



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Rezistence *Escherichia coli* na vybraná antibiotika
v okrese Písek v roce 2016

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Karolína Bromová

Vedoucí práce: prim. MUDr. Věra Kůrková

České Budějovice 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Rezistence Escherichia coli na vybraná antibiotika v okrese Písek v roce 2016*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 02. 08. 2018

.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat MUDr. Věře Kůrkové, že mi umožnila využít prostory její laboratoře, za pomoc s bakalářskou prací a za odborný dohled. Dále bych chtěla poděkovat svému blízkému příteli Martinu Pánkovi za pomoc se statickým zpracováním dat a své rodině za podporu ve studiu.

Rezistence *Escherichia coli* na vybraná antibiotika v okrese Písek za rok 2016

Abstrakt

Rezistence na antibiotika se stává celosvětovým problémem. Ve své práci jsem se zaměřila na rezistence *Escherichia coli* v okrese Písek v roce 2016. *Escherichia coli* je nejčastějším původcem infekcí močových cest. V průměru každá druhá žena a každý pátý muž prodělají infekci močových cest. S problémy rezistence se setkáváme už řadu let. Dříve účinná antibiotika jsou dnes neúčinná. Často se musí sahat po širokospektrálních antibiotikách, která mají řadu vedlejších účinků (průjemy, kvasinkové infekce), jsou dražší a mají dopad na ekonomiku. V ČR zatím nemáme takovou míru rezistence jako v jiných státech např. v Řecku. Proto bychom si měli vzít příklad z ostatních zemí a vyvarovat se masivnímu užívání antibiotik.

Cílem mé práce bylo nashromáždit informace o rezistenci *Escherichia coli*, porovnat rozdíly mezi dospělými a dětskými pacienty a zjistit míru ESBL kmenů v okrese Písek v roce 2016. Výsledky svého výzkumu porovnám s výsledky močové studie NRL SZÚ v Praze za rok 2016.

V teoretické části jsem se zabývala především charakteristikou antibiotik, způsoby antibiotické rezistence a stručným popisem *Escherichia coli*.

Ve své praktické části jsem popsala způsoby identifikace bakterií (ENTERO test 24N). Principy biochemických testů (VP test, INDOL test), které nám pomohou blíže určit, o jaký typ bakterie by se mohlo jednat. Dále popisují principy a využití testů pro stanovení citlivosti (Diskový difuzní test, Mikrodiluční test M.I.C.). Pomocí ESLB MAST testu jsem zjistila v jaké míře se vyskytovali v okrese Písek kmeny produkující ESBL beta-laktamázu s rozšířeným spektrem účinku, které způsobují multirezistenci. Dále praktická část obsahuje vyhodnocení statistiky o rezistenci na vybraná antibiotika, kterou jsem zpracovávala z dat klinické mikrobiologie Nemocnice Písek a.s.

Ke svému pozorování rezistence *Escherichia coli* jsem si vybrala 4 druhy antibiotik, používaných při léčbě infekcí močových cest – Amoxicilin, amoxicilin + klavulanát, nitrofurantoin a gentamicin.

Výsledky mé práce dokazují, že rezistence na vybraná antibiotika je poměrně vysoká. Vyplývá, že ženy mají více rezistentních kmenů než muži, což by se dalo vysvětlit tím,

že ženy trpí častěji močovými infekcemi a vyskytuje se u nich více ESBL kmenů. U dětských a mladistvých pacientů (0 – 19 let) se nevyskytují žádné ESBL kmeny. Dále vyplývá, že i dívky trpí častěji močovými infekcemi než chlapci, kdy jediná výjimka je u dívek a chlapců ve věku 0 – 3 roky kdy podle mého výzkumu močovými infekcemi trpí více chlapci než dívky.

Klíčová slova: Antibiotika, rezistence, *Escherichia coli*, citlivost, *Enterobacteriaceae*, ESBL kmeny, multirezistence

Resistances of *Escherichia coli* to selected antibiotics in a district of Písek for the year 2016

Abstract

Resistance to antibiotics is becoming a global problem. In my work I focused on the resistance of *Escherichia coli* in the Písek district in 2016. *Escherichia coli* is the most common cause of urinary tract infections. On average, every second woman and every fifth male will experience urinary tract infection. Resistance problems have met for many years. Previously effective antibiotics are now ineffective. Often they have to go beyond wide-spectrum antibiotics that have a number of side effects (diarrhea, yeast infections), are more expensive and have an impact on the economy. In the Czech Republic, we do not yet have the same level of resistance as in other countries, In Greece. Therefore, we should take an example from other countries and avoid massive use of antibiotics.

The objectives of my work were to collect information on *Escherichia coli* resistance, to compare the differences between adult and pediatric patients and to determine the degree of ESBL strains in the Písek district in 2016. I compare the results of my research with the results of the urinalysis study of NRL SZÚ in Prague for 2016.

In the theoretical part, I have dealt mainly with antibiotic characteristics, antibiotic resistance methods and briefly describe *Escherichia coli*.

In its practical part, methods of identifying bacteria (ENTERO test 24N) are described. Principles of biochemical tests (VP test, INDOL test) to help us determine what type of bacteria might be. I also describe the principles and use of sensitivity assays (Disk diffusion test, M.I.C. microdilution test). Using the ESLB MAST test, I discovered the extent to which ESBL beta-lactamase-producing strains with extended spectrum of effect, which cause multi-resistance, were found in the Písek district. Furthermore, the practical part contains evaluation of resistance statistics on selected antibiotics, which I processed from data from the clinical microbiology of Písek Hospital.

For my observation of *Escherichia coli* resistance, I chose 4 types of antibiotics used in the treatment of urinary tract infections - Amoxicillin, amoxicillin + clavulanate, nitrofurantoin and gentamicin.

The results of my work demonstrate that resistance to selected antibiotics is relatively high. It appears that women have more resistant strains than men, which can be

explained by the fact that women are more likely to have urinary infections and more ESBL strains are present. No ESBL strains are present in pediatric patients (0 - 19 years). It also follows that girls are more likely to suffer from urinary infections than boys, with the only exception being girls and boys aged 0-3 years old, according to my research with urinary infections suffer more boys than girls.

Key words: Antibiotics resistance, *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae*, ESBL strains, multiresistance

Obsah

Úvod	10
1 Escherichia coli	11
1.1 Taxonomie	11
1.2 Morfologie	11
1.3 Fyziologie	12
1.4 Antigenní charakter	12
1.5 Patogenita.....	12
1.6 Enteropatogenní kmeny rozdělení	12
1.7 Onemocnění	14
2 Antibiotika	16
2.1 Historie	16
2.2 Charakteristika antibiotik.....	16
2.3 Rozdělení antibiotik.....	17
2.4 Farmakokinetika cefalosporinů 3. generace	19
2.5 Nežádoucí účinky antibiotik	21
3 Rezistence bakterií na antibiotika	23
3.1 Zkřížená rezistence	23
3.2 Mechanismy obrany bakterií před ATB.....	23
3.3 Další způsoby inaktivace ATB	24
3.4 Přenos rezistence.....	25
3.5 Beta-laktamázy	25
3.6 Multirezistence	27
3.7 Surveillance a monitorování rezistence.....	28
4 Cíle.....	29
5 Metodika	30
5.1 Kultivace.....	30
5.2 Kultivační půdy.....	31
5.3 Biochemické testy	32
5.3.1 ENTERO test 24 N	33
5.3.2 INDOL test.....	34

5.3.3	<i>VP test (Voges – Proskareův test)</i>	35
5.4	<i>Stanovení citlivosti</i>	36
5.4.1	<i>Diskový difuzní test</i>	37
5.4.2	<i>M. I. C. test (diluční test)</i>	38
5.4.3	<i>ESBL MAST test</i>	39
6	Výsledky	41
7	Diskuze	48
8	Závěr	51
	Seznam literatury	52
	Seznam tabulek	56
	Seznam obrázků	57
	Seznam příloh	58
	Seznam zkratk	59
	Přílohy	61

Úvod

Antibiotická rezistence je dnes jednou z největších hrozeb pro celosvětové zdravotnictví, bezpečnost potravin a vývoj. Může mít vliv na kohokoliv, v jakémkoliv věku, v kterékoliv zemi. Antibiotická rezistence může nastat přirozeně, ale zneužívání léčiv u lidí a zvířat tento proces urychluje. Počet rostoucích infekcí roste, stávají se těžšími, protože se používají antibiotika k jejich léčbě a tím se stávají méně účinnými. Antibiotická rezistence vede v nemocnicích k delšímu pobytu, nákladnější léčbě a větší úmrtnosti. Svět musí změnit způsob, jakým se předepisují a používají antibiotika. I když se vyvine nový lék, odolnost k antibiotikům zůstává. Pokud rezistence k antibiotikům zůstane, budou se infekce léčit dražšími léky a tím se zvýší náklady na zdravotní péči. V moderní medicíně je problém při transplantacích, chemoterapiích, ale i u běžných operací, protože se stávají nebezpečnějšími bez účinných antibiotik pro prevenci a léčbu infekcí. Lidé by měli být více informováni o této problematice. Mělo by se optimalizovat používání antibiotik a posílit dohled na výzkum.

1 *Escherichia coli*

1.1 *Taxonomie*

Escherichia coli patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Je zařazena do čeledi *Enterobacteriales*. Třídy *Gammaproteobacteria*, kmene *Proteobacteria* a domény *Bacteria*. (Sedláček, 2007)

Escherichia coli dále jen *E. coli* je běžný komenzál tlustého střeva u lidí i u teplokrevných živočichů. Střevo je osídleno obvykle ihned po narození, nejčastěji alimentární cestou nebo přenosem z jiného osídleného jedince (Horáček, 2000). *E. coli* může znečistit vodu, kde přežívá řadu týdnů, proto slouží jako indikátor fekální kontaminace vody (Bednář et al., 1996).

1.2 *Morfologie*

Velikost je 2–3 μm a šířka 0,5 μm (Šilhánková, 2002). Je to gramnegativní rovná tyčka se zaoblenými konci, pohybující se pomocí bičíků. Netvoří spory. Bakterie je bez pigmentu, barví se homogenně. Na povrchu mají různé druhy fimbrií. Některé druhy mohou tvořit pouzdra a kolonie mají hlenovitý charakter (Krmencík, Honej, Kysilka, 2007). Vnější biomembrána je tvořena lipopolysacharidy, v nichž jsou póry tvořené bílkovinami, například poriny Omp C, Omp F a Pho E. Poriny jsou důležité pro příjem a výdej vitamínů z okolí. Mezi buněčnou stěnou a vnější biomembránou se nachází prostor nazývaný periplazmatický, kde se vyskytují bílkoviny vážící aminokyseliny či sacharidy a enzymy štěpící antibiotika (beta-laktamázy). Buněčná stěna je z tenké vrstvy peptidoglykanu (proto gramnegativní), který udává tvar bakterie. Cytoplazmatická membrána je složena asi ze 70 % bílkovinami a probíhá v ní mnoho biochemických procesů. Cytoplazma je tvořena roztokem, v němž jsou uloženy ribozomy a kde probíhá proteosyntéza. Dále se zde nachází bakteriální DNA. Cytoplazma neobsahuje membránové organely.

1.3 Fyziologie

Je to fakultativně anaerobní bakterie a potencionální patogen (Krmencík, Honej, Kysilka, 2007). Využívá fermentace pro přísun energie. *E. coli* je schopná využívat různé druhy sacharidů a aminokyselin. Je to chemoheterotrof. Nejlépe a nejrychleji roste v glukóze. Při anaerobních podmínkách využívá glukózu za vzniku laktátu, sukcinátu, etanolu a acetátu. Při aerobních podmínkách produkuje indol (Šilhánková, 2002). Netvoří sirovodík. Oxidáza je negativní, ale kataláza pozitivní. Optimální teplota pro růst je 37 C při hodnotě pH 6–8.

1.4 Antigenní charakter

Podle antigenní struktury se dělí na sérotypy. Somatických (O) antigenů je 167, k nim se váží K a H antigeny, takže jejich kombinací vzniká 240 sérotypů. Kapsulární antigeny se dělí podle chemického složení na ty, které jsou tvořeny kyselými nebo neutrálními polysacharidy, a na ty, které se skládají z bílkovin a tvoří struktury podobné fimbriím (Bednář et al., 1996).

1.5 Patogenita

Patogenita *E. coli* vyvolává dva druhy onemocnění:

- Extraintestinální (močové infekce, hnisavé rány, septická onemocnění), kdy onemocnění je způsobeno převážně komensálními sérotypy a často jsou to onemocnění endogenní. Většinou jsou to kmeny, které vzdorují baktericidii séra a fagocytóze. Mají polysacharidový kapsulární antigen.
- Způsobují infekce intestinální, doprovázené průjmy.

1.6 Enteropatogenní kmeny rozdělení

- **Enteropatogenní EPEC**

Často vyvolávají novorozenecké průjmy, kdy dochází k dehydrataci při vodnatých průjmech, případně mohou vést až ke smrti. Onemocnění vyvolávají jen některé sérotypy, které obývají tlusté střevo. Problém je často v méně rozvinutých zemích. U větších dětí a dospělých není onemocnění vyvoláno.

- **Enterotoxigenní ETEC**

Tyto typy enteropatogenních kmenů mohou produkovat dva druhy enterotoxinů, a to termolabilní (TL) a termostabilní (TS). Kolonizují tenké střevo pomocí kolonizačních faktorů, to jsou druhově specifické proteinové fibrie. Vyvolávají průjmy u dětí i dospělých nejčastěji v Mexiku a v Egyptě. Jsou to tzv. cestovatelské průjmy, proto se mohou objevit i ve střední Evropě.

- **Enteroinvazivní EIEC**

Pronikají do buněk, kde se množí. Onemocnění probíhá pod obrazem bacilární dysentérie (Bednář et al., 1996). Onemocnění doprovázejí horečky. Nejčastěji se šíří kontaminovanou potravou a vodou. Má podobné molekulární znaky jako *Shigella spp.* Osidlují a poškozují sliznice tlustého střeva (PathologyOutlines, 2017).

- **Enterohemoragické EHEC**

EHEC sérotyp O157: H7 je lidský patogen zodpovědný za krvavé průjmy, kdy tato nákaza může přejít až do hemolyticko-uremického syndromu (HUS). Vyskytuje se po celém světě. Antibiotická léčba podporuje uvolňování silného Shiga toxinu, který je zodpovědný za velkou část morbiditu a mortality spojené s infekcí EHEC. Hovězí dobytek je přírodním rezervoárem EHEC a přibližně 75% vypuknutí epidemie EHEC je spojeno se spotřebou kontaminovaných produktů z hovězího dobytka. *Escherichia coli* produkující verocytotoxin (VTEC), také známá jako *bakterie E. coli* produkující Shiga-toxin (STEC), způsobuje zoonózy, které jsou spojeny s potravinami, a vypuknutím epidemie na celém světě, což představuje vážné riziko. Více než 380 různých sérotypů VTEC bylo izolováno od lidí a zvířat, ale jen malý počet sérotypů je spojen s lidským onemocněním. Sérotyp O157: H7 je významným zdrojem *E. coli*. Charakteristiky infekce *E. coli* sérotypu O157: H7 (EHEC) zahrnují abdominální křeče a krvavý průjem, stejně jako život ohrožující komplikaci hemolyticko-uremický syndrom (HUS). (Nguyen Y, Sperandio Vanessa, 2012)

- **Příznaky EHEC nákazy**

Průjem vodnatý až po krvavý. Bolesti břicha a křeče. Nevolnost a zvracení pouze u některých lidí. Symptomy začínají po 3-4 dnech po infikování bakterií.

- **Rizikové potraviny**

Hovězí maso. Když je dobytek poražen a následně zpracováván, bakterie *E. coli* ve střevech se mohou dostat na maso.

Nepasterizované mléko. Bakterie *E. coli* se může vyskytovat na vemenu krávy a při dojení se mohou dostat *E.coli* do syrového mléka.

Čerstvé produkty. Při hnojení se výkaly může kontaminovat pole, kde se pěstuje obilí, zelenina či ovoce. Některá zelenina, jako je špenát a hlávkový salát, jsou obzvláště citlivá na tento typ kontaminace.

- **Kontaminovaná voda**

Lidské a zvířecí výkaly mohou znečišťovat povrchovou vodu, včetně potoků, řek, jezer a vody používané k zavlažování plodin. Přestože veřejné vodní systémy používají chlor, ultrafialové světlo nebo ozon k usmrcení *E. coli*, některá ohniska byla spojena s kontaminovaným městským zásobováním vodou.

Soukromé studny jsou důvodem k obavám, protože často nemají dezinfekční systém. Zdroje venkovské vody jsou nejčastěji kontaminované. Někteří lidé byli také infikováni po koupání v bazénech nebo jezerech kontaminovaných výkaly.

- **Osobní kontakt**

Bakterie *E. coli* mohou snadno cestovat z člověka na člověka, zvláště když si dospělí a děti nemyjí správně ruce. Vysoká pravděpodobnost nákazy je u rodinných příslušníků malých dětí, které jsou nakaženi *E. coli*, u nich je obzvláště pravděpodobné, že je sami nakazí infekcí způsobenou *E.coli*. Nákaza se objevila také u dětí, které navštívili zoologické zahrady. (Mayo clinic, 2018)

1.7 Onemocnění

- **Močové infekce**

Nejčastější průnik bakterií do močového ústrojí je ascendentní cestou z rezervoáru střevních bakterií. Infekce začíná kolonizací poševního vchodu či předkožkového vaku, dále následuje průnik přes močovou trubici, kde dochází k usídlení. Vzácně se mohou usídlit až v ledvinách.

Původcem infekce močových cest může být endogenní mikroflóra – vlastní nebo exogenní – cizí mikroflóra, viz tabulka 1 (Maďar et al., 2006).

Hlavním znakem močové infekce je bakteriurie (10^5 bakterií/ml a více) spojená s klinickými příznaky. Projevy močových infekcí jsou uretritida, cystitida, pyelonefritida a prostatitida (Schindler, 2014).

- **Pyelonefritida**

Pyelonefritida je zánět ledvin, kdy původcem jsou bakterie. Při horším odvádění moči dochází k jejímu hromadění. Pokud se moč hromadí, stává se vhodnou živnou půdou pro bakterie. Infekce, která začala v močových cestách, se může vzestupnou cestou dostat až do ledvin. Projevy: horečka, schvácenost, únava, časté močení doprovázené pálením a bolestí, zimnice a při neléčené formě může dojít až k sepsi. (Štefánek, 2011)

- **Prostatitida**

Nejčastějším onemocněním u mužů je prostatitida, kterou trpí přibližně 25% mužů. Existuje několik forem prostatitidy: akutní a chronická (příznaky trvají déle než 3 měsíce). Močový patogen se objevuje v 5-10% všech případů. (Poršová et al, 2006)

Tabulka 1 Původci močových infekcí

Původce	%	Specifická situace
<i>Escherichia coli</i>	50	Nejčastější původce infekcí komunitních i nozokomiálních
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	Nozokomiální
<i>Proteus mirabilis</i>	8	Častý při litiáze
<i>Enterococcus faecalis/faecium</i>	8	Často při chronické pyelitidě
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	5	U mladých žen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	Chronické infekce
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	Nozokomiální infekce, katétr
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	Katétr

Zdroj: Schindler, 2014

2 Antibiotika

2.1 Historie

První myšlenkou pro selektivní antibakteriální účinek dostal chemik a lékař Paul Ehrlich (1854-1915). Do té doby se používaly medikamenty často toxické a nebezpečné, které byly málo účinné a neselektivní. Základem byly sloučeniny síry, rtuti nebo arzenu. Ehrlich přemýšlel o látce, která by mohla zabíjet patogeny v lidském těle bez ohrožení pacienta. Po několikaletém zkoumání různých sloučenin arzenu objevil spolu s S. Hatou arsfenamin k léčbě syfilidy. Arsfenamin (Salvarsan) byl prvním antibakteriálním lékem. Později německý lékař Gerhard Domagda do léčebné praxe přidal ještě účinnější přípravky – sulfonamidy.

Mezitím od konce 19. století bylo několika mikrobiology zaznamenáno inhibiční působení mikroorganismů proti patogenním mikroorganismům. Ale až v roce 1940 po objevu Alexandra Fleminga se několika vědcům podařilo připravit z mikrobiálních kultur lék – penicilin. To dalo vzniknout, dalším podobně působícím substitucím, kterým se začalo hromadně říkat antibiotika.

Název antibiotika zavedl americký mikrobiolog Selman Abraham Waksman. První antibiotika byla mnohonásobně silnější než sulfonamidy, proto z toho vyplynulo, aby se antibiotika rozdělila na chemické antibakteriální produkty – chemoterapeutika a přírodní antibakteriální produkty – antibiotika. Toto rozdělení bylo využíváno do 70. let minulého století, později se od něj začalo upouštět (Beneš, 2018)

2.2 Charakteristika antibiotik

Jsou to látky využívané pro léčbu nebo k prevenci infekčních onemocnění. Původně jsou to produkty plísní. V dnešní době se antibiotika (dále jen „ATB“) připravují chemickou syntézou nebo chemickou modifikací původních ATB (Hynie, 2003). ATB nejsou vůbec účinná při léčbě virových infekcí, často jsou to infekce dýchacích cest, hrtanu, průdušek apod. Léčba antibiotiky by měla začít až po zjištění původce onemocnění. Je nutno brát antibiotika až do konce léčby. Její předčasné ukončení může vést k opětovné infekci, která může dojít až k antibiotické rezistenci (Sandoz, 2018). ATB by nemělo poškozovat eukaryotické buňky a účinek na ně musí být zanedbatelný, nebo žádný.

Musí účinkovat v nízkých koncentracích (řádově v mg/l) tak, aby těchto hladin dosahovalo v přiměřeně krátké době. Existuje přibližně 150 druhů ATB, mající mají různé chemické povahy. ATB se třídí do skupin, kde je název skupiny odvozen od povahy ATB (Schindler, 2014).

2.3 Rozdělení antibiotik

- **Podle spektra účinnosti**

Podle množství druhů citlivých bakterií rozlišujeme ATB s úzkým, středně širokým a širokým spektrem účinku. ATB s úzkým spektrem účinku působí pouze na malé množství bakterií. Jako příklad středně širokospektrého ATB můžeme uvést penicilín. Ten je účinný na grampozitivní (G+) bakterie, ale na většinu gramnegativních (G-) bakterií je neúčinný. Širokospektrá ATB jsou obvykle účinná na G+ i G- bakterie (Votava, 2010).

- **Podle intenzity účinku**

Primárně rozlišujeme ATB na cytostatická a baktericidní. Mezi oběma druhy jsou velké rozdíly. Bakteriostatická ATB účinkují ve vysokých koncentracích bakteriocidně. Bakteriocidní ATB působí bakteriocidně i v malých koncentracích (Hynie, 2001). Bakteriostatické látky působí na množení bakterií už po 3–4 dnech od zahájení léčby. Tento účinek je reverzibilní a netrvá příliš dlouho, proto předčasné ukončení léčby vede k relapsu. Jde například o tetracykliny nebo sulfoamidy. Baktericidní látky působí mnohem rychleji – již po 48 hodinách lze vidět efekt v usmrcování bakterií. Tyto ATB se využívají při těžkých infekcích, u pacientů s poruchou imunity a u nedonošených dětí. Příkladem mohou být beta – laktamy nebo aminoglykosidy (Votava, 2010).

- **Podle místa a mechanismu účinku**

Jednou z dalších klasifikací ATB je podle toho, jak působí na bakterii. Mohou působit na buněčnou stěnu tím, že ji inhibují. Často to dělají beta-laktamová ATB, např. penicilíny a cefalosporiny. Navážou se na specifická vazebná místa, tím inhibují transpeptidázy, které jsou nutné k tvorbě bakteriální buněčné stěny. Při růstu vznikají buňky s deficitní buněčnou stěnou, jež nejsou schopné odolat osmotickému tlaku. Takto obnažené buňky jsou likvidovány hostitelskými buňkami nebo dochází k jejich lýze.

Tento mechanismus je účinný pouze v době růstu mikroorganismu. Mají bakteriocidní účinek.

Další mechanismus je narušení cytoplazmatické membrány. Tato ATB mají lipofilní a lyofobní skupiny umožňující vstup do cytoplazmatických membrán mikroorganismů. Naruší tím permeabilitu membrán a tím dojde k poruše iontové rovnováhy, která vede k zániku buňky. Jiný mechanismus je inhibice proteosyntézy. ATB obsahují látky, které narušují syntézu buněčných proteinů. Působí převážně bakteriostaticky. Příkladem těchto ATB jsou například aminoglykosidy a tetracykliny (Hynie, 2001).

- **Podle chemické struktury**

- **Beta – laktamová ATB**

Beta-laktamová antibiotika patří mezi nejznámější a nejvíce využívaná ATB. Dělí se do 5 skupin: peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktamy a inhibitory beta-laktamáz. Jednotlivá beta-laktamová ATB mají různou afinitu k PBP. Obecně platí, že karbapenemy inaktivují enzymy PBP4 a PBP3 a peniciliny působí na enzymy PBP1, PBP2, PBP3. Účinek beta-laktamových ATB závisí na době, po kterou je koncentrace ATB nad úroveň MIC. Zvyšování koncentrace ATB účinek nezvyšuje. Často tyto ATB mohou vyvolat krátký postantibiotický efekt ale pouze u G+ bakterií. Ve spektru účinku se beta-laktamová antibiotika liší a nelze je obecně charakterizovat. Beta-laktamová ATB velice špatně pronikají přes buněčné bariéry. Mají hydrofilní charakter. Biologický poločas se odhaduje kolem 30 minut až 8 hodin. Hodí se nejvíce k léčbě akutních a přitom závažných infekcí. Lze je použít pro všechny skupiny od gravidních žen až po novorozence a seniory. Jsou málo účinná u chronických infekcí a kožních infekcí, což je způsobeno omezeným průnikem. (Beneš, 2018)

- **Peniciliny**

Hlavní strukturou penicilinu je kyselina 6-aminopenicilanová. K této kyselině jsou u přirozených i polysyntetických penicilinů připojeny různé postranní řetězce a skupiny, které mají vliv na vlastnosti a účinky jednotlivých penicilinových ATB. Peniciliny jsou nejdéle používanými ATB. Jejich významnou předností je jejich bakteriocidní působení a malá obecná toxicita podmíněná selektivním ovlivněním cílových struktur nacházejících se u hostitele. Tím se umožňuje podání penicilinu i těhotným ženám (Hynie Sixtus, 2001). Důležití zástupci proti *Escherichia coli* jsou ampicilin a

amoxicilin. Patří do skupiny aminopenicilinů. Ampicilin je často používané ATB, ale pouze ve zdravotnických zařízeních, protože nejsou k dispozici tablety. Používá se v komunitě Duomox. Obsahuje látku ampicilin. Ampicilin narušuje metabolismus buněčné stěny. Řada bakterií si vypěstovala rezistenci. Ampicilin má široké spektrum účinku, proto se používá na běžné bakteriální infekce, jako jsou například infekce močových cest. (Štefánek, 2008).

○ **Cefalosporiny**

Cefalosporiny se dělí podle antibiotických vlastností do 4 – 5 generací, kdy jsou rozděleny podle spektra účinku a odolností proti beta-laktamázám.

- **Cefalosporiny 1. generace** usmrcují grampozitivní bakterie. Neúčinné jsou k enterokokům a listeriím. Původně se sem řadili i některé gramnegativní bakterie (*E. coli*, *Proteus mirabilis*) ale s narůstající rezistencí se účinek považuje za klinicky nevýznamný.

- **Cefalosporiny 2. generace** jsou odolné k elementárním beta-laktamázám. Mohou být snadno hydrolyzovány širokospektrými beta-laktamázami.

- **Cefalosporiny 3. generace** mají větší účinek oproti cefalosporinům 2. generace na gramnegativní bakterie. Mají vysokou odolnost vůči elementárním beta-laktamázám.

2.4 Farmakokinetika cefalosporinů 3. generace

- Základní cefalosporiny 3. generace
- Protipseudomonádové cefalosporiny
- Cefalosporiny kombinované s inhibitory beta-laktamázy (např. sulbaktam)

- **Cefalosporiny 4. generace** mají nejširší spektrum účinku. Usmrcují grampozitivní (podobně jako cefalosporiny 1. generace) a gramnegativní bakterie (podobně jako cefalosporiny 3. generace). Jsou odolné k beta-laktamázám typu AmpC.

- **Cefalosporiny 5. generace** - do této skupiny se mohou zařadit cefalosporiny účinné proti MRSA. (Beneš, 2018)

Důležitým zástupcem pro naše využití je cefotaxime (cefalosporin 3. generace) a ceftadizim (cefalosporin 3. generace). Cefotaxime obsahují léčivou látku chemotaxim, která narušuje schopnost bakterií tvořit buněčnou stěnu. Tímto způsobem bakterie

rovnou zabíjí. Často se využívá u hospitalizovaných osob, které mají těžké infekce. Podává se u sepse, zánětů ledvin, zánětu močového měchýře, u gynekologických zánětů apod. (Štefánek, 2008).

- **Nitrofuránová chemoterapeutika**

Nitrofuránová chemoterapeutika jsou ideální volbou pro léčbu močových infekcí. Jsou širokospektrá a je u nich velice malá pravděpodobnost vzniku rezistence. Zkřížená rezistence mezi nitrofurany a sulfonamidy a antibiotiky nebyla pozorována. *E.coli* je rezistentní k nitrofurantoinu přibližně v 1-2 %. (Kladenský et al, 2006). Bakteriocidní přípravky jsou určeny především pro léčbu močových infekcí. Inhibují bakteriální enzymy a tím poškozují bakterie. Rezistence je velmi vzácná. Hlavním zástupcem je nitrofurantoin, který má bakteriocidní účinek. Působí především na *E.coli*, *Salmonelu spp.*, *Citrobakter spp.*, apod. (Tejkalová, 2012). Nitrofurantoin je stále citlivý na původce močových infekcí, je používán více než 50 let. Poměrně často způsobuje vedlejší účinky, jako je nauzea, anorexie (30%), přecitlivělost (Kladenská et al, 2006).

- **Aminoglykosidová ATB**

Jsou to přírodní produkty plísní, obvykle pocházející z 2 rodů:

- *Streptomyces* s koncovkou – mycin (streptomycin, neomycin, tobramycin, amikacin, kanamycin)
- *Micromonospora* s příponou – micin (gentamicin, netilmicin)
(Hera et al, 2016)

Jsou to baktericidní, širokospektrá ATB především pro G- bakterie. Inhibují syntézu bílkovin v klidovém stádiu. Na anaeroby jsou neúčinná, protože bez přítomnosti kyslíku nemohou pronikat do buněk. Používají se u závažných infekcí. Mají toxické účinky závislé na plazmatické hladině látek a způsobují především neurotoxicitu, nefrotoxicitu a ototoxicitu (Hynie Sixtus, 2003).

Aminoglykosidová ATB jsou postupně nahrazována jinými ATB, která nejsou tak toxická (beta-laktamová). Ale jelikož se začala objevovat rezistence a multirezistence na nová ATB, aminoglykosidová ATB se opět postupně začala užívat i přes svoji toxicitu.

Pokud se rozvine rezistence tak je způsobena několika kroky např.:

- 1) inaktivací specifickými bakteriálními enzymy
- 2) snížením vstupu aminoglykosidu do buňky bakterie aktivním efluxem nebo v důsledku poškození bakteriální membrány. V obou případech se současně vyskytuje rezistence i k jiným ATB. (Hera et al, 2016)

Často používaným aminoglykosidovým ATB je např. gentamicin. Gentamicin obsahuje účinnou látku gentamicin, který má schopnost narušovat syntézu bílkovin a narušuje buněčnou stěnu. Bakterie přímo zabíjí nebo zabraňuje jejich množení. Používá se při sepsi v kombinaci s jinými ATB. (Štefánek, 2008).

2.5 Nežádoucí účinky antibiotik

- **Toxické reakce**

Toxické účinky se mohou projevovat lokální bolestí, tromboflexibilitou, svalovou dráždivostí, neurotoxicitou (hematurie, proteinurie, nekróza ledvinových tubulů až selhání ledvin) nebo potížemi gastrointersticiálního traktu, dále hematotoxicitou a hepatotoxicitou. Některá ATB mohou mít ototoxické účinky (Marek et al., 2010).

- **Potlačení normální mikroflóry**

Antibiotika často způsobují průjmové onemocnění. Je to tím, že spolu s patogeny je vymýcená i přirozená střevní mikroflóra (mikrobiom). Střevní mikroflóra je tvořena bakteriemi, které nám neškodí, naopak jsou potřebné pro správné trávení a k výrobě organických látek jako je například vitamin K. Nejhorší na tomto nežádoucím účinku jsou komplikace jako například dehydratace a vyčerpání. Často tento problém lze vyřešit probiotiky a doplněním tekutin. (Šafař, 2011)

- **Imunosupresivní účinek**

ATB mohou zasahovat do tvorby proteinů a tím do syntézy imunoglobulinů. U nemocného pacienta se snižuje obranyschopnost a tím je vyšší náchylnost k infekci.

- **Imunotoleranční nežádoucí účinky**

Projevují se jako alergie. Alergická reakce se může rozvinout až v anafylaktický šok, kdy je pacient ohrožen na životě. Rychlé reakce se projeví do 24 hodin. Pozdní reakce se projeví jako sérové onemocnění. Mohou to být kožní nemoci, orgánové léze apod. Nejčastěji se objevují po penicilinových ATB (Lochmanová et al., 2004).

3 Rezistence bakterií na antibiotika

Rezistence na ATB znamená, že bakterie je schopna přežít v přítomnosti antibiotika a zůstává jí schopnost se množit. Rezistenci dělíme na primární (vrozenou) a sekundární (získanou). Příčinou rezistence je především masivní podávání antibiotik, dlouhodobá a necílená léčba. Z tohoto důvodu se, proto z dříve citlivých bakterií stávají rezistentní bakterie. Primární rezistence na antibiotikum je přirozená odolnost ve spektru působení daného ATB.

V poslední době se rezistence velmi rychle rozšiřuje i přes to, že vznikají nová antibiotika. Bakterie jsou schopny vytvořit si rezistenci na každou novou látku. Toto je způsobeno selekčním tlakem prostředí a vývojem genomu bakterií. (Holubová Adéla, 2017)

3.1 Zkřížená rezistence

Zkřížená rezistence je necitlivost na antibiotika, nejčastěji ze stejné skupiny ATB, která mají podobnou chemickou strukturu a mechanismus účinku. (Martínková Jiřina, 2007). Často je to způsobeno chromozomální mutací, která vznikne v jedné buňce a ta syntetizuje protein. Může to být způsobeno i četnějšími mutacemi např. PBP protein vázající peniciliny. (Holubová Adéla, 2017).

3.2 Mechanismy obrany bakterií před ATB

Mechanismy, kterými se bakterie brání proti ATB, se dají rozdělit do 4 skupin:

- **Nepřítomnost cílové struktury**

Cílová struktura může chybět účinkem mutací v genu a tím dochází k přeměně cílové skupiny. Změněná cílová skupina si zanechá potřebné buněčné funkce ale je nepřístupná pro antibiotickou inhibici. Dále může dojít k přenosu genu, který vytváří náhradní enzym a tím je lék méně účinný.

- **Změna v propustnosti membrán**

Především gram negativní bakterie jsou schopné ovlivňovat příjem malých molekul přes membránu. Membrána gram negativních tyčků je tvořena dvojitou vrstvou fosfolipidů, proteiny a polysacharidy, čímž jsou odolné proti antibiotikům.

Transportní proteiny tzv. poriny tvoří vodou naplněné kanálky, které umožňují vstup hydrofilních rozpuštěných látek. Některá ATB s menší molekulou jako např. beta-laktamová využívají tuto cestu pro vstup do bakterie. Bakteriální rezistence je v tomto případě způsobená ztrátou funkčnosti porinů.

- **Enzymatická inaktivace**

Bakterie produkující beta-laktamázu jsou nejznámějším příkladem tohoto mechanismu. Účinek beta-laktamázy na beta-laktamová ATB spočívá v tom, že beta-laktamázy naruší amidové vazby na beta-laktamovém kruhu, a tím dochází k inaktivaci ATB.

- **Vylučování ATB z bakterie**

Tento způsob je známý jak u G⁺ tak G⁻ bakterií. Jsou využívány membránové transportní proteiny, které slouží k vylučování toxických či cizorodých látek. Tento způsob obrany bakterií před ATB je často spojován s multirezistencí. (Chromá a Kolář, 2010)

3.3 *Další způsoby inaktivace ATB*

- **Zábrana aktivace ATB**

Tento způsob inaktivace se vyskytuje u ATB, která jsou přijímána formou prodrug a aktivují se pomocí enzymů bakterií. Bakterie mohou snížit tvorbu enzymu, který aktivuje ATB. Důsledkem mutací si mohou bakterie vytvořit neúčinný enzym. ATB zůstane neaktivováno, a tedy neohrožuje populaci.

- **Náhrada zablokované metabolické dráhy**

Když ATB bakteriím zablokuje důležitou metabolickou dráhu, u bakterií se může vytvořit náhradní metabolická dráha, která zajistí metabolický pochod. Většinou, většinou je méně účinná, ale postačí k přežití.

- **Vytvoření cílových míst v nadbytku**

Jestliže ATB napadá nějaký enzym, bakterie je schopna tento enzym tvořit v nadbytku. Je to málo výhodné pro bakterii (energeticky náročné) ale může přežít.

Zvýšená tvorba enzymu je zabezpečena mutací genu regulace. Dalším způsobem obrany vytvoření cílových míst v nadbytku jsou mimikry (Beneš, 2018)

3.4 Přenos rezistence

Přenos rezistence je zprostředkován tzv. plazmidem, kdy plazmid přenáší mutované geny. Plazmidy se nachází v buňkách ve velkém množství (kopie). Pokud se plazmidy přenášejí, v rámci jedné generace, jedná se o tzv. horizontální přenos. Mezi horizontální přenos můžeme zařadit přenosy bakteriofágu (transdukci) nebo DNA (transformaci) ale tyto přenosy se objevují velmi málo.

Dalším druhem přenosu je přenos vertikální. Vertikální přenos znamená, že rezistence se přenáší na další generaci (potomstvo). Způsobeno je hlavně používáním ATB na citlivé bakterie, kdy rezistentní se množí. Pro šíření rezistence je zapotřebí několika faktorů: rychlost množení, četnost a velikost kolonie, mutační citlivost, možnost přenášet chromozomy, hlavně plazmidy, apod. R-plazmidy jsou plazmidy, které nesou geny rezistence, množí se uvnitř bakterie a jsou schopné řetězově infikovat další buňky.

3.5 Beta-laktamázy

Od počátku 60. let 20. století byla zaznamenána první zmínka o beta-laktamázách mezi enterobakteriemi. Jednalo se o tzv. beta-laktamázy typu A (TEM, SHV). To byl počátek antibiotické rezistence, která se začala šířit mezi bakteriemi. První širokospektrá beta-laktamáza byla popsána v roce 1985. Dnes už nestíháme kompenzovat narůstající rezistenci a vývoj nových beta-laktamů. Beta-laktamy jsou nejčastější příčinou vzniku rezistence k penicilinům penicilinu a cefalosporinům. Jsou to enzymy štěpící amidové vazby v beta-laktamovém kruhu, což činí antibiotikum inaktivované.

Existují 4 druhy beta-laktamáz (A, B, C, D). Nejčastěji pozorované jsou beta-laktamázy třídy A, které jsou TEM, SHV a enzymy CTX-M rozšířeného spektra beta-laktamázy (ESBL). Nejvíce se spojují s infekcemi močového ústrojí a při sepsi. Především enzymy CTX-M mají zvýšenou hydrolytickou aktivitu k penicilinům a cefalosporinům 3. generace. (Tomanicek et al, 2011).

U Enterobacteriaceae je tvorba beta-laktamáz hlavním mechanismem rezistence. Nejčastěji se u nich vyskytují enzymy TEM-1 a SHV-1. Jsou citlivé k inhibitorům např. kyselina klavulanová. (Robin et al, 2007)

- **Třída A**

Vyskytuje se nejčastěji. V rámci této třídy bylo popsáno nejvíce beta-laktamáz. Patří sem beta-laktamázy enterobakterií, hemofilů, neisserií a dalších G- bakterií. Původ enzymu není znám ale předpokládá se, že nepochází z jediného zdroje. Tyto enzymy hydrolyzují především penicilin G a penicilinová ATB mimo oxacilinu a příbuzným přípravkům. Některé enzymy štěpí cefalosporiny 1. generace. Enzymy jsou obsaženy v plazmidech a tím se snadněji přenáší na další klony. U třídy A se nejčastěji vyskytuje beta-laktamáza TEM-1, která způsobuje rezistenci k ampicilinu u většiny druhů *E.coli*. Nyní je popsáno 140 TEM-laktamáz. U SHV bylo objeveno přes 60 modifikací.

Po zavedení cefalosporinů 2. a 3. generace se bakterie přizpůsobili pomocí mutací a proměnili své centrum beta-laktamáz. Díky tomu vznikli bakterie s rozšířeným spektrem beta-laktamáz (ESBL). Některé širokospektré beta-laktamázy vznikli pomocí nepatogenních bakterií vyskytujících se v prostředí. Například beta-laktamáza CTX-M, která se rozšířila po celé Evropě pomocí bakterií rodu *Kluyvera*.

- **Třída B**

Obsahuje málo metalo-beta-laktamázy. To jsou takové, které ve svém centru obsahují 1 - 2 atomy zinku, které slouží jako katalyzátor. Tyto enzymy jsou fylogeneticky staré. Jsou obsaženy v bakteriích, které jsou málo patogenní (*Aeromonas spp.*). Kódující geny mohou být převedeny do genomu enterobakterií včetně *E.coli* a způsobovat rezistenci. Dokáží tedy štěpit peniciliny, cefalosporiny i karbapenemy. Mezi jejich inhibitory patří kyselina klavulanová, sulbaktam a tazobaktam.

- **Třída C**

Zastoupení je poměrně časté. Patří sem serinové beta-laktamázy, jejichž primárním substrátem jsou cefalosporiny. Často se vyskytují u *Enterobacteriaceae spp.*, *Citrobacter spp.*, apod. Geny řídící jejich syntézu se nachází v bakteriálním chromozomu (neaktivní). Aktivní začnou být, pokud buněčné receptory zaznamenají nějaký druh beta-laktamu v okolí. (Beneš, 2018)

○ **Třída D**

Beta-laktamázy této třídy se zakládají převážně na schopnosti enzymů hydrolyzovat oxacilin. Bakterie produkující beta-laktamázy této třídy jsou rezistentní k aminopenicilinům. Jsou slabě inhibovány kyselinou klavulanovou nebo sulfony (tazobaktamem a sulbaktamem). Karbapenemy jsou k jejich účinku stabilní (Mascaretti, 2003).

• **AmpC beta-laktamázy**

AmpC beta-laktamázy jsou klinicky významné cefalosporinázy kódované na chromozómech mnoha *Enterobacteriaceae*, kde zprostředkovávají rezistenci na cefalotin, cefazolin, cefoxitin a většinu penicilinů. U mnoha bakterií jsou enzymy AmpC indukovatelné a mohou být výrazně exprimovány mutací. Nadměrná exprese poskytuje rezistenci k širokospektrálním cefalosporinům včetně cefotaximu, ceftazidimu a ceftriaxonu a je problémem zejména u infekcí vyvolaných *Enterobacter aerogenes* a *Enterobacter cloacae*, kde izolát může být zpočátku náchylný ale při terapii rezistentní. Přenosné plazmidy získaly geny pro enzymy AmpC, které se proto mohou objevit u bakterií, které postrádají nebo mají porušený chromozomální *bla* (AmpC) gen, jako jsou *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Proteus mirabilis*. Odolnost způsobená plazmidem zprostředkovanými enzymy AmpC je méně častá než produkce beta-laktamáz s rozšířeným spektrem (ESBL) ve většině částí světa, ale může být obtížnější jí detekovat. Enzymy AmpC kódované jak chromozomálními, tak plazmidovými geny se vyvíjejí tak, aby účinněji hydrolyzovaly široké spektrum cefalosporinů. Karbapenemy mohou být obvykle použity k léčbě infekcí způsobených bakteriemi produkujícími AmpC (Jacoby, 2009)

3.6 Multirezistence

Multirezistentní organismy (MDRO) jsou takové, které jsou rezistentní na více než jedno antibiotikum. Infekce vyvolaná těmito organismy může vést ke stanovení špatné léčby a tím podporování rezistence na antibiotika. Do této skupiny patří především G- bakterie. Většina MDRO je rezistentní ke 2 až 3 druhům ATB. Často vzniká zkřížená rezistence na více druhů ATB. Problém je s léčbou a detekcí MDRO v mikrobiologických laboratořích. (Magiorakos et al, 2012)

3.7 *Surveillance a monitorování rezistence*

Na celém světě existují zařízení, která sledují rezistenci bakterií vůči antibiotikům. V České republice to sleduje NRL (Národní referenční laboratoř) u invazivních kmenů. Surveillance se zabývá sběrem dat, analýzou a sdělováním dat lékařům. Hlavním cílem je poukázat na výskyt neobvyklých rezistencí u mikroorganismů. Rezistenci v rámci nemocnice sleduje epidemiologický ústav ve spolupráci s mikrobiologickou laboratoří nebo s ATB střediskem, pokud ho laboratoř má. Mezinárodní dozor má význam především epidemiologický. Pro Evropu stav rezistence monitoruje Evropská síť rezistence EARSS. Monitorují a zpracovávají data a jednou ročně uveřejňují výsledky. Sledují vybrané mikroorganismy, mezi nimiž jsou *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterococcus spp.* apod. Lokální dozor je důležitý především pro empirickou léčbu. Intenzivně se tím zabývá WHO (Schindler, 2014).

4 Cíle

Cílem mé práce je nashromáždit informace o rezistenci *Escherichia coli*, porovnat rozdíly mezi dospělými a dětskými pacienty a zjistit míru multirezistentních kmenů (ESBL) v okrese Písek v roce 2016.

5 Metodika

Data mám nashromážděna za rok 2016 z laboratoře klinické mikrobiologie Nemocnice Písek, a.s., a následně jsem je statisticky zpracovala. Prakticky jsem si vyzkoušela určení bakterie a její zařazení. Stanovení citlivosti na ATB a průkaz ESBL kmenů.

5.1 Kultivace

Kultivací je míněno pěstování bakterií in vitro. Bakterie pěstujeme na kultivačních médiích za uměle vytvořených podmínek. Pro úspěšnou kultivaci je třeba dodržet několik zásadních podmínek:

- **Živiny**

Dnes se používají výhradně umělé půdy, které obsahují veškeré živiny potřebné pro optimální růst bakterií. Základem všech kultivačních půd je masopeptonový bujon, který je sám základní tekutou půdou vhodnou pro pomnožování bakterií.

- **Voda (vlhkost)**

Je důležitá pro příjem živin.

- **pH**

Ideální pH se pohybuje kolem 7-7,2. Ale nalezneme bakterie např. laktobacily, kteří potřebují pH 3 nebo *Vibio cholerae*, který se kultivuje při pH 8.

- **Izotonie prostředí**

- **Teplota**

Většina bakterií včetně *E.coli* se kultivuje při 37°C. Existují výjimky, které se kultivují při vyšších teplotách. Nejznámější lékařky významná bakterie je *Campylobacter jejuni*, která se kultivuje při 42°C.

- **Atmosféra**

U atmosféry záleží na vztahu bakterie ke kyslíku. Existují druhy aerobní, anaerobní, striktně či fakultativně, a další (Marková, 2008)

5.2 *Kultivační půdy*

- **Mueller – Hinton agar (MHA)**

Jedná se o kultivační půdu vhodnou pro stanovení citlivosti na ATB. Je to neselektivní, nediferenciální medium. Obsahuje škrob, který je známý tím, že absorbuje toxiny, takže nemohou interferovat ATB. Umožňuje lepší fúzi ATB a ta umožňuje vytvoření inhibiční zóny. Má nízký obsah inhibitorů - sulfonamid, tetracykliny (Aryal, 2015).

- **Endova půda**

Patří mezi selektivně-diagnostické půdy. Je světle růžové barvy. Půda je citlivá na světlo. Selektivní složku tvoří bazický fuchsin, který umožňuje růst pouze G- bakteriím. Pro diagnostiku obsahuje půda Schiffovo činidlo. Můžeme tak rozlišovat bakterie laktóza pozitivní (či laktózu štěpící), které na ENDU rostou v podobě tmavě růžových kolonií, a laktóza negativní bakterie, kdy kolonie jsou světle růžové (Marková, 2008).

- **Krevní agar Columbia (KA)**

Tmavě červené kultivační médium obsahuje 5 % beraní krve. Používá se na všechny typy vzorků. Slouží, slouží k primokultivaci nebo subkultivaci a je vhodný pro všechny druhy vzorků. Živiny obsažené v KA jsou především peptony. KA obsahuje mj. i škrob (1g/l), chlorid sodný (5g/l), agar (10g/l). pH KA se pohybuje kolem 7,3. Naočkovaná půda se inkubuje 18-72 hodin, při 37°C (BioVendor, 2013). Dalším důležitým znakem KA je, že můžeme zkoumat morfologii kolonií, jež mohou být: mazlavé – hlenovité, drsné (suché), hladké a vrostlé do agaru. Pro diagnostiku pozorujeme typický jev pro KA, a to hemolýzu (viz příloha Obrázek 2).

- Alfa hemolýza = viridace se - tvoří meziprodukty a agar se okolo kolonií barví zelenohnědě.
- Beta hemolýza - úplná hemolýza, kdy se v okolí kolonií agar projasňuje
- Gama hemolýza - bez změny (Smíšek, 2008).

- **CHROMagar**

Hlavním cílem je snazší odlišení močových patogenů. Každý patogen má svou specifickou barvu, proto je hlavně při smíšené kultivaci snazší diagnostika (Chromagar, 2009).

URI select je neselektivní agarové médium pro izolaci, diferenciaci a výčet patogenů močových cest. Umožňuje diferenciaci a identifikaci *E. coli* (viz příloha Obrázek 3), *Enterococcus spp.*, *Proteus spp.*, a předpokládanou identifikaci některých dalších močových patogenů, zejména ze skupiny *Enterobakteria* (Klebsiella, Citrobakter apod.) (BIO – RAD, 2018).

CHROMagar™ ESBL

Je speciální agar, který složí k rychlému screeningu G- bakterií produkujících ESBL. Tento agar podporuje růst bakterií produkujících ESBL a ostatní bakterie jsou potlačeny v růstu. CHROMagar ESBL má vysokou specifitu a citlivost (Chromagar, 2009).

Kultivace *E. coli*: *E. coli* je G- střevní tyčka. Není náročná na kultivaci. Na KA roste v pravidelných koloniích bělavé barvy. Inkubuje se 24 hodin při teplotě 37°C. za přítomnosti vzduchu. Na Endově půdě roste v drobných tmavě růžových koloniích, což nám ukazuje, že *E. coli* štěpí laktózu. Pokud se jedná o *E. coli* z jiného materiálu využíváme biochemický klín.

5.3 *Biochemické testy*

Po kultivaci je důležité bližší určení mikroba. V dnešní době existuje mnoho testů založených na biochemických reakcích mikrobů. Zařazení mikroba a určení kmene je velice důležité pro další postupy, např. pro správnou léčbu antibiotiky, nebo zda je v moči přítomen stejný kmen.

5.3.1 ENTERO test 24 N

Princip a použití

Sada ENTERO test 24 N se používá k rutinní identifikaci střevních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*, vibrií a aeromonád. Strip je složený ze zkumavek obsahujících lyofilizované substráty, které se po naočkování bakteriálních suspenzí ustálí. Během inkubace dochází ke změnám ve zbarvení buď spontánně, nebo vyvolané po přidání reagensie (viz příloha Obrázek 4). Reakce se vyhodnotí v počítačovém programu.

Pracovní postup

1. Ve sterilní zkumavce si připravíme bakteriální suspenzi o hustotě 1 McF, 3 ml fyziologického roztoku a testovaný kmen po 24hodinové kultivaci. Dobře homogenizujeme pomocí Vortexu a zákal upravíme pomocí Denzitometru (viz příloha Obrázek 5).
2. Připravíme si destičku ENTERO test 24 N, odřízneme 1 strip (3 řady), sejmemo folii, umístíme do rámečku a popíšeme číslem vzorku. Zbytek destičky se dá zpět do lednice ve skladovacím sáčku.
3. Inokulujeme 0,1 ml suspenze do všech jamek.
4. Do jamek H – D první řady přidáme 2 kapky parafínového oleje.
5. Inkubace: naočkovaný strip vložíme do sáčku, konec sáčku založíme, aby nedocházelo k vysoušení inokula. 17–24 hodin inkubujeme v termostatu při 36–38 C.
6. INDOL test pro stanovení, zda je mikroorganismus schopný přeměnit tryptofan na indol.
7. VP test – k detekci tvorby acetoinu.

Hodnocení testu

Výsledky vyhodnotí software (program TNW). Poté se dá ke kontrole lékaři (viz příloha Obrázek 6) (Příbalový leták k sadě ENTERO test 24N).

5.3.2 INDOL test

Princip a použití

Souprava INDOL test je určena pro rychlé stanovení indolové reakce jako snížení produktu bakteriálního metabolismu tryptofanu. Je určen pro rychlé, předpokládané stanovení kmenů *E. coli*, screeningového rozlišení indol pozitivních a indol negativních bakteriálních rodů a je rovněž nezbytným dodatkovým testem některých identifikačních souprav.

Pracovní postup

1. Použijeme 24hodinovou čistou kulturu testovaného kmene z vhodné kultivační půdy (KA).
2. Na filtrační papír kápneme 1 kapku roztoku INDOL test tak, aby byl navlhčený.
3. Očkovací kličkou nabereme několik kolonií testované kultury a oťreme o zónu kapky.
4. Inkubujeme 2–5 minut při teplotě laboratoře.
5. Zhodnotíme barevnou reakci přímo na zóně proužku (případně porovnáme s kontrolou *E. coli*) (viz příloha Obrázek 7).

Hodnocení testu

Pozitivní výsledek (+) - modrozelené zbarvení.

Negativní výsledek (-) - pokud se vůbec zbarví, tak do růžova až červena (Příbalový leták k sadě INDOL test).

5.3.3 VP test (*Voges – Proskauereův test*)

Princip a použití

Substrátem pro tvorbu acetoinu je pyruvát sodný obsažený v zóně proužku. Proužek VP testu se vloží do suspenze testovaného kmene ve fyziologickém roztoku a inkubuje se v termostatu. Po uplynutí inkubační doby suspenzi i s proužkem zakápneme činidlem VP I α – naftol a VP II - alkalické prostředí (viz příloha Obrázek 8) v případě tvorby acetoinu vznikne červené zabarvení. VP test je určen pro rychlou detekci produkce acetoinu, slouží jako dodatkový test k identifikačním soupravám MIKRO – LA- TEST a lze jej použít jako test individuální.

Pracovní postup

1. Připravíme si suspenzi z čisté kultury testovaného kmene v 1 ml fyziologického roztoku o zákalu 1 McF (pro enterobakterie).
2. Do suspenze vložíme proužek VP testu takovým způsobem, aby papírová zóna proužku byla do suspenze ponořena.
3. Inkubujeme v termostatu 4 hodiny (pro enterobakterie).
4. Po uplynutí inkubační doby přidáme 3 kapky činidla VP I a 3 kapky VP II, promícháme.
5. Inkubujeme v termostatu 30 minut.

Hodnocení

Pozitivní výsledek (+) - suspenze je červená, růžová.

Negativní výsledek (-) - suspenze je bezbarvá nebo světle růžová (Příbalový leták v sadě VP test).

5.4 Stanovení citlivosti

Cílem stanovování citlivosti na ATB je důležité pro cílenou léčbu. Metody pro stanovení citlivosti se dělí do 2 základních skupin:

- Kvalitativní metody
- Kvantitativní metody

Mezi kvalitativní metody patří diskový difuzní test. Kdy zjišťujeme IZ, což je zóna kolem antibiotického disku, kde je pozastavený růst bakterie.

U kvantitativních metod se stanovuje MIC, což je minimální inhibiční koncentrace, což je minimální koncentrace antibiotika, která je schopna zastavit viditelný růst bakterie.

Mezi tyto testy patří diluční metody. (Melter et al, 2014)

5.4.1 Diskový difuzní test

Princip a použití

Diskový difuzní test je jedna z nejstarších metod pro stanovení antibiotických citlivostí. Je to zároveň jedna z nejpoužívanějších metod, protože je vhodná pro stanovení citlivosti většiny patogenů, vč. náročných bakterií. Nevyžaduje žádné speciální vybavení (EUCAST, 2013).

Princip toho testu je jednoduchý: vyšetřovaná čistá kolonie se naočkuje po celé ploše kultivačního média (MHA). Poté se položí papírové disky obsahující antibiotika. Antibiotikum difunduje do agaru a vytváří okolo každého disku zónu s klesající koncentrací k vnějšímu okraji. Uvnitř těchto zón je potlačen růst bakterií. Okolní půda bez antibiotika je prorostlá zkoumaným kmenem. Průměr IZ slouží k posouzení citlivosti na dané antibiotikum.

Pracovní postup

1. Ve zkumavce připravíme suspenzi o hustotě 0,5 McF, z fyziologického roztoku a vyšetřované kolonie. Homogenizujeme pomocí Vortexu, zákal měříme pomocí denzitometru.
2. Ponoříme vatový tampon do suspenze a rovnoměrně rozetřeme inokulum na povrch MHA.
3. Do 15 minut poklademe antibiotické disky.
4. Vložíme do termostatu a při teplotě 37 °C necháme inkubovat do druhého dne (Janovská et al., 2015).

Hodnocení

Měříme průměry IZ v mm a srovnáváme je s referenčními hodnotami (viz příloha Obrázky 11 a 12).

5.4.2 *M. I. C. test (diluční test)*

Princip a použití

Soupravy jsou pro stanovování citlivosti k antibiotikům bakterií u čeledi *Enterobacteriaceae*, pseudomonád, jiných G- nefermentujících bakterií, stafylokoků a streptokoků na kompletní spektrum používaných antibiotik.

Principem je hodnocení minimální inhibiční koncentrace (MIC) v jamkách mikro titrační destičky, které obsahují zvolené koncentrace antibiotik. Do jamek se očkuje standardní inokulum vyšetřované bakterie. Po příslušné době inkubace se odečítá MIC jako nejnižší množství antibiotika, které inhibuje viditelný růst.

Pracovní postup

1. Připravíme si destičku MIC G-I a G-II pro tyčky (*Enterobacteriaceae*), popíšeme ji číslem vzorku. Zbylé destičky se sušidlem vložíme do skladovacího sáčku a uložíme zpět do lednice.
2. Ve zkumavce si připravíme suspenzi o hustotě 0,5 McF, cca 2 ml fyziologického roztoku a testovaný kmen z čisté kultury kultivované 24 hodin. Homogenizujeme pomocí Vortexu a zkontrolujeme zákal na denzitometru.
3. Do sterilní zkumavky se suspenzním médiem MIC přidáme 60 µl bakteriální suspenze (0,5 McF).
4. Do dávkovací vaničky vylijeme celé množství média ze zkumavky s bakteriální suspenzí, příslušnou destičku pipetujeme osmikanálovou pipetou, 100 µl roztoku do každé jamky.
5. Přikryjeme víčkem a dáme do sáčku.
6. Inkubujeme v termostatu při 37 C po dobu 20–24 hodin.
7. Po inkubaci se destička odečítá (provádí- lékař).

Hodnocení

Lékař hodnotí destičku proti černému pozadí. Jako MIC je označena jamka s nejnižší koncentrací ATB, která zamezí okem viditelnému růstu bakterií (viz příloha Obrázky 13 a 14). Výsledky se zapisují do počítače (Příbalový leták k sadě testů M. I. C. test).

5.4.3 *ESBL MAST test*

Princip a použití

Principem je využití inhibice hydrolyzy antibiotika s kyselinou klavulanovou. Pro vyhledávání podezřelých kmenů lze použít výsledky vyšetření citlivosti pomocí diskové difuzní metody, nebo hodnoty minimální inhibiční koncentrace – M. I. C. Produkce ESBL je potvrzena vyšetřením spolupráce mezi kyselinou klavulanovou a cefalosporiny čtvrté generace.

Jako indikátorové antibiotikum může být použit cefoxitin. Toto ATB velmi dobře hydrolyzuje většinu AmpC beta-laktamáz. Indicibilní produkci AmpC lze prokázat jako antagonismus mezi diskem s induktorem a cefalosporiny třetí generace. Jako inhibitor lze použít kyselinu klavulanovou, cefoxitin, resp. Imipenem.

V případě základních procesů je možné použití inhibitorů tak, jako při průkazu ESBL. Mezi důležité inhibitory AmpC patří oxacilin, kyselina boritá a její deriváty. Vzhledem k možné současné produkci ESBL je nejvýhodnější použít MH agar s oxacilinem (MHA + OXA) a srovnat průměr IZ s průměrem IZ na MH agaru bez přídavku inhibitoru. Mimo tuto metodu byly vyvinuty metody založené na inhibici AmpC kyselinou boritou.

Pracovní postup

1. Vytemperujeme kultivační médium (MHA).
2. Ve sterilní zkumavce připravíme inokulum o hustotě 0,5 McF, cca 2 ml fyziologického roztoku a testovaný kmen z čisté kultury (kultivované 24 hodin), dobře homogenizujeme ve Vortexu. Zákal upravíme pomocí denzitometru.
3. Inokulum očkujeme roztěrem nejdéle do 15 minut po jeho přípravě. Celý povrch plotny očkujeme rovnoměrně tamponem ve dvou na sebe kolmých směrech.
4. Po zaschnutí povrchu do 15 minut po naočkování inokulem na povrch agaru umístíme disky soupravy MAST DISC – ABCD (viz příloha Obrázek 9) pomocí jehly ve vzdálenosti 2 cm od sebe.

Hodnocení

Vyhodnocení provádí lékař, kdy změří. Změříme IZ v mm. Disky nevykazující žádnou IZ by měly být zaznamenány jako průměr 6 mm (viz příloha Obrázek 10) (Příbalový leták k sadě ESLB MAST test).

6 Výsledky

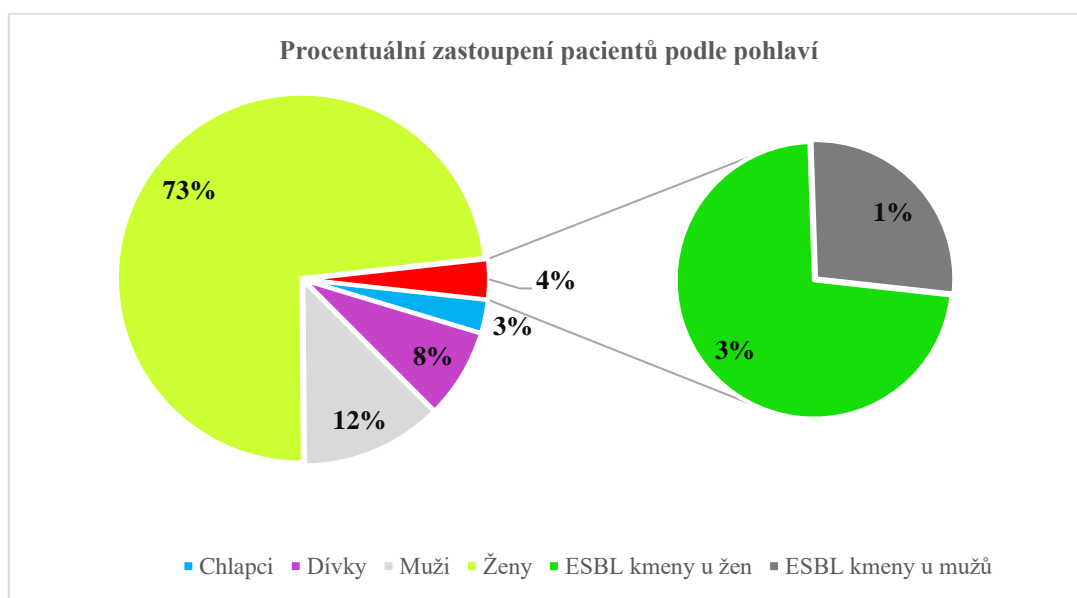
Pro svou práci jsem využila laboratoří klinické mikrobiologie Nemocnice Písek a.s., kdy jsem si všechny výše uvedené metody prakticky vyzkoušela. Dále jsem dostala data, která jsem statisticky zpracovala.

Celkem v roce 2016 bylo zaznamenáno 4 215 vzorků. Z toho 3 113 bylo od žen, 491 od mužů a od dětí a mladistvých (ve věku od 0 do 19 let) 631 vzorků. Od dívek bylo 490 vzorků a od chlapců 141 vzorků.

Podezřelé nálezy byly dále testovány na produkci ESBL kmenů. Zjistila jsem, že bylo celkem zachyceno 88 kmenů produkující beta-laktamázu s rozšířeným spektrem účinku. Všechny vzorky jsou močové kultury získané od pacientů ambulantních a komunálních.

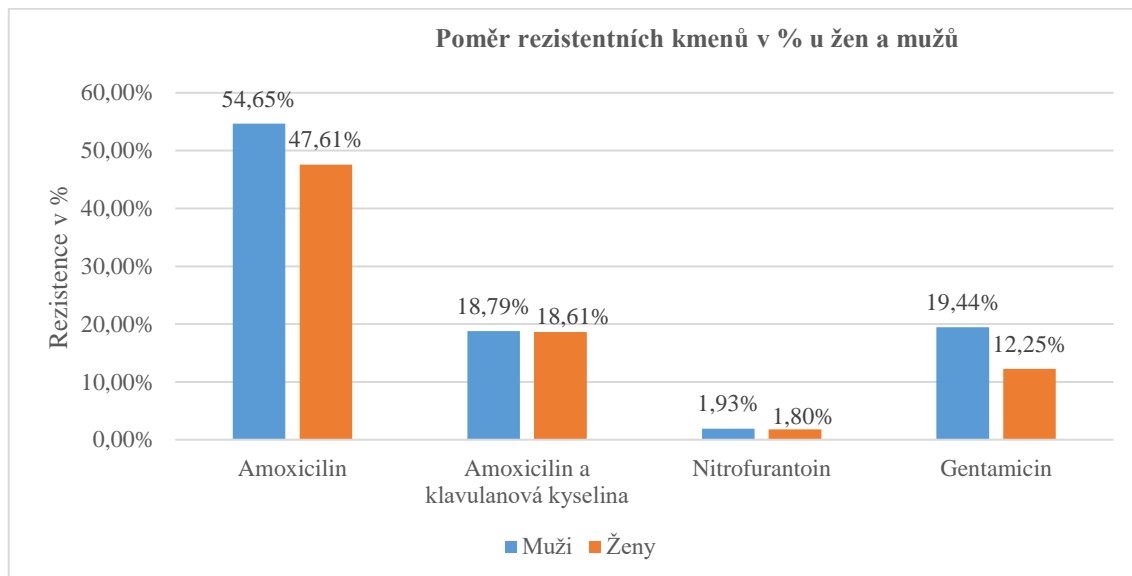
Pro statistické zpracování jsem využila software Excel. Zde jsem po zpracování dat zjistila, že signifikance $p = 0,00$, tj. 0%. To což je méně než obvyklé kritérium pro posuzování hypotéz (5%). Z 0,05. A z toho vyplývá, že je menší pravděpodobnost než 5%, že by takovéto četnosti měření vznikly "náhodou" (tj. vlivem jen mnoha malých neidentifikovatelných příčin). Je tedy rozdíl mezi naměřenými a očekávanými hodnotami mezi vybranými druhy ATB, a proto se předpokládá, že mé výsledky jsou statisticky významné.

Obrázek č. 1 Rozdělení pacientů podle pohlaví v %



Zdroj: vlastní

Obrázek č. 2 Procentuální zastoupení rezistentních kmenů na vybraná ATB



Zdroj: vlastní

Z obrázku č. 2 vyplývá, že ženy jsou častěji ohrožené močovými infekcemi, způsobené bakterií *E.coli*, celkem bylo vyšetřeno 1 842 žen a 310 mužů. U žen se častěji vyskytují rezistentní kmeny než u mužů, což můžeme vidět na Obrázku č. 2. Můžeme si všimnout, že nejlepší výsledky má nitrofurantoin, který má počet rezistentních kmenů nízký u žen i u mužů. Nejvyšší počet kmenů rezistentních je na amoxicilin u obojího pohlaví.

Tabulka č. 2 Počty citlivých a rezistentních kmenů u dětí 0-3 roky

ATB	Chlapci (0 - 3 roky) citliví	Rezistentní chlapci	Dívky (0-3 roky) citlivé	Rezistentní dívky
Amoxicilin	11	12	30	17
Amoxicilin + klavulanová kyselina	31	2	42	5
Nitrofurantoin	33	0	47	0
Gentamicin	22	2	44	1

Zdroj: vlastní

U dětí jsem též zaznamenala, že dívky trpí více na infekce močových cest než chlapci. Dívček bylo vyšetřeno 98 a 53 chlapců ve věku 0–3 roky. I v této věkové skupině je nejvyšší počet rezistentních kmenů na amoxicilin a nejlepší výsledky a nejnižší rezistence je na nitrofurantoin a amoxicilin s kyselinou klavulanovou. Zajímavé je, že u chlapců 0-1 rok se vyskytují infekce močových cest častěji než u dívek stejného věku. Chlapců bylo 37 a dívek 21 ve věku 0-1 rok.

Tabulka č. 3 Počty citlivých a rezistentních kmenů u dívek předškolního věku

ATB	Předškolní věk dívky (4–7 let) citlivé	Rezistentní
Amoxicilin	13	12
Amoxicilin + klavulanová kyselina	24	1
Nitrofurantoin	24	1
Cefotaxim	0	0
Gentamicin	23	1

Zdroj: vlastní

Jak ukazuje tabulka č. 2, u dětí předškolního věku se infekce močových cest způsobené *E.coli* objevila v roce 2016 v Písku pouze u dívek. Celkem bylo vyšetřeno 61 dívek ve věku 4-7 let.

Tabulka č. 4 Počty citlivých a rezistentních kmenů u dětí školního věku 7-15 let

ATB	Školní věk chlapci (7 - 15 let) citliví	Rezistentní chlapci	Školní věk dívky (7 - 15) citlivé	Rezistentní dívky
Amoxicilin	2	5	23	24
Amoxicilin + klavulanová kyselina	4	3	44	1
Nitrofurantoin	7	0	45	0
Gentamicin	6	1	42	2

Zdroj: vlastní

U dětí školního věku 7-15 let se zvýšili počty rezistentních kmenů u dívek i chlapců. Počty dívek s infekcemi močových cest způsobené *E.coli* je 88 opět více než chlapců, kterých bylo pouze 13 ve věku 7-15 let.

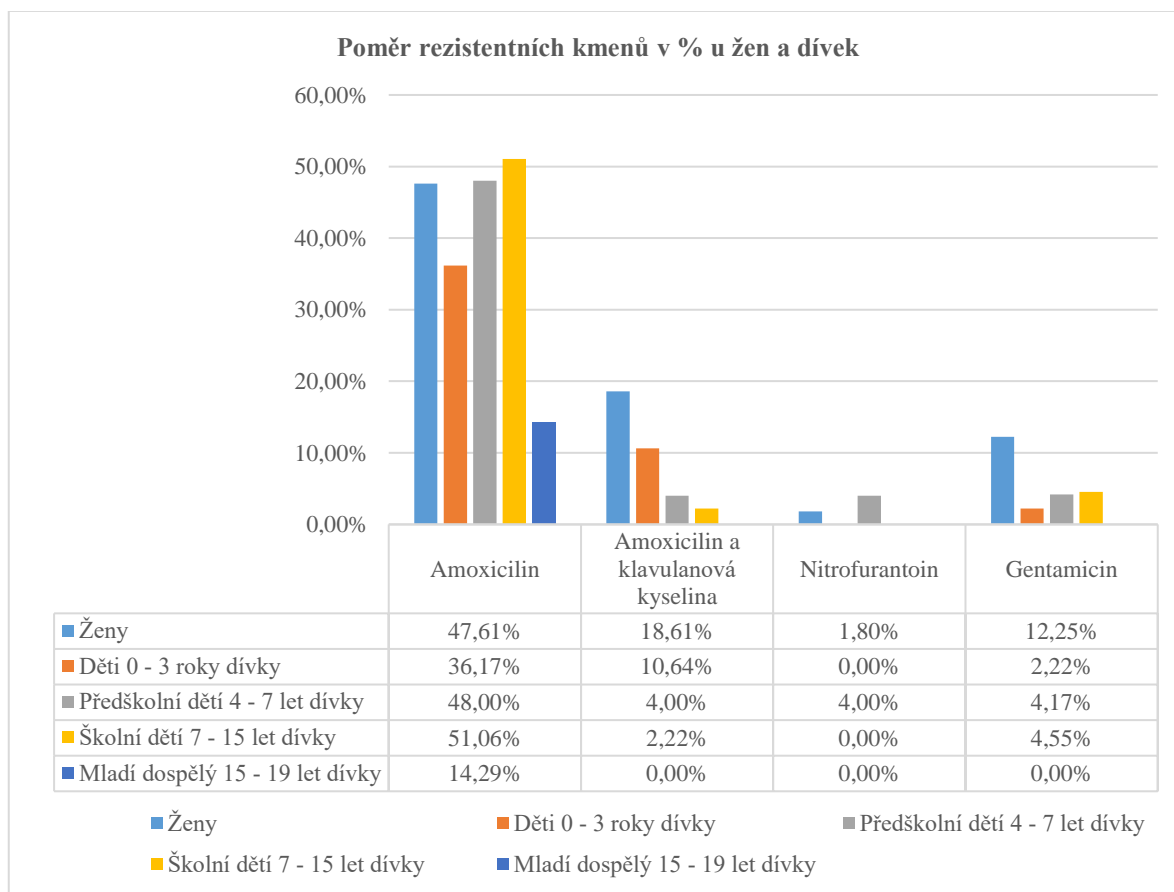
Tabulka č. 5 Počty rezistentních a citlivých kmenů u mladých dospělých dívek (15-19 let)

ATB	Mladé dospělé (15-19 let) dívký citlivé	Rezistentní
Amoxicilin	6	1
Amoxicilin + klavulanová kyselina	5	0
Nitrofurantoin	7	0
Cefotaxim	0	0
Gentamicin	5	0

Zdroj: vlastní

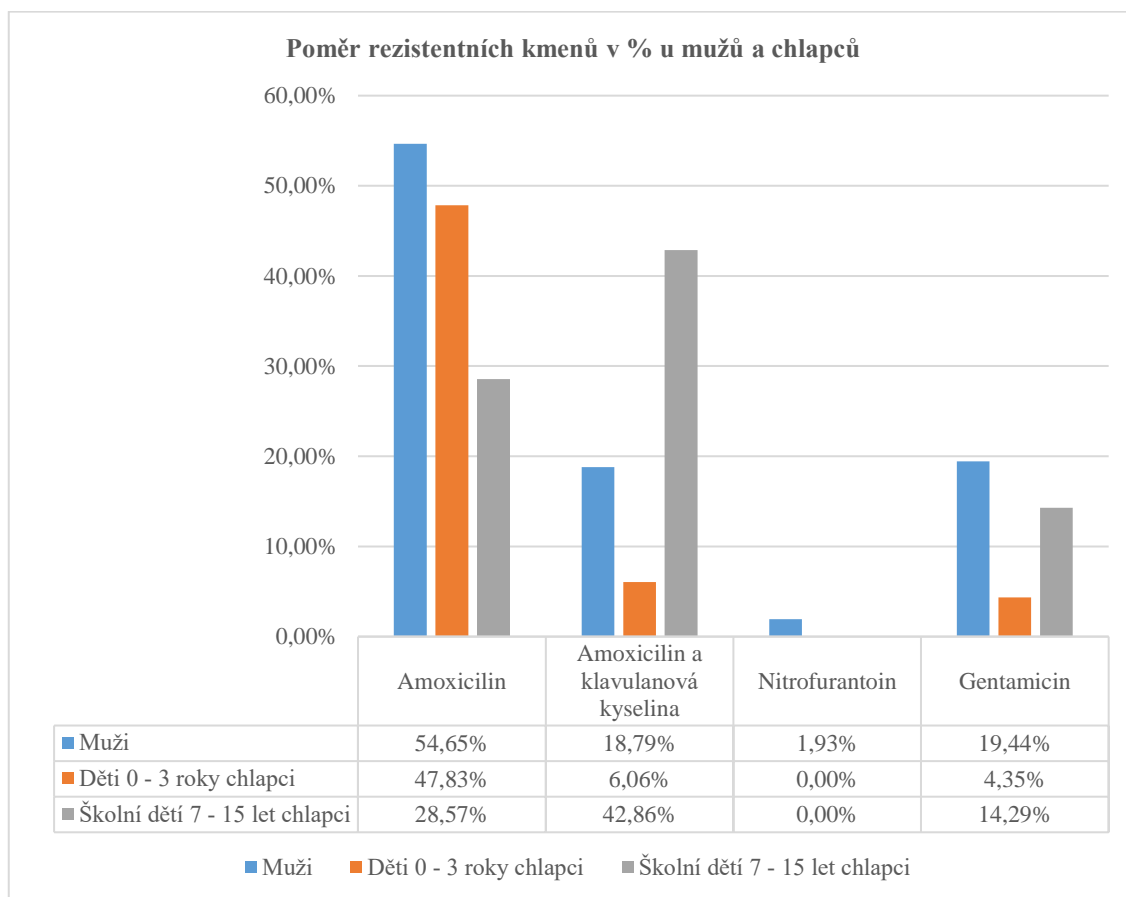
Dívky v letech 15-19 trpí méně záněty močových cest způsobené *E. coli* než v předchozích výše uvedených kategoriích. Bylo vyšetřeno pouze 19 dívek ve věku 15-19 let.

Obrázek č. 3 Poměr rezistentních kmenů v % na vybraná antibiotika u žen a dívek



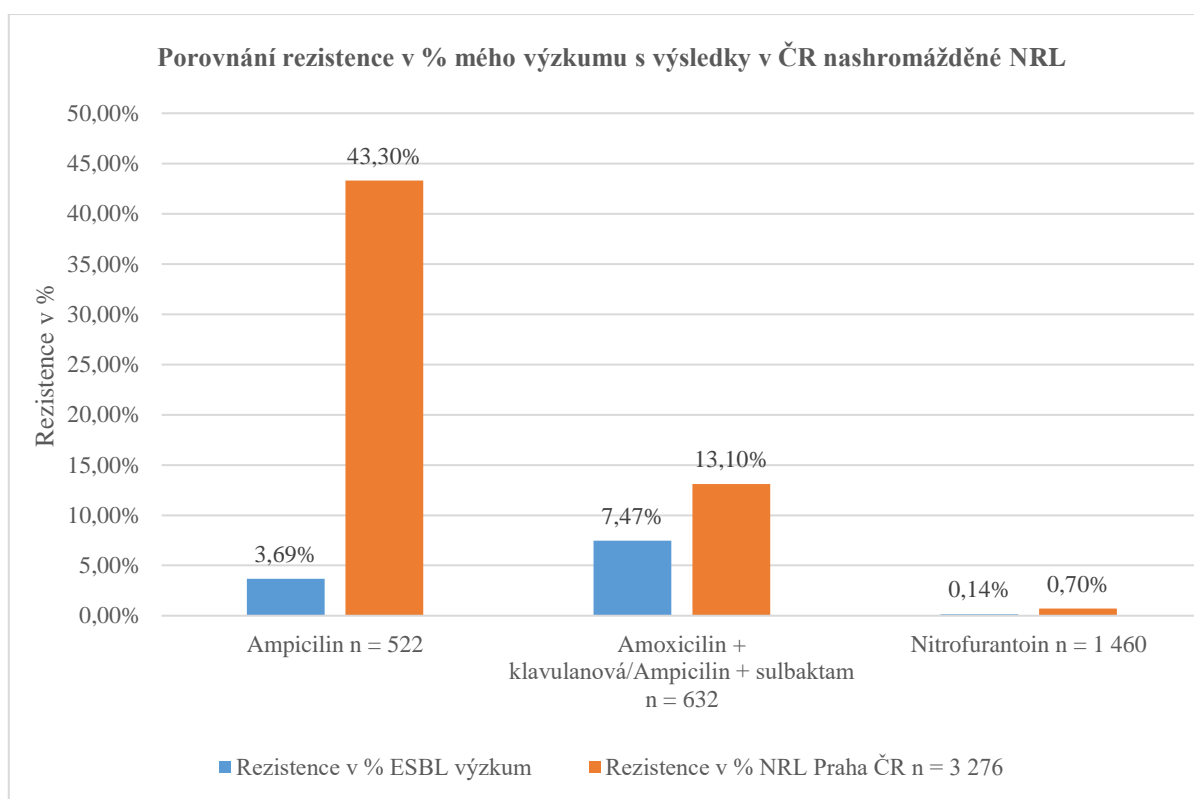
Zdroj: vlastní

Obrázek č. 4 Poměr rezistentních kmenů v % na vybraná antibiotika u mužů a chlapců



Zdroj: vlastní

Obrázek č. 5 Porovnání výsledků výzkumu s ČR za rok 2016, ESBL kmeny



Zdroj: vlastní

7 Diskuze

Pro svou práci jsem si vybrala 5 zástupců antibiotik:

- Amoxicilin
- Amoxicilin + kyselina klavulanová
- Nitrofurantoin
- Gentamicin

Cíly mé práce bylo nashromáždit informace o rezistenci *E. coli* na vybraná ATB v okrese Písek za rok 2016. Porovnat výsledky mezi dospělými, dětmi a mladistvými (0-19 let).

U amoxicilinu jsem zaznamenala veliký počet rezistentních kmenů. U dětí i dospělých pacientů. Poměr rezistentních kmenů se pohyboval kolem 14,29% až po 51,06%. V porovnání s výsledky s NRL, která se zaměřila na sběr dat rezistence ESBL kmenů z močových izolátů v mém výzkumu je poměr rezistentních kmenů 3,69%. Výsledek NRL je 43,30%. Velký rozdíl by se dal přičíst k různým počtům pacientů, kdy NRL se zaměřila na celou ČR. Ale i přes to bych doporučovala používat amoxicilin v krajních případech. Amoxicilin je ATB, u kterého se pozoruje každoroční nárůst rezistence.

Amoxicilin + kyselina klavulanová má mnohem lepší výsledky než amoxicilin samotný, je to způsobeno výskytem ESBL kmenů, které mohou mírně zkreslovat výsledky, kdy kmen se jeví jako citlivý i když citlivý není. Přesto se dále kmen testuje pomocí CHROMagaru. CHROMagar ESBL umožňuje detekci bakterií, včetně těch, které nesou rezistenci AmpC. To je důležitá vlastnost, protože rezistence AmpC má menší epidemiologickou relevanci, ale často vede k ESBL falešně pozitivnímu čtení v klasických metodách testování. Kyselina klavulanová patří mezi základní inhibitory produkce širokospektré beta-laktamázy produkující ESBL kmeny.

Nitrofurantoin patří k nejúspěšnějším chemoterapeutikům, která se používají na infekce močových cest. Výhoda nitrofurantoinu je, že rezistence bakterií na

nitrofurantoin je velice mála a vzniká velice obtížně. Tuto informaci podporují i mé výsledky kdy poměr rezistentních kmenů k nitrofurantoinu se pohybuje kolem 1,80%. V porovnání s NRL i ESBL kmeny mají nízké procento rezistentních kmenů, kdy v mém výzkumu je 0,14% a v celé ČR 0,70%. V porovnání s výsledky v Řecku (Kréta) si vedeme velice dobře, v roce 2007 byla zaznamenána rezistence k nitrofurantoinu u dětí 2,6% (Anatoliotaki, 2007). Nitrofurantoin je využíván málo, protože je pouze forma per os a nedá se použít u sepsí. Nitrofurantoin způsobuje řadu vedlejších účinků, například vyvolává nauzeu.

Gentamicin se u nás pohyboval mezi 2,22% až 19,44% rezistentních kmenů. Gentamicin má procento rezistentních ESBL kmenů 2,53% což znamená, že je účinný proti ESBL kmenům a i když rezistence k němu je poměrně vysoká, tak podle mého názoru si místo na trhu s ATB zaslouží i přes svojí toxicitu. U podávání gentamicinu se musí postupovat opatrně.

Jak už jsem se zmínila v okrese Písek za rok 2016, bylo zachyceno celkem 88 ESBL kmenů. Z toho 64 ESBL kmenů bylo zaznamenáno u žen a 24 ESBL kmenů u mužů. U dětí ESBL kmeny nebyly nalezeny.

Pokusila jsem se porovnat rezistentní kmeny mezi dospělými a dětmi. Podle mého výzkumu u dětí nejsou nalézány tak často rezistentními kmeny. Rezistentní kmeny se masivně objevují u dospělých pacientů a to s převahou u žen.

Infekce močových cest patří k nejčastějším onemocněním. U novorozenců je to častěji u chlapců než u dívek. Kolem pátého roku u dívek roste prevalence a naopak u chlapců klesá. Infekce u děvčat je spojena s vezikoureterálním refluxem. Během 20-50 roku se infekce močových cest zvyšují 50x více u žen. Později se tento rozdíl vyrovnává u mužů a žen (Teplan, 2004).

Dále bych chtěla říct, že užívání ATB by se mělo redukovat. Antibiotická léčba by se měla nasadit až po mikrobiologickém vyšetření, kdy se stanoví antibiotická citlivost a může se vybrat takové antibiotikum, které bude účinné a nemusí se sahat po širokospektrálních antibiotikách, které často vyvolají vedlejší účinky, jako jsou kvasinkové infekce, průjmy, apod. Celkově by se měla laická veřejnost dozvědět o vedlejších účincích antibiotik. Především o antibiotické rezistenci. Jen pro představu v roce 2015 byla celková spotřeba citlivých penicilinů v ČR 9%, v Řecku, Portugalsku a Belgii byla spotřeba téměř nulová. V Dánsku a Švédsku 26%. V roce 2015 byla spotřeba v ČR 20,85 definované denní dávky na tisíc obyvatel na den. Nejnižší spotřeby

byly v Evropě zaznamenány v Nizozemí (10,72) a v Estonsku (11,63), naopak nejvyšší spotřeby vykazovalo Řecko (36,14) a Francie (29,94). (SÚKL, 2016)

Celkově ČR nepatří mezi velké spotřebitele ATB. Přesto roste antibiotická rezistence. Mé výsledky výzkumu podle mého názoru, zatím nepředstavují tak alarmující čísla jako například v již zmíněném Řecku. Ale i přesto bychom se měli inspirovat severskými zeměmi například Dánském, Švédském apod.

8 Závěr

Rezistence je rozšířená po celém světě. Ohrožuje lidi i zvířata. Jedna z nejzávažnějších rezistencí jsou ESBL kmeny. Proto je důležitá včasná detekce a správná léčba. Jedním z cílů bylo zjistit míru ESBL kmenů v okrese Písek za rok 2016. Zjistila jsem, že procento rezistentních ESBL kmenů není až tak moc vysoké. Nejvyšší procento rezistentních ESBL kmenů bylo u Amoxicilinu + klavulanová kyselina/Ampicilinu + sulbaktam 7,47%, což mi přijde poměrně vysoké. Lépe si vedl nitrofurantoin, který měl procento rezistentních ESBL kmenů pouhých 0,14%.

Dalším cílem mé práce bylo nashromáždit informace o rezistenci *Escherichia coli* na vybraná antibiotika a porovnat výsledky mezi dospělými a dětmi. Obecně mohu říct, že všechny věkové skupiny dětí mají nižší procento rezistentních kmenů než dospělí. Všimla jsem si podobností. Například procento rezistentních kmenů u všech skupin bylo nejvyšší u amoxicilinu. Nejlépe dopadl nitrofurantoin. Kdy procento rezistentních kmenů se pohybuje kolem 2%. Z celkového hlediska výsledky nedopadli nejhůře. Častěji se infekce močových cest vyskytují u žen a dívek. Celkem bylo v roce 2016 vyšetřeno 4 215 pacientů.

Posledním cílem mé práce bylo prakticky si vyzkoušet mikrobiologická vyšetření, pro určení druhu bakterie testy ENTERO test 24 N, INDOL test a VP test. Stanovení citlivosti diskovým difuzním testem a MIC testem a v neposlední řadě průkaz ESBL kmenů pomocí ESBL MAST test.

Celkově po celém světě roste antibiotická rezistence. Největším problémem je špatné předepisování ATB, kdy nebylo provedeno mikrobiologické vyšetření. Pokud by se dodržovalo vše, jak má mohla by antibiotická rezistence pomalu snižovat.

Seznam literatury

ANATOLIOTAKI, Maria et al. Antimicrobial resistance of urinary tract pathogens in children in Crete, Greece. *Journal Scandinavian Journal of Infectious Diseases* [online]. 2007, 2007, **39**(8), 671-675 [cit. 2018-07-16]. DOI: 10.1080/00365540701199899. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17654342>

ARYAL, S., 2017. Mikrobiology info: Mueller-hinton agar MĚHA composition, principle, uses and preparation. *Microbiology.info* [online]. 6. 10. 2017 [cit. 2018-02-28]. Dostupné z: <https://microbiologyinfo.com/mueller-hinton-agar-mha-composition-principle-uses-and-preparation/>

BEDNÁŘ, M. et al., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil. 560 s. ISBN 80-238-0297-6.

BENEŠ, Jiří. Cefalosporiny. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada Publishing, 2018, 23 - 144. ISBN 978-80-271-0636-3.

BIO – RAD, 2018. *UriSelect™ 4 Medium* [online]. Londýn: BIO-RAD [cit. 2018-04-12]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/en-us/product/uriselect-4-medium?ID=MWA1MR15>

BioVendor, 2013. *Krevní agar (Columbia)* [online]. Brno: BioVendor – Laboratorní medicína a.s. [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <https://www.biovendor.cz/krevni-agar-columbia-/p91.98025/>

HERA, Alfréd et al. *AMINOGLYKOSIDY*. Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha, 2016. Dostupné také z: www.cls.cz/dokumenty/aminoglykosidy.doc

HOLUBOVÁ, Adéla. *Rychlé testy pro detekci mechanismů antibiotické rezistence u gram negativních tyčků*. Plzeň, 2017. Bakalářská práce. Západočeská universita v Plzni, FZS. Vedoucí práce Doc. Ing. Jaroslav Hrabák, PhD.

HORÁČEK, J., 2000. *Základy lékařské mikrobiologie*. Praha: Karolinum. 308 s. ISBN 80-246-0006-4.

HYNIE, S., 2001. *Lékařská mikrobiologie – vyšetřovací metody*. 2., přeprac. vyd. Praha: Triton. 504 s. ISBN 978-80-86850-04-7.

HYNIE, S., 2003. *Speciální farmakologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0656-9.

CHROMÁ, M. a M. KOLÁŘ. *Genetic methods for detection of antibiotic resistance: focus on extended – spectrum β -lactamases*. Partment of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Czech republic, 2010, **154**(4), 289 – 296... DOI: 21293539.

Chromagar, 2009. *Clinical Microbiology* [online]. Paris: ChroMagar [cit. 2018-03-24]. Dostupné z: <http://www.chromagar.com/products-chromagar-orientation-focus-on-urinary-tract-pathogens-25.html#.WrYMJYjwbDd>

JACOBY, G. A. AmpC -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2009, **22**(1), 161-182 [cit. 2018-07-19]. DOI: 10.1128/CMR.00036-08. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00036-08>

JANOVSKÁ S., SLEHOVÁ, E., 2015. *Citlivost a rezistence mikroorganismů k antibiotikům* [online]. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1–2 [cit. 2018-03-02]. Dostupné z: https://www.upce.cz/sites/default/binary_www_old/fcht/uechi/crp-msmt-2015/antibiotika-lab.pdf

KLADENSKÝ, Jiří et al. Přínos Nifuratelu pro léčbu akutních nekomplikovaných uroinfekcí. *Urologie pro praxi* [online]. 2000-, 2006, (3), 108-110 [cit. 2018-07-20]. Dostupné z: <https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2006/03/03.pdf>

KRMENČÍK, P., HONEJ, P., KYSILKA, J., 2007. *Escherichia coli* [online]. Praha: Biotox.cz [cit. 2018-03-21]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/uvodem.php>

LOCHMANOVÁ, J., 2004. Antibiotická léčba bakteriálních infekcí z pohledu klinika, mikrobiologa a farmakologa: Interní medicína pro praktické lékaře. *Medicína pro praxi* [online]. 53, 1 [cit. 2018-02-18]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2004/01/04.pdf>

MAĎAR, R., PODSTATOVÁ, R., ŘEHOŘOVÁ, J., 2006. *Prevence nozokomiálních nákaz v klinické praxi*. Praha: Grada. s. ISBN 80-247-1673-9.

MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2012, **18**(3), 268-281 [cit. 2018-07-10]. ISSN 1198-743X. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14616323>

MAREK, J., 2010. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 4., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. 808 s. ISBN 978-802-4726-397.

MARKOVÁ, Věra. *Vliv různých způsobů rozočkování vzorků na počet izolovaných kolonií mikrobů*. Brno, 2008. Bakalářská práce. Masarykova universita. Vedoucí práce MUDr. Ondřej Zahradníček.

MARTÍNKOVÁ, Jiřina. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2007, s. 304. ISBN 978-80-247-1356-4.

MASCARETTI, Oreste A. *Bacteria versus antibacterial agents : an integrated approach*. Washington, D.C.: ASM Press, 2003, s. 393. ISBN 1555812589.

Mayo clinic: E.coli [online]. Arizona, 2018 [cit. 2018-07-20]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/e-coli/symptoms-causes/syc-20372058>

MELTER, Oto a Annika MALMGREN. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie: Testování citlivosti k antibiotikům*. Praha: Karolinum, 2014, s. 35-36. ISBN 978-80-246-2414-3.

NGUYEN, Y a Vanessa SPERANDIO. Enterohemorrhagic E. coli (EHEC) pathogenesis *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2012 [cit.2018-06-26].DOI:22919681.Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3417627/>

PathologyOutlines.com: Enteroinvasive E. coli (EIEC) [online]. Michigan, 2017 [cit. 2018-07-25]. Dostupné z: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/colonecolienteroinv.html>

PORŠOVÁ, Martina et al. Prostatický syndrom. *Urolog pro praxi* [online]. 2000-, 2006, (1), 24-27 [cit. 2018-07-20].

ROBIN, F., J. DELMAS, C. SCHWEITZER, O. TOURNILHAC, O. LESENS, C. CHANAL a R. BONNET. Evolution of TEM-Type Enzymes: Biochemical and Genetic Characterization of Two New Complex Mutant TEM Enzymes, TEM-151 and TEM-152, from a Single Patient. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*[online]. 2007,**51**(4), 1304-1309 [cit. 2018-07-10]. DOI: 10.1128/AAC.01058-06. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.01058-06>

Sandoz, 2018. 2: *Antibiotika* [online]. Praha: Sandoz [cit. 2018-03-21]. Dostupné z: <https://www.sandoz.cz/o-spolecnosti-sandoz/nase-terapeuticke-oblasti/antibiotika>

SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007, s. 270. ISBN 80-210-4207-9.

SCHINDLER, J, 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada. 248 s. ISBN 978-80-247-4771-2.

SMÍŠEK, J., 2008. *Kultivace bakterií na pevných půdách* [online]. Praha: ÚLM 3. LF UK [cit. 2018-03-26]. Dostupné také z: http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/vseob/P1v/kultivace_vs_tisk.pdf

SÚKL Státní ústav pro kontrolu léčiv: *Antibiotické politika* [online]. Praha, ©2010 [cit. 2018-07-17]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/antibioticka-politika>

ŠILHÁNKOVÁ, L, 2002. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3., opr. a dopl., vyd. Praha: Academia. 364 s. ISBN 80-200-1024-6.

ŠTEFÁNEK, J., 2010. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. Praha: UK [cit. 2018-02-12]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/>

TEPLAN, Vladimír ed al. *Infekce ledvin a močových cest v dospělém a dětském věku: Úvod do problematiky*. Praha: Grada, 2004, s. 15. ISBN 80-247-0566-4.

TOMANICEK, Stephen et al. The active site protonation states of perdeuterated Toho-1 β -lactamase determined by neutron diffraction support a role for Glu166 as the general base in acylation. *FEBS Letters* [online]. 2011, **585**(2), 364 - 368 [cit. 2018-07-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.12.017>

VOTAVA, M., 2010. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 495 s. ISBN 978-80-86850-04-7.

Seznam tabulek

Tabulka 1 Původci močových infekcí	15
Tabulka 2 Počty citlivých a rezistentních kmenů u dětí 0-3 roky	42
Tabulka 3 Počty rezistentních a citlivých kmenů u dívek předškolního věku.....	43
Tabulka 4 Počty citlivých a rezistentních kmenů u dětí školního věku 7-15 let.....	43
Tabulka 5 Počty citlivých a rezistentních kmenů u mladých dospělých 15-19 let.....	44

Seznam obrázků

Obrázek 1 Rozdělení pacientů podle pohlaví v %.....	41
Obrázek 2 Procentuální zastoupení rezistentních kmenů na vybraná ATB.....	42
Obrázek 3 Poměr rezistentních kmenů v % na vybraná antibiotika u žen a dívek.....	45
Obrázek 4 Poměr rezistentních kmenů v % na vybraná antibiotika u mužů a chlapců...	46
Obrázek 5 Porovnání výsledků výzkumu s ČR za rok 2016, ESBL kmeny.....	47

Seznam příloh

Příloha 1 Testování (obrázek 1-14)	61
--	----

Seznam zkratek

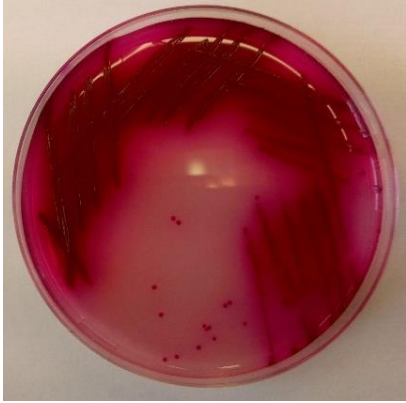
AST	citlivost k vybraným antibiotikům
ATB	antibiotikum
DC	Deoxycholát – citrátový agar
E. coli	<i>Escherichia Coli</i>
EARSS	European antimicrobial resistance surveillance network
ESBL	širokospektré beta-laktamázy
G-	gramnegativní
G+	grampozitivní
H	bičíkový antigen
ID	identifikace
IZ	inhibiční zóna
K	kapsulární antigen
KA	Krevní agar
McF	McFarland
MDRO	multirezistentní organismy
MH (A)	Mueller – Hinton agar
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NaCl	chlorid sodný
NRL	Národní referenční pracoviště
O	somatický antigen
OXA	oxacillin
PBP	penicilin vázající protein

S. Aureus	Stafylokokus Aureus
S. Saprofyticus	Stafylokokus Saprofytikus
TL	termolabilní
TS	termostabilní
VP test Voges	Proskauer test

Přílohy

Příloha 1 Testování (obrázek 1–14)

Obrázek 1 Růst *E. coli* na Endově půdě



Zdroj: vlastní

Obrázek 2: Růst *E. coli* na KA



Zdroj: vlastní

Obrázek 3 Růst *E. coli* na Uri Selektu



Zdroj: vlastní

Obrázek 4 Strip po inkubaci – barevné změny



Zdroj: vlastní

Obrázek 5 Vortex a Denzitometr



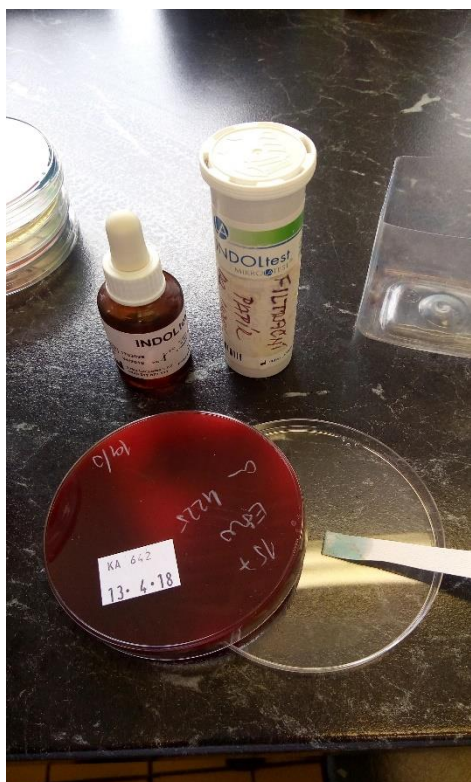
Zdroj: vlastní

Obrázek 6 Schéma barevných změn pro určení biochemické aktivity

1		H URE	G ARG	F ORN	E LYS	D H ₂ S	C SCI	B MAL	A ONP
	POZ	Red	Blue	Blue	Blue	Black	Blue	Blue	Yellow
	NEG	Orange	Green	Yellow	Yellow	White	Yellow	Yellow	White
2		H SAL	G SOR	F MLB	E CEL	D LAC	C TRE	B MAN	A GLR
	POZ	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
	NEG	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	White
3		H DUL	G ADO	F ART	E SUC	D INO	C RAF	B ESL	A bXY
	POZ	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Black	Yellow
	NEG	Green	Green	Green	Green	Green	Green	White	White

Zdroj: Příbalový leták ENTERO test 24N

Obrázek 7 INDOL test a pozitivní výsledek



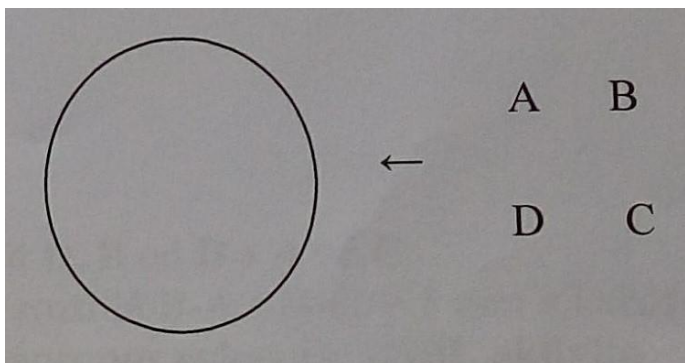
Zdroj: vlastní

Obrázek 8 VP-I a VP-II činidla



Zdroj: vlastní

Obrázek 9 Schéma položení disků Ampc beta-laktamáza



Zdroj: vlastní

Obrázek 10 Růst bakterií kolem disků ABCD



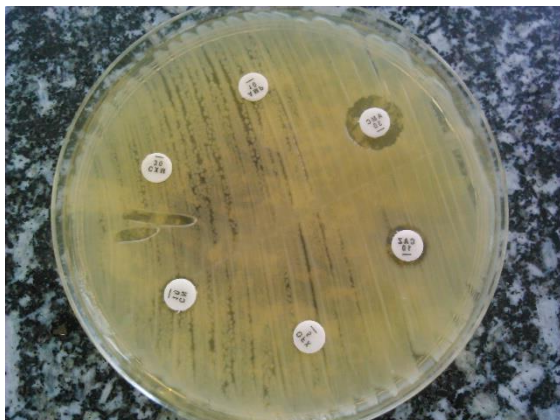
Zdroj: vlastní

Obrázek 11 Diskový difuzní test – citlivý kmen



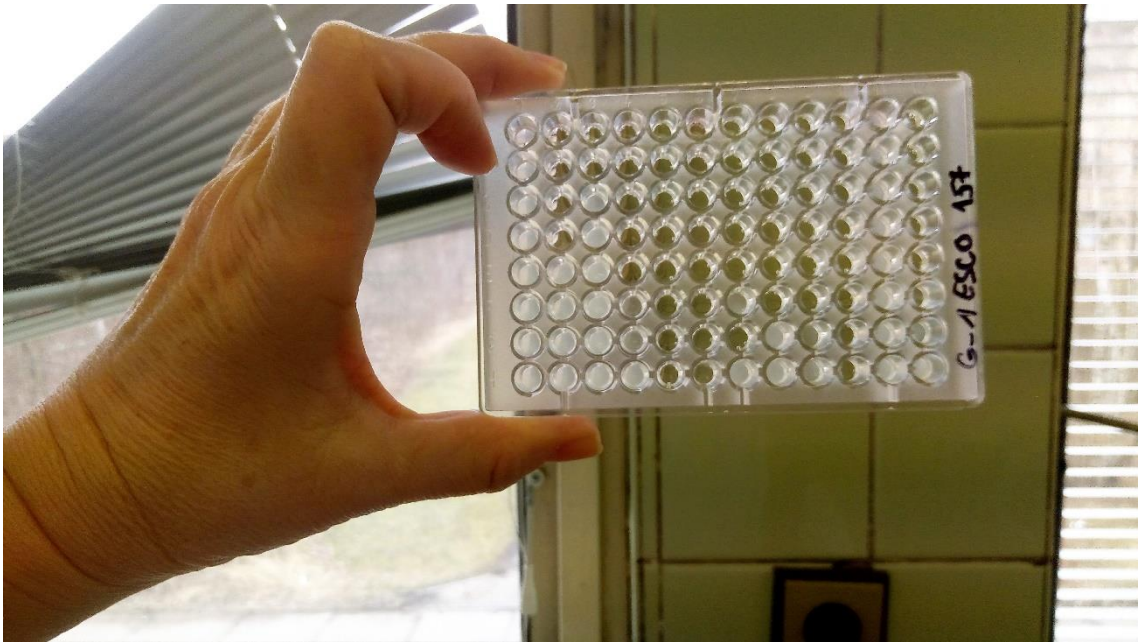
Zdroj: vlastní

Obrázek 12 Diskový difuzní test – rezistentní kmen



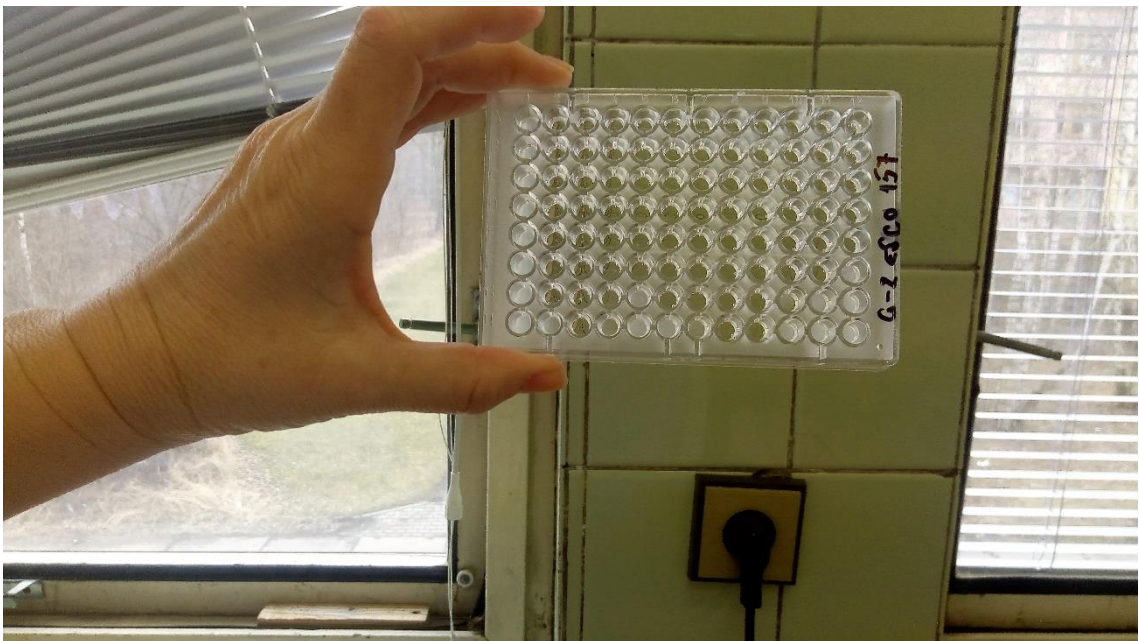
Zdroj: vlastní

Obrázek 13 M. I. C. test G-2 ESCO 157



Zdroj: vlastní

Obrázek 14 M. I. C. test G – 1 ESCO 157



Zdroj: vlastní