence, s výjimkou ampicilinu a cefazolinu, kde četnost rezistentních izolátů přesáhla 50 % [41].

Tabulka 4. Rezistence izolátů *Escherichia coli* a *Proteus mirabilis* z chovů telat k antibiotikům [41]

Antibiotikum	<i>Escherichia coli</i> (n=247)				<i>Proteus mirabilis</i> (n=57)			
	Rozmezí MIC (mg/l)	MIC ₅₀ (mg/l)	MIC ₉₀ (mg/l)	% rezistence	Rozmezí MIC (mg/l)	MIC ₅₀ (mg/l)	MIC ₉₀ (mg/l)	% rezistence
amikacin	0,25-8	0,5	4	0	0,5-8	1	4	0
ampicilin	0,5-128	4	64	48	0,5-256	8	64	57
ampicilin/sulbactam	0,25-64	1	4	2	0,5-128	1	4	7
cefazolin	0,25-128	2	4	5	1-128	8	64	55
cefotaxim	0,03-0,5	0,06	0,125	0	0,03-0,25	0,06	0,125	0
ceftazidim	0,03-0,5	0,06	0,125	0	0,03-0,25	0,06	0,125	0
cefuroxim	0,25-64	1	4	3	0,5-64	1	4	9
ciprofloxacin	0,001-0,5	0,06	0,125	0	0,001-0,125	0,03	0,06	0
chloramfenikol	0,5-32	1	4	3	1-64	2	8	12
gentamicin	0,06-1	0,125	0,5	0	0,125-1	0,25	0,5	0
kolistin	0,125-1	0,25	0,5	0	≥64	-	-	100*
kotrimoxazol	0,25-128	1	8	11	0,125-256	0,25	1	9
kys. oxolinová	0,5-8	1	4	0	1-8	2	4	0
meropenem	0,03-0,5	0,06	0,125	0	0,001-0,125	0,03	0,06	0
nitrofurantoin	0,25-16	2	4	0	≥64	-	-	100*
ofloxacin	0,03-0,5	0,125	0,25	0	0,03-0,5	0,125	0,25	0
tetracyklin	1-128	8	32	68	≥64	-	-	100*

Legenda: n = počet vyšetřených kmenů, * přirozená rezistence, - hodnoty nestanoveny

Z uvedených výsledků je patrné, že v drůbežích chovech se v podmínkách ČR vyskytují multirezistentní kmeny *Escherichia coli* a *Proteus mirabilis* s rezistencí k fluorochinolonom. Izolace 20 (83 %) ofloxacin- a ciprofloxacinrezistentních kmenů *Proteus mirabilis* z jednoho chovu naznačuje možnost klonálního, horizontálního šíření v němž se může negativně projevat selekční tlak použitých antimikrobních přípravků [41].

Výsledky dále prokázaly relativně dobrou situaci v rezistenci k antibiotikům v chovech telat. Vyšší četnost rezistentních izolátů *Escherichia coli* a *Proteus mirabilis* byla prokázána pouze v případě „základních“ antibiotik (ampicilinu a cefazolinu). Rezistence k tetracyklinu u *Escherichia coli* dosáhla hodnoty 68 %. Velmi příznivou skutečností je absence rezistence k fluorochinolonom v porovnání s drůbežími chovy [41].

Antibiotická rezistence u bakteriálních kmenů izolovaných od telat je nižší než rezistence obdobných kmenů u drůbeže. Tato skutečnost může souviset, mimo jiné, i se způsobem použití a spektrem aplikovaných antibiotik na farmách drůbeže a skotu. Zatímco u drůbeže jsou antibiotika aplikována plošně (perorálně), včetně tzv. profylaktických aplikací (řada

zvířat obdrží subterapeutické dávky antibiotik), v chovech skotu převládá spíše individuální (parenterální) terapeutická aplikace daných antibiotik [41].

4.10 Incidence multirezistentních izolátů *Escherichia coli* ze syrového mléka, masa a masných výrobků

Používání antimikrobiálních látek k prevenci onemocnění a k terapii zvířat, například čteně k léčbě zánětu mléčné žlázy, se může odrážet v selekci rezistentních populací i nepatogenních mikroorganismů, které jako nesledovaná *noxa* (příčina onemocnění) unikají pozornosti. Tímto způsobem nebezpečné kmeny indikátorové bakterie *E. coli*, které za určitých podmínek kontaminují syrové mléko, maso a potraviny vyrobené z nich, mohou být nositelem i několika genů rezistence k antimikrobiálním látkám. Proto bylo sledování rezistence u tohoto mikroorganismu zahrnuto do Metodického návodu Státní veterinární správy ČR (SVS, 2005) a je především zahrnuto do evropského programu monitorování rezistence izolátů *E. coli* z potravin a zvířat (Directive, 1992) [42].

V letech 2000-2006 bylo ze vzorků syrového mléka, mléčných výrobků a z prostředí zpracovatelských závodů, dále ze syrového masa, masných výrobků a z kontaktních povrchů masných závodů (2389 vzorků) izolováno 1378 izolátů. Četněji byly kontaminovány vzorky komodity masa (40,87 %, 21,21 % a 39,51 % vzorků) a 23,71 % vzorků potravin vyrobených z mléka [42].

Rezistence k 16 antimikrobiálním látkám byla vyšetřena standardní mikrodiluční metodou (NCCLS, 2002) a u 10 vybraných multirezistentních izolátů byla konfirmována průkazem genů rezistence, a to *blaPSE*, *blaTEM*, *strA*, *strB*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetG*, *cat*, *sul1*, *sul2*, *aadA1*, *aadA2*, *floR*, které se vyskytují rovněž u zdravotně závažných patogenních bakterií, a to u pentarezistentních izolátů rodu *Salmonella*. Prokazována byla přítomnost genu pro integrasu *int1*, jako indikátoru možného přenosu rezistence [42].

Žádný z izolátů neprodukoval širokospektrální *laktamasy* ESBL. Celkem 1025 izolátů bylo rezistentních nejméně k jedné látce, a to nejčteněji k cefalotinu (47,61 % izolátů). Multirezistentní kmeny (celkem 382 mR (multirezistentních) izolátů, tj. 27,72 % všech izolátů), rezistentní k ampicilinu, cefalotinu, kotrimoxazolu, streptomycinu a tetracyklinu, byly izolovány nejčteněji ze syrového mléka (39,53 % mR izolátů) a mléčných potravin (32,98 % mR izolátů). Po přepočtu na celkový počet izolátů, nejvíce mR izolátů pocházelo ze stěrů v

masných závodech (33,93 % izolátů), dále ze syrového mléka (30,75 %) a na třetím místě ze zařízení mlékárny (28,57 % izolátů) [42].

U všech vybraných multirezistentních izolátů byly detekovány příslušné geny rezistence, čteně byly detekovány geny *bla*TEM, *strA*, *strB*, *tetA*, *cat* a *sul2*. Na základě použitých primerů byl integron třídy 1 s geny rezistence *bla*TEM, *strA*, *strB*, *tetA*, *cat*, *sul1*, *sul2*, *aadA1* detekován u jednoho multirezistentního izolátu ze syrového mléka [42].

Z výsledků vyplývá, že potraviny živočišného původu byly nositelem genů rezistence k antimikrobiálním látkám prostřednictvím indikátorové bakterie *Escherichia coli*, a to i přesto, že byly zahrnuty v technologii výroby potravin kroky, které za kontrolovaných podmínek tento mikroorganismus z potravního řetězce eliminují. Jedním ze zdrojů kontaminace finálních výrobků multirezistentními kmeny mohly být bakterie přežívající na zařízení výrobních závodů, pravděpodobně v biofilmech a to i po provedené sanitaci [42].

4.11 Rezistence *Escherichia coli* na antibiotika – diskové metody stanovení citlivosti

V rámci výzkumu přehledu rezistence bakterií na antibiotika (jenž byl proveden v roce 2005 mikrobiologickou laboratoří nemocnice Cheb, spol. s r. o.) byla mimo jiné zkoumána rezistence 823 kmenů *Escherichia coli* u močových infekcí na jednotlivá antibiotika, včetně fluorochinolonů, a rezistence 1372 kmenů *Escherichia coli* bez rozlišení druhu zkoumaného materiálu [43].

Citlivost na antibiotika byla vyšetřována dvěma metodami: 1) diskovou metodou – kvalitativní vyšetření, 2) metodou MIC – kvantitativní vyšetření, které stanovuje nejen, zda je kmen k určitému antibiotiku citlivý nebo rezistentní, ale též stanovuje hladinu antibiotika v mg/ml, která je účinná – kvantitativní hodnocení [43].

V zásadě všechny klinicky významné kmeny byly testovány diskovou kvalitativní metodou a kmeny rezistentní následně metodou MIC. Nálezy u klinicky závažných infekcí se vždy testují metodou MIC, eventuálně na přání lékaře [43].

Uvedené přehledy jsou postaveny na diskové metodě z důvodu větší výpovědní hodnoty statistických čísel při větším počtu kmenů. U metody MIC je zastoupení jednotlivých bakteriálních druhů výrazně menší, což by znamenalo zatížení chybou malých čísel [43].

Tabulka 5. Rezistence kmenů *Escherichia coli* u močových infekcí – kvalitativní diskové metody stanovení citlivosti (823 kmenů) [43]

Antibiotikum	Citlivé - %	Rezistentní - %
Ampicilin	59,1 (475 kmenů)	40,9
Unasyn	64,1 (518 kmenů)	35,9
Cefazolin	93,5 (751 kmenů)	6,5
Kotrimoxazol	74,2 (597 kmenů)	25,8
Ofloxacin	89,3 (717 kmenů)	10,7
Furantoin	93,9 (752 kmenů)	6,1
Gentamicin	85,7 (cca 700 kmenů)	14,3

Tabulka 6. Rezistence kmenů *Escherichia coli* bez rozlišení druhu zkoumaného materiálu – kvalitativní diskové metody stanovení citlivosti (1372 kmenů) [43]

Antibiotikum	Citlivé - %	Rezistentní - %
Ampicilin	60,7	39,3
Cefazolin	94,4	5,6
Unasyn	69,0	31,0
Chloramphenikol	92,8	7,2
Tetracyklin	77,7	22,3
Kotrimoxazol	77,8	22,2
Ofloxacin	93,6	6,4
Gentamicin	96,8	3,2

Z velkých statistických souborů lze dělat prognózy vývoje rezistence bakterií vůči antibiotikům do budoucna, což umožní dávat podklady a doporučení k léčbě a též varování při strmém růstu rezistence k některým antibiotikům. Růst rezistence je vždy zásadně ovlivněn vysokým selekčním tlakem [43].

V České republice došlo v rámci Evropy k nejvyššímu nárůstu spotřeby fluorochinolonů, jehož důsledkem je i nejrychlejší nárůst rezistence na tato antibiotika. Nálezy bakteriální rezistence provedené studie potvrzují tento trend, který pravděpodobně vyplývá z dobrých farmakokinetických vlastností a výhodné ceny fluorochinolonových antibiotik. Je třeba upozornit, že pokud nebude sníženo používání této skupiny antibiotik, dojde velmi rychle k jejich vyřazení z použitelnosti z důvodu vysokého stupně rezistence a tudíž v budoucnu k nízké spolehlivosti pro empirickou léčbu. Rezistence roste u gramnegativních tyčinek z čeledi *Enterobacteriaceae* (zahrnuje *Escherichia coli*), dále významně u *Pseudomonas sp.* (ciprofloxacin – 43,6 % rezistentních kmenů v případě močových infekcí) a *Enterococcus faecalis* (ciprofloxacin – 57,7 % rezistentních kmenů u močových infekcí) [43].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRAKTICKÉ PRÁCE

Cílem práce je za pomoci diskové difuzní metody laboratorně stanovit antibiotickou rezistenci 18-ti vyšetřovaných kmenů *Escherichia coli* izolovaných z výtěrů bažantů z volné přírody i farmového chovu na Moravě v období let 2010 – 2011. Výsledky stanovení měly být konfrontovány se současným stavem antibiotické rezistence v České republice a ve světě podle dostupných literárních údajů.

5.1 Pracovní materiál a pomůcky

Pracovní pomůcky a přístroje:

Kahan, očkovací kličky, sterilisátor kliček (sklářny Kavalier, a. s.), pipeta 1000 μ l (Intech), pipeta 1-5 ml (Intech), Petriho misky, pipetovací špičky (Eppendorf Phusio Care concept), zákaloměr (Densi-La-metr), umělohmotné sterilní zkumavky pro Densi-La-metr o objemu 10 ml (sterilní, šarže 904711, číslo mat. 50003692, datum expirace 30.4.2012), třepačka (Heidolph Reax top, IM 010000042330), sterilní vatové tampóny, antibiotické disky (viz použitá antibiotika), termostat 37 °C, posuvné měřítko.

Připravené kultivační půdy:

MHA, Mueller Hinton Agar, číslo šarže M173-500G, výrobce HiMedia Laboratories, Pvt. Ltd., Mumbai 400 086, Indie

složení: hovězí masová infuze 300 g/l, kyselý hydrolyzát kaseinu 17,5 g/l, škrob 1,5 g/l, agar 17 g/l, složení přípravku odpovídá požadavkům normy ČSN EN ISO 10272-1

použití: pro stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobním látkám difusní diskovou metodou

příprava: 15,2 g přípravku bylo rozpuštěno ve 400 ml destilované vody, bylo sterilizováno v autoklávu při 121 °C 15 až 20 minut, konečné pH (při 25 °C) 7,3 \pm 0,2

PCA, Plate Count Agar, číslo šarže 64 475, výrobce Bio-Rad, 3, boulevard Raymond-Poincaré, 92 430 Marnes-La-Coquette, Francie

použití: pro kultivaci mikroorganismů

příprava: 8,2 g přípravku bylo rozpuštěno ve 400 ml destilované vody, bylo sterilizováno v autoklávu při 121 °C 15 až 20 minut, konečné pH (při 25 °C) 7,0 \pm 0,2

Použitá antibiotika:

Amoxicilin – klavulanová kyselina 2:1, AMC 30, 30 µg, výrobce Oxoid Ltd., Besingstoke, Hampshire, Anglie

Ampicilin, A 10, 10 µg, výrobce HiMedia Laboratories, Pvt. Ltd., Mumbai 400 086, Indie

Cefalotin, KF 30, 30 µg, výrobce Oxoid Ltd., Besingstoke, Hampshire, Anglie

Ciprofloxacin, CIP 5, 5 µg, výrobce Oxoid Ltd., Besingstoke, Hampshire, Anglie

Colistin sulfát, CT 10, 10 µg, výrobce Oxoid Ltd., Besingstoke, Hampshire, Anglie

Gentamicin, CN 10, 10 µg, výrobce Oxoid Ltd., Besingstoke, Hampshire, Anglie

Chloramfenikol, C 30, 30 µg, výrobce Oxoid Ltd., Besingstoke, Hampshire, Anglie

Neomycin, N 30, 30 µg, výrobce HiMedia Laboratories, Pvt. Ltd., Mumbai 400 086, Indie

Piperacilin – tazobactam 10:1, TZP 110, 110 µg, výrobce Oxoid Ltd., Besingstoke, Hampshire, Anglie

Streptomycin, S 10, 10 µg, výrobce HiMedia Laboratories, Pvt. Ltd., Mumbai 400 086, Indie

Sulbactam – cefoperazon, SCF 105, 105 µg, výrobce Oxoid Ltd., Besingstoke, Hampshire, Anglie

Sulfamethoxazol – trimetoprim, SXT 25, 25 µg, výrobce Oxoid Ltd., Besingstoke, Hampshire, Anglie

Tetracyklin, T 10, 10 µg, výrobce HiMedia Laboratories, Pvt. Ltd., Mumbai 400 086, Indie

5.2 Metodika praktické práce

Vyšetřované kmeny *Escherichia coli* (18 kmenů) byly získány z výtěru bažantů pocházejících z volné přírody i z farmového chovu na Moravě v České republice.

Dané kmeny byly naočkovány na ENDO agar, na němž vytvořily tmavě fialové kolonie se sklovitým leskem. Kmeny byly přeočkovány na PCA půdy. Do zkumavek označených číslem příslušných kmenů byly napipetovány 3 ml fyziologického roztoku, po 16hodinové kultivaci byly vyžíhanou očkovací kličkou odebrány z každého kmene 1-3 čerstvé kolonie a rozetřeny a dobře promíchány ve fyziologickém roztoku. Výsledný zákal byl měřen zákaloměrem (Densi-La-metr). Koncentrace inokula každého kmene byla upravena tak, aby výsledný zákal odpovídal vždy 0,5 stupně zákalu dle MacFarladova standardu [44].

Připravené inokulum z každého kmene bylo do 15 minut po přípravě očkováno roztěrem sterilními vatovými tampóny po celé ploše připraveného MHA agaru. Na Petriho misky byly do 15 minut po naočkování inokulem umístěny pomocí sterilní injekční jehly příslušné antibiotické disky. Disky se k plotně jemně přitiskly, aby celá plocha disku byla v kontaktu s povrchem půdy (antibiotikum ihned difundovalo do agaru). Plotny se umístily do termostatu, v němž byly inkubovány při cca 36,5 °C 16 hodin [44].

Pomocí diskové difuzní metody byla stanovena citlivost či rezistence jednotlivých kmenů *E. coli* ke zvoleným antibiotickým látkám. Disková difuzní metoda představuje metodu stanovení citlivosti nebo rezistence bakterií k antimikrobiálním látkám *in vitro* podle toho, zda vyšetřovaná bakterie (*E. coli*) ve stanovené koncentraci buněk na agarové půdě tvoří nebo netvoří přípustnou zónu inhibice růstu kolem disku s určitou koncentrací daného antibiotika po předepsané době inkubace. Průměr zóny inhibice se u jednotlivých antibiotik liší v závislosti na rychlosti jejich difuze z disku a je v obráceném poměru k jejich minimální inhibiční koncentraci (MIC) [44].

Po inkubaci *E. coli* na MHA půdách byly posuvným měřítkem změřeny průměry inhibičních zón (v mm). Byly vyhodnoceny citlivé (C), intermediární (I) a rezistentní (R) kmeny *E. coli* podle metodiky organizace EUCAST (Evropského výboru pro testování antimikrobiální citlivosti, European Committee on antimicrobial susceptibility testing), která stanoví průměry inhibičních zón pro kategorii citlivých, intermediárních a rezistentních kmenů příslušných mikroorganismů [44].

Diskovou difuzní metodou bylo vyšetřováno, zda kmeny *E. coli* tvořily na MHA půdě přípustnou zónu inhibice růstu. Průměr inhibičních zón byl v procházející světlo měřen na vnější straně Petriho misky za pomoci posuvného měřítka od okrajů zón se zřetelnou inhibicí růstu. Byla odečtena vzálenost mezi nimi a dle přiložené metodiky EUCAST vyhodnocena citlivost či rezistence příslušných kmenů k danému antibiotiku [44].

Tabulka 7. Hraniční průměry inhibičních zón na vybraná antibiotika pro kmeny *E. coli* (dle metodiky EUCAST) [44]

Antibiotikum	obsah disku v μg	průměr inhibiční zóny v mm pro kategorii		
		citlivý \geq	intermediární	rezistentní \leq
Amoxicilin - klavulanová kyselina 2:1	30	18	14-17	13
Ampicilin	10	17	14-16	13
Cefalotin	30	18	15-17	14
Cefoperazon - sulbactam	105	21	16-20	15
Ciprofloxacin	5	21	16-20	15
Colistin sulfát	10	10	-	9
Gentamicin	10	15	13-14	12
Chloramfenikol	30	18	13-17	12
Neomycin	30	17	13-16	12
Piperacilin - tazobactam 10:1	110	18	16-17	15
Streptomycin	10	15	12-14	11
Sulfamethoxazol - trimetoprim	25	16	11-15	10
Tetracyklin	10	19	15-18	14

5.3 Výsledky výzkumu

Na základě změřených průměrů inhibičních zón byla vyhodnocena citlivost všech 18 vyšetřovaných kmenů *E. coli* k vybraným antibiotikům.

Tabulka 8. Naměřené zóny a hodnocení rezistence pro kmeny *E. coli* č. 1 až 18

Antibiotikum	obsah disku v μg	naměřené zóny v mm, hodnocení kmenů				
		kmen č. 1	kmen č. 2	kmen č. 3	kmen č. 4	kmen č. 5
Amoxicilin - klavulánová kyselina 2:1	30	20 C	20 C	20 C	24 C	19 C
Ampicilin	10	16 I	12 R	15 I	12/15 R/I	6 R
Cefalotin	30	12 R	9 R	15 I	15 I	9 R
Cefoperazon - sulbactam	105	27 C	27 C	26 C	28 C	26 C
Ciprofloxacin	5	30 C	29 C	30 C	31 C	30 C
Colistin sulfát	10	11 C	12 C	11 C	12 C	10 C
Gentamicin	10	21 C	21 C	16 C	23 C	20 C
Chloramfenikol	30	26 C	27 C	26 C	29 C	25 C
Neomycin	30	18 C	20 C	15 I	20 C	17/18 C
Piperacilin - tazobactam 10:1	110	25 C	24 C	25 C	25 C	24 C
Streptomycin	10	22 C	21/23 C	19 C	16 C	20 C
Sulfamethoxazol - trimetoprim	25	25 C	23 C	24 C	27 C	26 C
Tetracyklin	10	18 I	18 I	22 C	8 R	22 C

Legenda:

C = citlivý kmen

I = intermediární kmen

R = rezistentní kmen

Antibiotikum	obsah disku v μg	naměřené zóny v mm, hodnocení kmenů				
		kmen č. 6	kmen č. 7	kmen č. 8	kmen č. 9	kmen č. 10
Amoxicilin - klavulá-nová kyselina 2:1	30	22 C	19 C	21 C	18 C	20 C
Ampicilin	10	13 R	6 R	9/11 R	7 R	14 I
Cefalotin	30	11 R	6 R	11 R	10 R	14 R
Cefoperazon - sulbactam	105	25 C	25 C	25 C	22 C	24 C
Ciprofloxacin	5	30 C	30 C	30 C	25 C	30 C
Colistin sulfát	10	11 C	15 C	12 C	11 C	11 C
Gentamicin	10	20/24 C	18 C	22 C	21 C	20 C
Chloramfenikol	30	26 C	24 C	27 C	9 R	25 C
Neomycin	30	16 I	20 C	20 C	14 I	18 C
Piperacilin - tazobactam 10:1	110	25 C	22 C	22/24 C	20 C	23 C
Streptomycin	10	14 I	20 C	20/24 C	12 I	20 C
Sulfamethoxazol - trimetoprim	25	22 C	22 C	20/23 C	7 R	24 C
Tetracyklin	10	19 C	6 R	19 C	7 R	19 C

Legenda:

C = citlivý kmen

I = intermediární kmen

R = rezistentní kmen

Antibiotikum	obsah disku v μg	naměřené zóny v mm, hodnocení kmenů				
		kmen č. 11	kmen č. 12	kmen č. 13	kmen č. 14	kmen č. 15
Amoxicilin - klavulá-nová kyselina 2:1	30	20 C	20 C	19 C	21 C	16 I
Ampicilin	10	11/13 R	15 I	9 R	9/13 R	6 R
Cefalotin	30	10 R	11 R	9 R	7/13 R	10/12 R
Cefoperazon - sulbactam	105	25 C	24 C	24 C	27 C	22 C
Ciprofloxacin	5	30 C	32 C	30 C	30 C	29 C
Colistin sulfát	10	12 C	11 C	12 C	11 C	11 C
Gentamicin	10	21 C	21 C	20 C	25 C	18 C
Chloramfenikol	30	26 C	24 C	23 C	21 C	25 C
Neomycin	30	18 C	19 C	15 I	19 C	17 C
Piperacilin - tazobactam 10:1	110	24 C	23 C	24 C	24 C	23 C
Streptomycin	10	21 C	15 C	17 C	20/23 C	18 C
Sulfamethoxazol - trimetoprim	25	21/24 C	26 C	24 C	24 C	20 C
Tetracyklin	10	19 C	7 R	18 I	18 I	22 C

Legenda:

C = citlivý kmen

I = intermediární kmen

R = rezistentní kmen

Antibiotikum	obsah disku v µg	naměřené zóny v mm, hodnocení kmenů		
		kmen č. 16	kmen č. 17	kmen č. 18
Amoxicilin - klavulá- nová kyselina 2:1	30	22 C	19 C	21 C
Ampicilin	10	12 R	6/15 R/I	16 I
Cefalotin	30	10 R	6/10 R	13 R
Cefoperazon - sulbactam	105	28 C	24 C	26 C
Ciprofloxacin	5	31 C	32 C	30 C
Colistin sulfát	10	11 C	10 C	11 C
Gentamicin	10	24 C	19 C	17 C
Chloramfenikol	30	25 C	24 C	22 C
Neomycin	30	20 C	17 C	17 C
Piperacilin - tazobactam 10:1	110	24 C	23 C	24 C
Streptomycin	10	20/23 C	18 C	20 C
Sulfamethoxazol - trimetoprim	25	25 C	22 C	23 C
Tetracyklin	10	19 C	25 C	18 I

Legenda:

C = citlivý kmen

I = intermediární kmen

R = rezistentní kmen

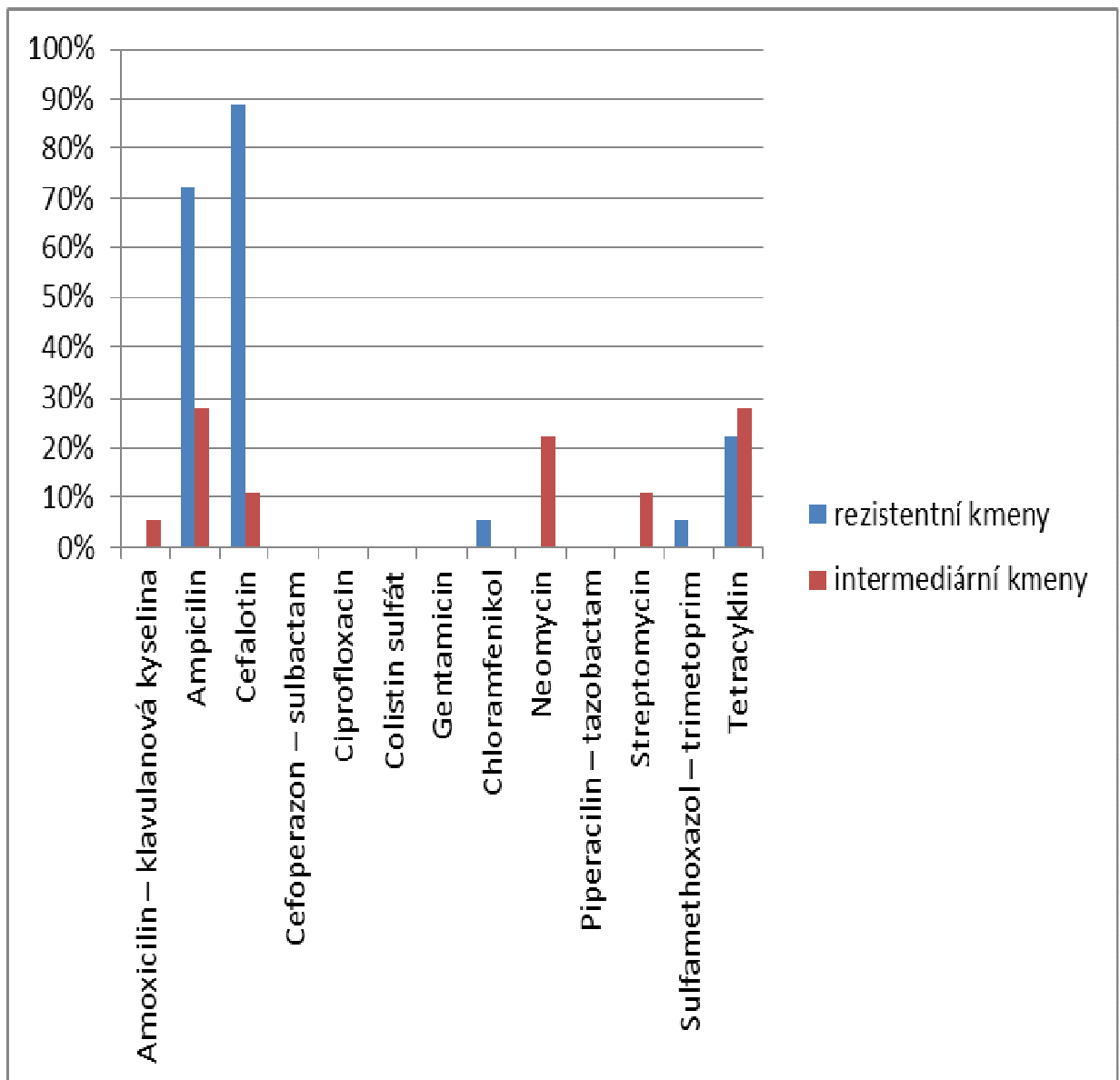
6 DISKUSE

Na Ústavu technologie a mikrobiologie potravin Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně bylo v letech 2010 - 2011 provedeno laboratorní stanovení antibiotické rezistence 18 vyšetřovaných kmenů *Escherichia coli* pocházejících z výtěru bažantů z volné přírody i farmového chovu na Moravě.

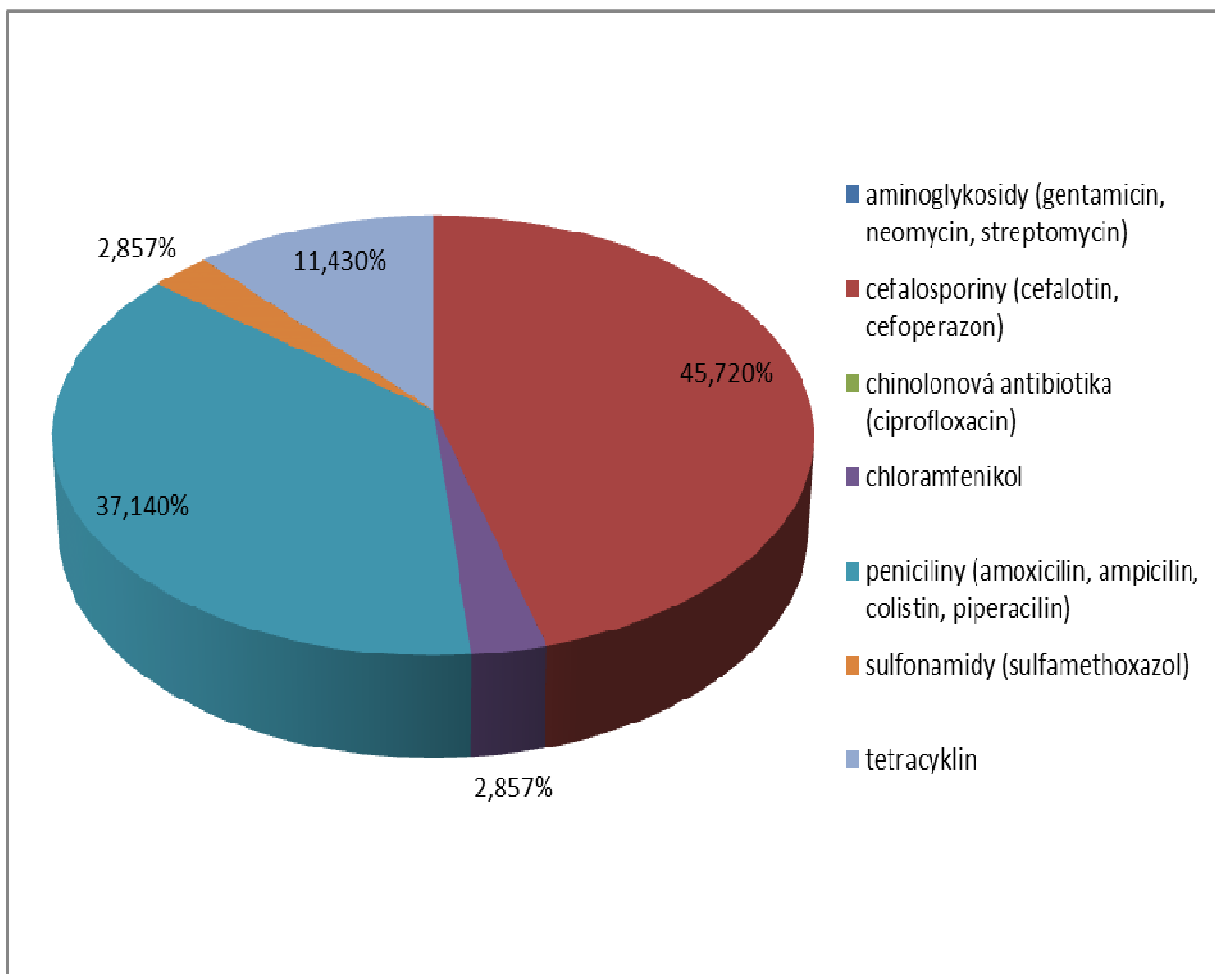
Studie poskytla následující výsledky: z 18 vyšetřovaných kmenů *E. coli* bylo k ampicilinu 13 kmenů rezistentních (72,22 %), zbylých 5 kmenů *E. coli* bylo vůči ampicilinu intermediárních. K cefalotinu vykazovalo rezistenci 16 vyšetřovaných kmenů (88,89 %), ostatní dva kmeny (č. 3 a 4) byly intermediární. U kmene *E. coli* č. 9 byla stanovena rezistence k chloramfenikolu i sulfomethoxazol-trimetoprimu (5,556 %), všechny ostatní kmeny byly na tato antibiotika citlivá. Na amoxicilin-klavulanovou kyselinu byl nalezen jediný intermediární kmen (č. 15), všechny další kmeny byly shledány jako citlivé. V případě antibiotik neomycinu a streptomycinu byly 4, resp. 2 kmeny určeny jako intermediární, všechny ostatní kmeny byly stanoveny jako citlivé. U cefoperazonu-sulbactamu, ciprofloxacinu, colistinu, gentamicinu a piperacilin-tazobactamu byly shledány pouze citlivé kmeny. Na tetracyklin byly stanoveny 4 rezistentní kmeny (22,22 %), 5 kmenů bylo intermediárních a 9 citlivých.

Výzkum potvrdil závažnost vzrůstající rezistence bakteriálních kmenů *Escherichia coli* k ampicilinu (72,22 %) a cefalotinu (88,89 %). Studie také dokázala nezanedbatelnou rezistenci k tetracyklinu (22,22 %). V případě jednoho bakteriálního kmene *E. coli* byla shledána rezistence k chloramfenikolu a současně sulfomethoxazol-trimetoprimu (5,556 %), zatímco ostatní kmeny byly na tato antibiotika citlivá. Na antibiotika cefoperazon-sulbactam, ciprofloxacin, colistin, gentamicin a piperacilin-tazobactam nebyly stanoveny žádné rezistentní ani intermediární kmeny *E. coli*.

Obrázek 3. Vyhodnocení zastoupení rezistentních a intermediárních kmenů *Escherichia coli* na jednotlivá vybraná antibiotika



Obrázek 4. Vyhodnocení podílu rezistentních kmenů *Escherichia coli* podle skupin zvolených antibiotik



Studie dokázala, že i u volně žijících a farmově chovaných zvířat (bažantů) se vyskytují rezistentní kmeny *Escherichia coli*. Lze předpokládat, že přítomnost těchto kmenů je dána celosvětově stoupající rezistencí bakterií k antimikrobním léčivům. Tyto rezistentní bakterie se potravou dostávají do trávicího ústrojí zvířat, kde se pomnoží a mohou následně trusem kontaminovat povrchové zdroje pitné vody, popřípadě infikovat člověka. Je pravděpodobné, že podobný důvod přítomnosti rezistentních kmenů *E. coli* lze vysledovat i u vyšetřovaných bažantů.

Příčinu stávající situace je nutné hledat zvláště u člověka, který často neuváženým podáváním antibiotik neblaze ovlivňuje nejen svoji populaci a populace domácích hospodářských zvířat, ale i populace zvířat volně žijících. Epidemiologický význam synantropních ptáků spočívá zejména v nebezpečí kontaminace prostředí, například povrchových zdrojů pitné vody, vodních ploch používaných pro rekreaci nebo zavlažování ovoce a zeleniny, vody a

potraviny zvířat na farmách. Ptáci však mohou být primárně kolonizováni i patogenními bakteriemi, jejichž zdroji byli nemocní lidé nebo nemocná domácí zvířata. Synantropní volně žijící ptáci se tak stávají významným rezervoárem a vektorem (přenašečem) rezistentních bakterií [40].

Nedávno byl dokonce doložen případ přenosu salmonel z racka chechtavého na člověka prostřednictvím kontaminace povrchových zdrojů pitné vody [40]. Je otázkou, zda šíření nebezpečných mikroorganismů do lidské populace, včetně patogenních kmenů *E. coli*, navíc doplněné vysokou mírou antibiotické rezistence těchto mikrobů, nehrozí i u volně žijícího ptactva, jako jsou právě bažanti. Jistá míra rizika zde bezpochyby je a neměla by být podceňována.

V České republice je situace antibiotické rezistence poměrně vážná: např. mezi roky 2001 až 2005 došlo v naší zemi k dvojnásobnému vzestupu antibiotické rezistence *E. coli* k fluorochinolonům, rezistence *E. coli* k ciprofloxacinu vzrostla z 8 % na více než 20 % a růstový trend nadále pokračuje [10]. V případě antibiotik ciprofloxacinu, ale také cefoperazonu, colistinu, gentamicinu a piperacilin-tazobactamu laboratorní výzkum neprokázal žádné rezistentní ani intermediární kmeny, to však nijak nesnižuje závažnost vzniklé situace.

Výsledky vyšetření kmenů *Escherichia coli* jsou do určité míry v souladu s výzkumem fluorochinolon-rezistentních kmenů *E. coli* prováděným v letech 2003 – 2005 v pěti chovech drůbeže a ve dvou farmách telat na střední Moravě. Celkem bylo z chovů drůbeže izolováno 239 kmenů *E. coli*, přičemž četnost fluorochinolon-rezistentních kmenů (rezistentních na ciprofloxacin a ofloxacin) dosáhla hodnoty 3 %, četnost kmenů rezistentních vůči tetracyklinu 48 % a k ampicilinu 29 % [41] [45]. Srovnáme-li dané výsledky s provedeným laboratorním vyšetřením, můžeme konstatovat relativní shodu v případě ciprofloxacinu (žádný rezistentní kmen) a tetracyklinu (22,22 % rezistentních kmenů). V případě ampicilinu byla naopak stanovena mnohem vyšší rezistence (72,22 %).

Výsledky výzkumu u ampicilinu také částečně korespondují s jinou dřívější studií, která analyzovala výskyt bakteriálních kmenů rezistentních na antibiotika u drůbeže v České republice v letech 1999 až 2000. 51 % kmenů *Escherichia coli* bylo rezistentních k ampicilinu, 31 % k piperacilinu a dokonce 97 % k tetracyklinu. U 10 % vyšetřovaných kmenů byla tehdy rovněž shledána vzrůstající rezistence na ciprofloxacin a ofloxacin [46].

Zajímavé výsledky ke srovnání poskytla i studie provedená na Slovensku, která v letech 2006 až 2008 zkoumala dynamiku mikrobiální rezistence na chinolonová antibiotika (kyselina nalidixovou, ciprofloxacin a enrofloxacin) komenzální *Escherichia coli* izolované od zdravých brojlerů z různých farem. Izoláty vykazovaly vysokou rezistenci na nalidixovou kyselinu, ciprofloxacin a enrofloxacin. Studie prokázala, že rezistence na chinolonová antibiotika (ciprofloxacin a enrofloxacin) je na Slovensku u zvířecích *E. coli* izolovaných z brojlerů velmi vysoká, její úroveň činila cca 80 % u ciprofloxacinu a 50 % u enrofloxacinu [38] [39]. S laboratorním vyšetřením nejvíce korespondují výsledky této studie např. z r. 2008 u kmenů rezistentních k ciprofloxacinu (s vysokým stupněm chinolonové rezistence), které byly též rezistentní k ostatním antibiotikům, např. k ampicilinu (64 %), tetracyklinu (39 %), streptomycinu (60 %), neomycinu (14 %), gentamycinu (14 %) a chloramfenikolu (7 %). Naopak citlivé byly na ceftazidim-klavulanovou kyselinu či ampicilin-sulbactam [39]. To odpovídá do značné míry některým hodnotám zjištěným u laboratorně vyšetřovaných kmenů *E. coli*, u nichž rezistence na ampicilin činila 72,22 %, na tetracyklin 22,22 %, k chloramfenikolu 5,556 %, na streptomycin, neomycin a gentamycin však nebyly shledány rezistentní kmeny žádné. Podobně na amoxicilin-klavulanovou kyselinu či cefoperazon-sulbactam nebyly žádné kmeny stanoveny jako rezistentní.

Zdá se, že doba neuváženého a nadměrného podávání antibiotik v klinické i veterinární praxi, kdy např. ještě v 80. letech 20. století byly fluorochinolony předepisovány jako léky první volby pro úvodní léčbu příslušných infekcí (zejména infekcí močových cest), je již našťastí ve vyspělých zemích minulostí. Odborníci (lékaři i mikrobiologové) na nebezpečí mikrobiální rezistence upozorňovali již od počátku použití antibiotik, ale nápravná opatření byla přijímána jen velmi pozvolna. Ne všechna opatření však bylo možno označit jako rozumná a adekvátní: např. v r. 1997 vydala americká FDA (Agentura pro léky a potraviny) kontroverzní zákaz používání fluorochinolonů u zvířat určených k produkci potravin. Zákaz se týkal enrofloxacinu a sarafloxacinu, které jako jediné fluorochinolony byly v USA používány, a to jen u drůbeže [11]. Je obtížné říci, jestli podobná opatření jsou skutečně nutná, nebo mají pouze zakrýt nedostatky v rozumném a střídavém používání vhodných antibiotik, z nichž některá byla v minulosti využívána nejenom jako léčiva, ale i jako látky umožňující nárůst hmotnosti a zmasilosti hospodářských zvířat.

Výsledky diplomové práce ukazují, že právě *Escherichia coli* velice dobře dokumentuje trend v rostoucí rezistenci mikroorganismů k antibiotikům. Z 18 vyšetřovaných kmenů *E. coli* byla na cefalotin a ampicilin většina kmenů rezistentních (88,89 %, resp. 72,22 %), ostatní kmeny byly intermediární a žádný kmen nebyl vůči těmto antibiotikům citlivý. Také rezistence 4 kmenů na tetracyklin (22,22 %) není nijak zanedbatelná. Získané výsledky nejsou jistě náhodné, uvážíme-li závážnou situaci antibiotické rezistence v České republice.

ZÁVĚR

Diplomová práce dokazuje značný mikrobiologický a medicínský význam rezistence bakteriálního kmene *Escherichia coli*, především rezistence *Escherichia coli* na chinolonová antibiotika. V souvislosti s touto problematikou klade důraz na roli *Escherichia coli* v potravním řetězci, na význam alimentárních a nozokomiálních infekcí vyvolaných bakterií *Escherichia coli* u člověka a jejich nejvhodnější antibiotickou léčbu.

Antibiotika jsou látky vznikající v látkovém metabolismu mikrobů, plísní, rostlin i živočišných tkání. Působí bakteristicky nebo baktericidně, vzácněji fungisticky či fungicidně. V medicíně se používají jenom antibiotika s význačným účinkem proti patogenním bakteriím, popř. plísním, některá i proti protozoím či helmintům, ale nejedovatá pro organismus zvířat či člověka.

Chinolonová antibiotika, označovaná podle mechanismu vlastního působení jako inhibitory gyrázy, se využívají zejména při léčbě močových infekcí. Působí zvláště na gramnegativní bakterie (*E. coli*), novější chinolony i na pseudomonády a stafylokoky, což je řadí mezi širokospektrální antibiotika. Rezistence bakterií je díky mutacím snadno a rychle vyvolávána u chinolonů první generace, zatímco na fluorované chinolony se snadno nevytváří – uvádí se, že 90 až 100 % bakteriálních kmenů v terénu je na ně citlivých.

Významné uplatnění v klinické i veterinární praxi našly fluorochinolony, deriváty chinolonů se systémovým účinkem. Nárůst spotřeby fluorochinolonů v nemocničním prostředí i v lidské komunitě však postupně vedl díky jejich dobré klinické účinnosti, snadnému perorálnímu podání i nízké ceně k jejich masivnímu nadužívání a byl následován rychlým rozvojem rezistence mikroorganismů k této lékové skupině, která dnes ztrácí svoji účinnost pro úvodní léčbu většiny infekcí.

Escherichia coli náleží mezi nejvýznamnější zástupce střevní mikroflóry člověka, ke kolidárním bakteriím. Patří do čeledi *Enterobacteriaceae*, kterou tvoří gramnegativní nesporeující aerobní či fakultativně anaerobní tyčinky. Některé její kmeny (enteropatogenní, enterotoxigenní, enteroinvazivní, enterohemoragické kmeny a kmeny s difúzní adhezencí) jsou patogenní pro člověka i zvířata a způsobují septické infekce (hlavně uroinfekce) a průjemová onemocnění.

V mnoha zemích nastává rychlý vzestup rezistence na chinolony, jeden z nejstrmějších trendů zaznamenává Česká republika. V letech 2001 až 2005 se v České republice projevil dvojnásobný vzestup antibiotické rezistence *Escherichia coli* vůči fluorochinolonům.

Na Ústavu technologie a mikrobiologie potravin Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně byla v letech 2010 - 2011 vyšetřována antibiotická rezistence 18 kmenů *Escherichia coli*, které byly izolovány z výtěru bažantů z volné přírody a farmového chovu na Moravě. Citlivost či rezistence bakteriálních kmenů na zvolená antibiotika byla zkoumána *in vitro* diskovou difuzní metodou.

Výzkum prokázal z 18 vyšetřovaných kmenů *E. coli* 13 kmenů rezistentních k ampicilinu (72,22 %), 16 kmenů rezistentních vůči cefalotinu (88,89 %) a jeden kmen rezistentní na chloramfenikol a zároveň sulfomethoxazol-trimetoprim (5,556 %). Na tetracyklin byly shledány rezistentní 4 kmeny (22,22 %). V případě antibiotik cefoperazonu-sulbactamu, ciprofloxacinu, colistinu, gentamicinu a piperacilin-tazobactamu byly stanoveny všechny kmeny jako citlivé.

Laboratorní vyšetření názorně ilustrovalo vzrůstající rezistenci bakteriálních kmenů *Escherichia coli* k ampicilinu, cefalotinu i k tetracyklinu, na niž upozorňují mnohé české i zahraniční mikrobiologické studie.

Diplomová práce dokazuje závažnost situace rostoucí rezistence *Escherichia coli* k fluorochinolonům, které by v současné době v podmínkách České republiky měly sloužit jen jako léky rezervní.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ČECHOVÁ, L., JANALÍKOVÁ, M. *Obecná mikrobiologie*, 1. vyd., Zlín: UTB ve Zlíně, Academia Centrum, 2007, ISBN 978-80-7318-516-9.
- [2] Lékařská fakulta v Hradci Králové: Antibiotika [online]. [cit. 28-12-2009].
Dostupné na: <<http://www.camelot.lfhk.cuni.cz>>.
- [3] Potravinářská mikrobiologie - Vzdělávací portál Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně [online]. [cit. 30-12-2009].
Dostupné na: <<http://utb.cepac.cz/Screens/Explorer.aspx?id=7>>.
- [4] WINTER, C. K., DAVIS, S. F. Organic foods, *Journal of Food Science*, sv. 71, č. 9, 2006, 117-124 s.
- [5] HANČOVÁ, H., VLKOVÁ, M. *Biologie I. v kostce*, 3. vyd., Havlíčkův Brod: Fragment, 2005, ISBN 80-7200-971-0.
- [6] TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. *Microbiology - an introduction*, 9. vyd., San Francisco: Pearson Education, 2007, ISBN 0-8053-4791-7.
- [7] SPÍŽEK, J. Rezistence na antibiotika, *Vesmír*, sv. 78, č. 1, 1999, 27-31 s.
- [8] Antimikrobiální rezistence jako biologické riziko z potravin – Vetweb.cz – veterinářství [online]. [cit. 10-9-2010]. Dostupné na: <<http://www.vetweb.cz>>.
- [9] Bakterie, na niž nepůsobí antibiotika – Vetweb.cz – veterinářství [online]. [cit. 10-9-2010]. Dostupné na: <<http://www.vetweb.cz>>.
- [10] Konsensus používání antibiotik III. – Chinolony [online]. [cit. 28-6-2010].
Dostupné na: <http://www.zdravcentra.sk/cps/rde/xchg/zcsk/xsl/81_20294.html>.
- [11] ŠIMŮNEK, J., SMOLA, J. *Antibiotika, sulfonamidy a chinolony ve veterinární medicíně*, 1. vyd., Tišnov: Vydavatelství potravinářské literatury LAST, 1998, ISBN 80-900260-6-0.
- [12] WALSH, CH. *Antibiotics. Actions, origins, resistance*, 1. vyd., Washington D.C.: ASM Press (American Society for Microbiology), 2003, ISBN 20036-2904.
- [13] Norfloxacin – chinolony II. generace v léčbě infekce dolních močových cest u žen – ZDN [online]. [cit. 29-7-2010]. Dostupné na: <<http://www.zdn.cz>>.

- [14] KUČERA, J. Fluorochinolony a uroinfekce psů, *Veterinářství*, sv. 56, 2006, 71-76 s.
- [15] KMEŤ, V. *Hostiteľsko-mikrobiálne interakcie v tráviacom trakte zvierat a rezistencia Escherichia coli na antibiotiká* (vědecká monografie), 1. vyd., Brno: Tribun EU, 2009, ISBN 978-80-7399-554-6.
- [16] Pathogenic *E. coli* – Online textbook of bacteriology [online]. [cit. 12-3-2011]. Dostupné na: <<http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli.html>>.
- [17] *Escherichia coli* - Wikipedie, otevřená encyklopedie [online]. [cit. 17-1-2010]. Dostupné na: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli>.
- [18] Toxikon - *Escherichia coli* [online]. [cit. 11-7-2010]. Dostupné na: <http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/escherichia_coli.php>.
- [19] ČEJKA, K., HOFMAN, J., HUBÁČEK, J. a kol. *Vybrané metody v mikrobiologii*, Praha: Academia, nakladatelství Československé akademie věd, 1981, ISBN 104-21-852.
- [20] KAPER, J. B., NATARO, J. P., MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*, *Nature Reviews Microbiology*, sv. 2, 2004, 123-140 s.
- [21] ATISOOK, K., CARLSON, S., MADARA, J. Effects of phlorizin and sodium on glucose-elicited alterations of cell junctions in intestinal epithelia, *American Journal of Physiology*, sv. 258, 1990, 77-85 s.
- [22] YU, J., KAPER, J. B. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Molecular Microbiology*, sv. 6, 1992, 411-417 s.
- [23] BLÁHOVÁ, K., BIELASZEWSKÁ, M., STEJSKAL, J., MAJETKOVÁ, E. *Hemolyticko-uremický syndróm*, Praha: Triton, 2000, ISBN 80-7254-094-7.
- [24] POURBAKSH, S. H. a kol. Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*, *Microbial Pathogenesis*, sv. 22, 1997, 331-341 s.
- [25] SMOLA, J., CELER, V., KLIMEŠ, J., ŠIMŮNEK, J. *Klinická veterinární mikrobiologie*, Brno: VFU v Brně, 2002, ISBN 80-902963-3-5.

- [26] GARCIA, A., FOX, J. G. The rabbit as a new reservoir host of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Emerging Infectious Diseases*, sv. 9, č. 12, 2003, 1592-1597 s.
- [27] ZIV, G., SHEM-TOV, M., ASCHER, F. Combined effect of ampicillin, colistin and dexamethasone administered intramuscularly to dairy cows on the clinico-pathological course of *E. coli*-endotoxin mastitis, *Veterinary Research*, sv. 29, č. 1, 1998, 89-98 s.
- [28] BARDONĚ, J. Monitoring gramnegativních bakterií vyvolávajících alimentární infekce, *Sborník abstrakt* (10. pracovního setkání „Antibiotické politiky“), 1. vyd., Soláň: Agentura B/P/P, 2006, ISBN 80-239-7288-X, 62-63 s.
- [29] KOLÁŘ, M. Bakteriální β -laktamasy a jejich význam pro současnou medicínu, *Sborník abstrakt* (10. pracovního setkání „Antibiotické politiky“), 1. vyd., Soláň: Agentura B/P/P, 2006, ISBN 80-239-7288-X, 5-9 s.
- [30] SAUER, P. Molekulárně biologické metody v diagnostice ESBL, *Sborník abstrakt* (10. pracovního setkání „Antibiotické politiky“), 1. vyd., Soláň: Agentura B/P/P, 2006, ISBN 80-239-7288-X, 13-14 s.
- [31] YOSHIDA, H., BOGAKI, M., NAKAMURA, M., NAKAMURA, S. Quinolone resistance-determining in the *DNA-gyrase gyrA* gene of *Escherichia coli*, *Antimicrob Agents Chemother*, sv. 34, 1990, 1271-1272 s.
- [32] OZEKI, S. a kol. Development of a Rapid Assay for Detecting *gyrA* Mutations in *Escherichia coli* and Determination of Incidence of *gyrA* Mutations in Clinical Strains Isolated from Patients with Complicated Urinary Tract Infections, *Journal of Clinical Microbiology*, sv. 35, č. 9, 1997, 2315-2319 s.
- [33] TRAN, J. H., JACOBY, G. A. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance, *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA)*, sv. 99, 2002, 5638-5642 s.
- [34] MARTINEZ-MARTINEZ, L., PASCUAL, A., JACOBY, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid, *Lancet*, sv. 351, 1988, 797-799 s.
- [35] NYČ, O. Problematika rezistence k fluorochinolonům a jejich indikace v praxi, *Sborník abstrakt* (10. pracovního setkání „Antibiotické politiky“), 1. vyd., Soláň: Agentura B/P/P, 2006, ISBN 80-239-7288-X, 32-33 s.

- [36] JINDRÁK, V., URBÁŠKOVÁ, P., NYČ, O. Fluorochinolony – kriticky ohrožená skupina antibiotik, *Practicus (Odborný časopis praktických lékařů)*, roč. 6, č. 1, 2007, 6-11 s.
- [37] COOK, C. L., SINGER, R. S., JANG, S. S., HIRSH, D. C. Enrofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolated from dogs with urinary tract infections, *JAVMA (Journal of the American Veterinary Medical Association)*, sv. 220, č. 2, 2002, 190-192 s.
- [38] KMEŤ, V., MELICHÁREK, I., BOBČEK, R., BIDLEŇ, L., SZAKAL, T. Dynamika mikrobiálnej rezistencie na antibiotiká komenzálnych *Escherichia coli* u brojlerov, *Slovenský Veterinársky Časopis*, sv. 32, č. 4, 2007, 252-253 s.
- [39] KMEŤ, V., KMEŤOVÁ, M. High level of quinolone resistance in *Escherichia coli* from healthy chicken broilers, *Folia Microbiologica*, sv. 55, č. 1, 2010, 79-82 s.
- [40] ČÍŽEK, A., DOLEJSKÁ, M., LITERÁK, I. Bakterie odolávající antibiotikům padají z nebe, *Vesmír*, sv. 87, č. 12, 2008, 870-881 s.
- [41] KOLÁŘ, M., BARDOŇ, J., VÁGNEROVÁ, I., ČEKANOVÁ, L. Rezistence vybraných gramnegativních bakterií izolovaných z chovů hospodářských zvířat, *Sborník abstrakt (10. pracovního setkání „Antibiotické politiky“)*, 1. vyd., Soláň: Agentura B/P/P, 2006, ISBN 80-239-7288-X, 64-66 s.
- [42] SCHLEGELOVÁ, J., KARPÍŠKOVÁ, S., KONSTANTINOVÁ, L., BABÁK, V., VLKOVÁ, H., SEYDLOVÁ, R. Incidence multirezistentních izolátů *Escherichia coli* ze syrového mléka a masa a potravin vyrobených z nich, *Sborník abstrakt (10. pracovního setkání „Antibiotické politiky“)*, 1. vyd., Soláň: Agentura B/P/P, 2006, ISBN 80-239-7288-X, 69-70 s.
- [43] Přehledy rezistencí bakterií na antibiotika [online]. [cit. 11-7-2010].
Dostupné na: <http://www.nemcheb.cz/Rez_bakterii_na_antibiotika2005.htm>.
- [44] EUCAST: Organization [online]. [cit. 23-3-2011].
Dostupné na: <<http://www.eucast.org/organization>>.

- [45] KOLÁŘ, M., BARDOŇ, J., SAUER, P., KESSELOVÁ, M., ČEKANOVÁ, L., VÁGNEROVÁ, I., KOUKOLOVÁ, D., HEJNAR, P. Fluorochinolone-Resistant *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* in Poultry of Middle Moravia, Czech Republic, *Acta Veterinaria Brno*, sv. 74, č. 2, 2005, 249-253 s.
- [46] KOLÁŘ, M., PANTŮČEK, R., BARDOŇ, J., VÁGNEROVÁ, I., TYPOVSKÁ, H., DOŠKÁŘ, VÁLKA, I. Occurrence of antibiotic-resistant bacterial strains isolated in poultry, *Veterinární medicína*, sv. 47, č. 2-3, 2002, 52-59 s.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

<i>aac(6)-Ibr-cr</i>	gen plazmidové chinolonové rezistence
A/E	léze epitelu, Attaching and Effacing
AMR	rezistentní vůči antimikrobiálním prostředkům
APEC	aviárně patogenní <i>Escherichia coli</i>
BIOHAZ	vědecký panel pro biologická rizika Evropského úřadu pro bezpečnost potravin
C	cytozin
Ca	vápník
CNF1,2	cytotoxické nekrotoxické faktory nekrotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
CPD	cefpodoxim
CTXM	β -laktamasy hydrolyzující cefotaxim
ČR	Česká republika
DAEC	<i>Escherichia coli</i> s difuzní adherencí
DNA	deoxyribonukleová kyselina, Deoxyribonucleic Acid
EAEC	enteroadherentní <i>Escherichia coli</i>
EARSS	Evropský systém sledování antibiotické rezistence, European Antimicrobial Resistance Surveillance System
EEC	enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin, European Food Safety Authority
EHEC	enterohemoragické <i>Escherichia coli</i>
EIEC	enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
ENDO agar	Endův agar
EPEC	enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
ESBL	β -laktamasy širokého spektra, Extended-spectrum β -lactamases

ExPEC	extraintestinální (septikemická) <i>Escherichia coli</i>
ETEC	enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
EU	Evropská unie
EUCAST	Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti, European Committee on antimicrobial susceptibility testing
FDA	Agentura pro léky a potraviny, Food and Drug Administration
F faktor	fertilní faktor konjugace (sex-faktor)
FQ	fluorochinolony
G	guanin
GE	gelová elektroforéza, Gel Electrophoresis
G fáze	generační fáze buněčného cyklu
<i>gyrA</i>	<i>DNA-gyrasa A</i>
<i>gyrB</i>	<i>DNA-gyrasa B</i>
H antigen	bičíkový antigen <i>Escherichia coli</i>
IU	množství účinné látky, International Unit
J53	divoký kmen <i>Escherichia coli</i>
K antigen	kapsulární antigen <i>Escherichia coli</i>
HC	hemoragická kolitida
HUS	hemolyticko-uremický syndrom
LDH	<i>laktát dehydrogenasa, lactate dehydrogenase</i>
<i>mar</i>	mnohočetná antibiotická rezistence, multiple antibiotic resistance
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MHA agar	Mueller Hinton Agar
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MLC20	lehký myozinový řetězec, Myozin Light Chain

mR	multirezistentní
MRSA	meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> , Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NCCLS	Národní výbor pro standardy klinických laboratoří, National Committee for Clinical Laboratory Standards
non-O157	sérotyp (kmen) enterohemoragické <i>Escherichia coli</i> u přežvýkavců
NRL	Národní referenční laboratoř
NTEC	nekrotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
O antigen	stěnový antigen <i>Escherichia coli</i>
O1	sérotyp aviárně patogenní <i>Escherichia coli</i>
O2	sérotyp aviárně patogenní <i>Escherichia coli</i>
O78	sérotyp aviárně patogenní <i>Escherichia coli</i>
O157:H7	sérotyp (kmen) enterohemoragické <i>Escherichia coli</i>
PAE	postantibiotický efekt
PCA agar	Plate Count Agar
PCR	polymerázová řetězová reakce, Polymerase Chain Reaction
<i>qnr</i>	gen plazmidové chinolonové rezistence
QRDR	genová oblast, Quinolone Resistance-Determining Region
R faktor	faktor zvýšené rezistence k antibiotikům
RTF	skupina genů faktoru R, Resistance Transfer Factor
StIIe	toxin atypické enterohemoragické <i>Escherichia coli</i>
Stx1	toxin enterohemoragické <i>Escherichia coli</i>
Stx2	toxin enterohemoragické <i>Escherichia coli</i>
SHV1,2	typy β -laktamas
SVS	Státní veterinární správa

SVÚ	Státní veterinární ústav
TEM1,2	typy β -laktamas
T3SS	sekreční systém typu III
UPEC	uropatogenní <i>Escherichia coli</i>
USA	Spojené státy americké
UTI	infekce močové soustavy, Urinary Tract Infection
VRE	vankomycin-rezistentní <i>Enterococcus</i>
VTEC	verotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
XLD agar	agar s xylózou, lysinem a deoxycholátem, Xylose Lysine Deoxycholate agar
Zn	zinek
Ala	alanin
Asn	asparagin
Asp	kyselina asparagová
Gly	glycin
Leu	leucin
Phe	fenylalanin
Ser	serin
Tyr	tyrosin

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Místo účinku antibiotik v buňce [3]	14
Obrázek 2. <i>Escherichia coli</i> při 1000násobném zvětšení [17]	28
Obrázek 3. Vyhodnocení zastoupení rezistentních a intermediárních kmenů <i>Escherichia coli</i> na jednotlivá vybraná antibiotika	64
Obrázek 4. Vyhodnocení podílu rezistentních kmenů <i>Escherichia coli</i> podle skupin zvolených antibiotik	65

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Rozdělení antibiotik podle mechanismu jejich účinku v buňce [2].....	14
Tabulka 2. Výskyt patogenních <i>E. coli</i> u mláďat [15].....	31
Tabulka 3. Rezistence izolátů <i>Escherichia coli</i> a <i>Proteus mirabilis</i> z chovů drůbeže k antibiotikům [41].....	49
Tabulka 4. Rezistence izolátů <i>Escherichia coli</i> a <i>Proteus mirabilis</i> z chovů telat k antibiotikům [41].....	50
Tabulka 5. Rezistence kmenů <i>Escherichia coli</i> u močových infekcí – kvalitativní diskové metody stanovení citlivosti (823 kmenů) [43].....	53
Tabulka 6. Rezistence kmenů <i>Escherichia coli</i> bez rozlišení druhu zkoumaného materiálu – kvalitativní diskové metody stanovení citlivosti (1372 kmenů) [43].....	53
Tabulka 7. Hraniční průměry inhibičních zón na vybraná antibiotika pro kmeny <i>E. coli</i> (dle metodiky EUCAST) [44].....	58
Tabulka 8. Naměřené zóny a hodnocení rezistence pro kmeny <i>E. coli</i> č. 1 až 18.....	59

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Trend v rezistenci *Escherichia coli* k ciprofloxacinu v ČR u kmenů z moči a krve [35]

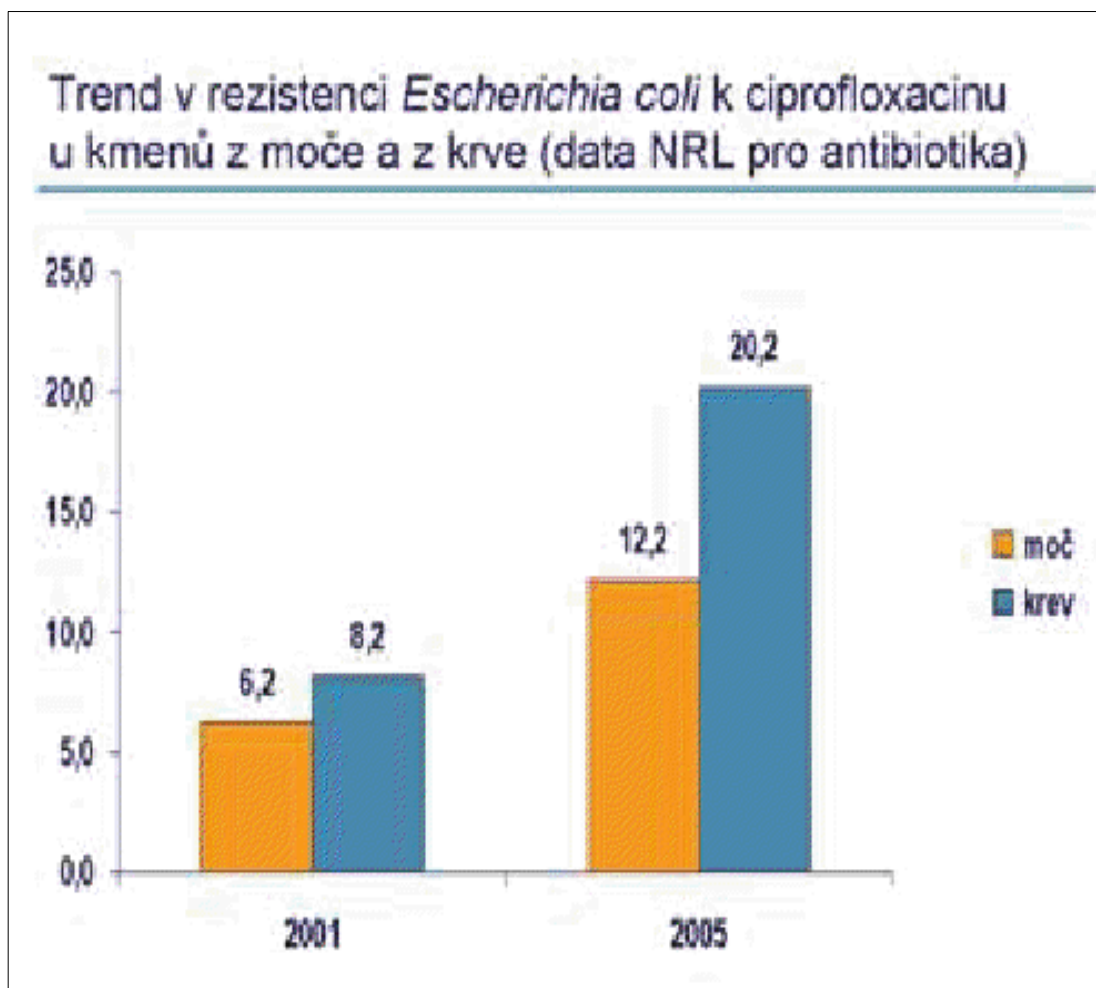
Příloha II: Trend v rezistenci *Escherichia coli* k ciprofloxacinu ve vybraných evropských zemích v letech 2001 – 2005 [35]

Příloha III: Hodnocení citlivosti vyšetřovaného kmene *E. coli* č. 9 na první sadu vybraných antibiotik (rezistentní na chloramfenikol C 30)

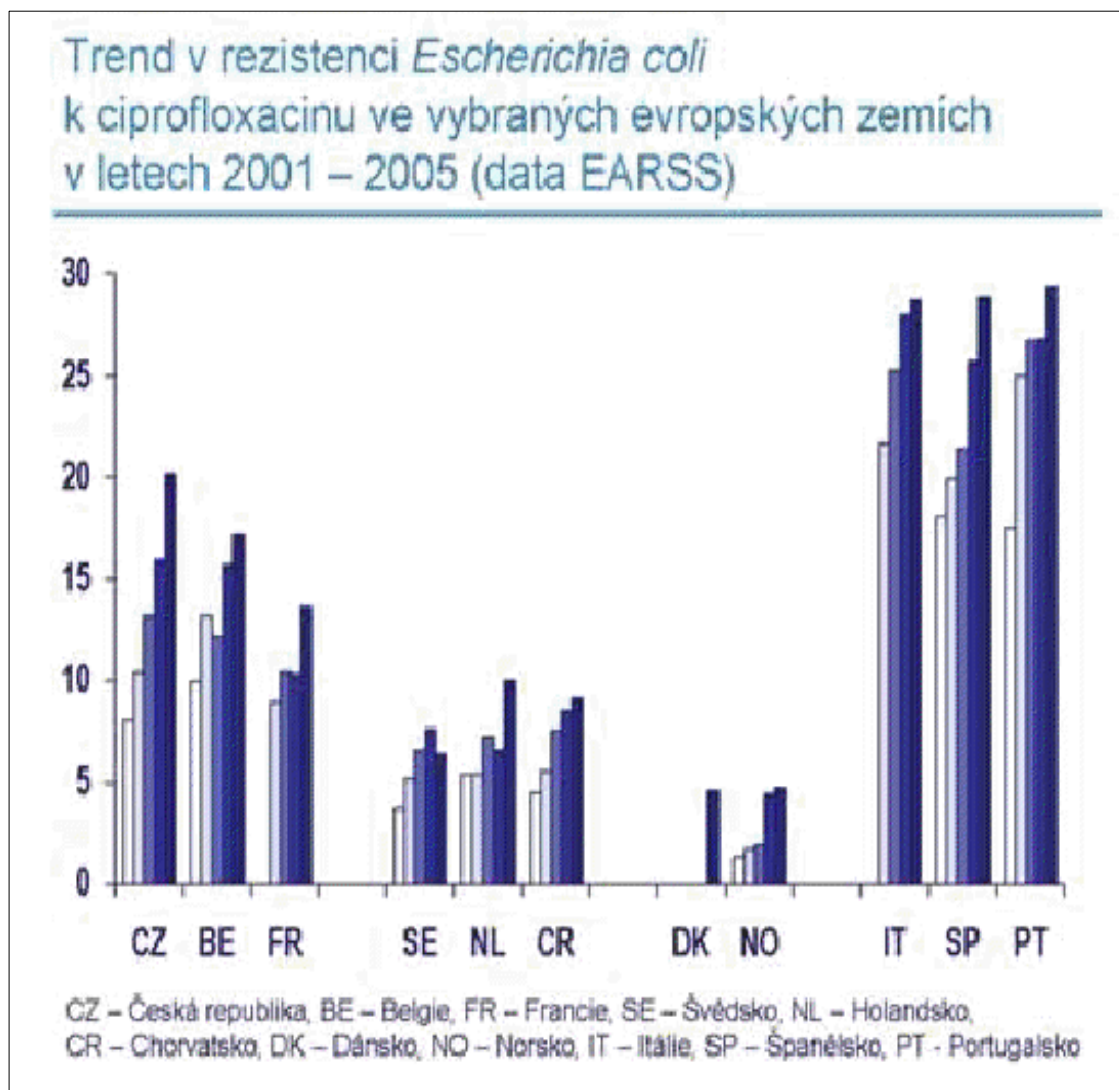
Příloha IV: Hodnocení citlivosti vyšetřovaného kmene *E. coli* č. 9 na druhou sadu vybraných antibiotik (rezistentní na ampicilin A 10, cefalotin KF 30, sulfomethoxazol-trimetoprim SXT 25, tetracyklin T 10)

Příloha V: Hodnocení citlivosti vyšetřovaných kmenů *E. coli* č. 11, 12, 14 a 15 na první sadu vybraných antibiotik

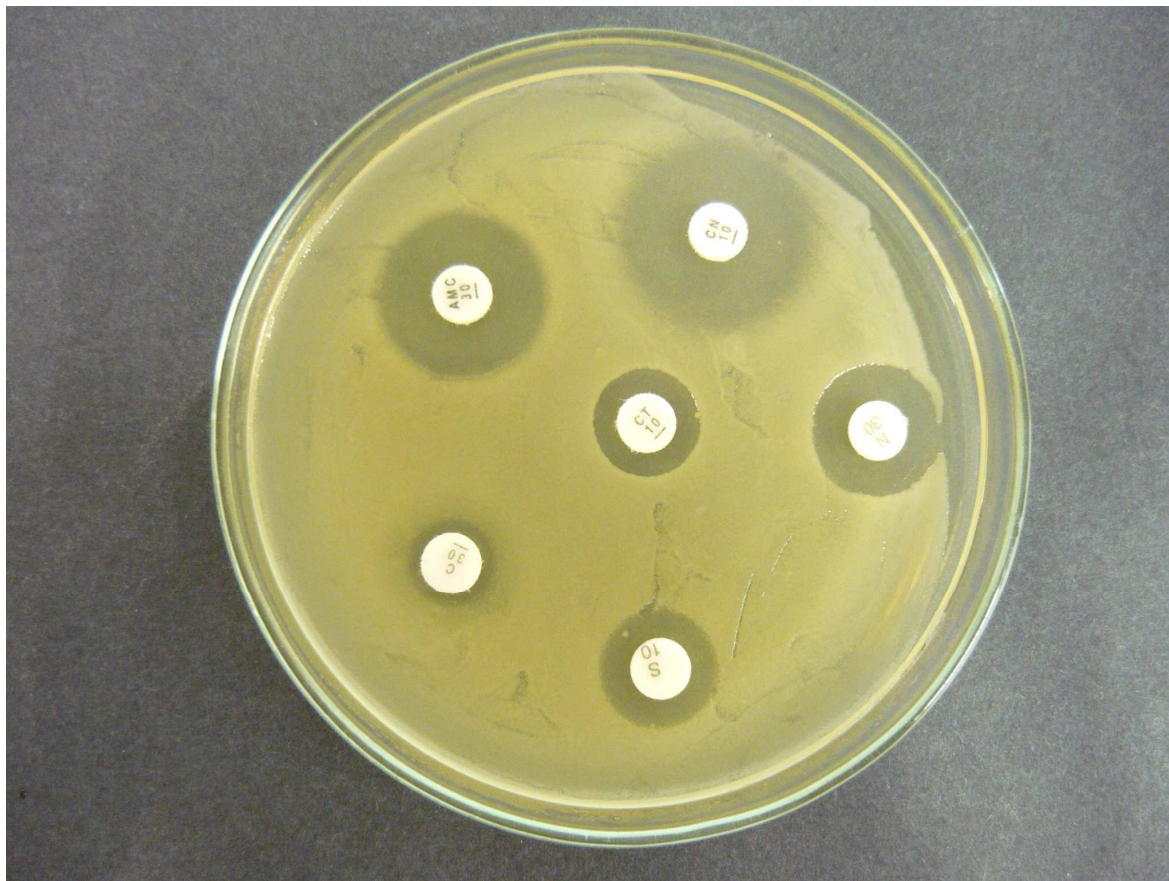
PŘÍLOHA I: TREND V REZISTENCI *ESCHERICHIA COLI* K CIPROFLOXACINU V ČR U KMENŮ Z MOČI A KRVE (DATA NÁRODNÍ REFERENČNÍ LABORATOŘE) [35]



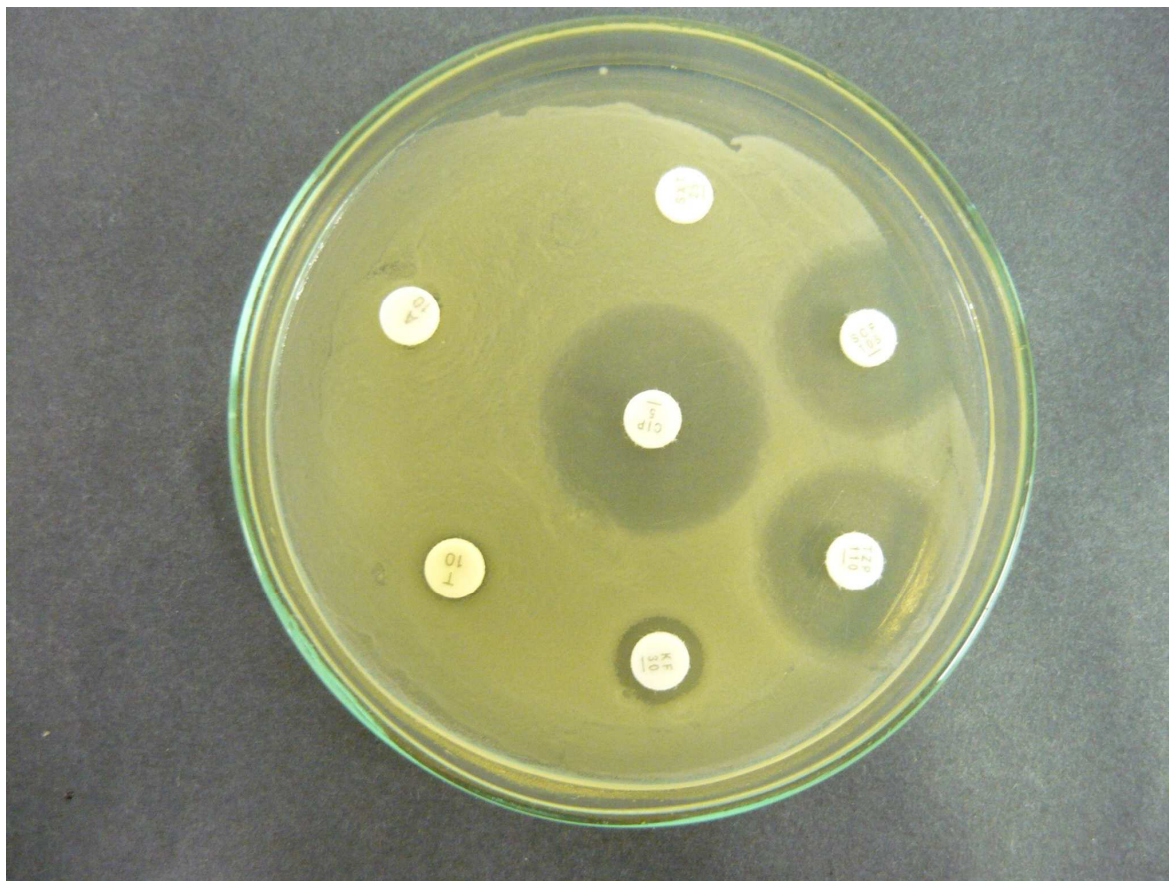
PŘÍLOHA II: TREND V REZISTENCI *ESCHERICHIA COLI* K CIPROFLOXACINU VE VYBRANÝCH EVROPSKÝCH ZEMÍCH V LETECH 2001 – 2005 (DATA EVROPSKÉHO SYSTÉMU SLEDOVÁNÍ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE) [35]



**PŘÍLOHA III: HODNOCENÍ CITLIVOSTI VYŠETŘOVANÉHO
KMENE *E. COLI* Č. 9 NA PRVNÍ SADU VYBRANÝCH ANTIBIOTIK
(REZISTENTNÍ NA CHLORAMFENIKOL C 30)**



**PŘÍLOHA IV: HODNOCENÍ CITLIVOSTI VYŠETŘOVANÉHO
KMENE *E. COLI* Č. 9 NA DRUHOU SADU VYBRANÝCH
ANTIBIOTIK (REZISTENTNÍ NA AMPICILIN A 10, CEFALOTIN
KF 30, SULFOMETHOXAZOL-TRIMETOPRIM SXT 25,
TETRACYKLIN T 10)**



**PŘÍLOHA V: HODNOCENÍ CITLIVOSTI VYŠETŘOVANÝCH
KMENŮ *E. COLI* Č. 11, 12, 14 A 15 NA PRVNÍ SADU VYBRANÝCH
ANTIBIOTIK**

