



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 za rok 2016**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Studijní program:**

Zdravotní laborant

**Autor:** Karolína Bromová

**Vedoucí práce:** prim. MUDr. Věra Kůrková

České Budějovice 2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Rezistence Escherichia coli na vybraná antibiotika v okrese Písek za rok 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. 05. 2018

.....

## **Poděkování**

Chtěla 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

Cílem mé práce bylo nashromáždit informace o rezistenci *Escherichia coli* na vybraná antibiotika, poukázat na špatné užívání antibiotik a dokázat, že tento problém by se měl začít řešit. Výzkumná část byla provedena prostřednictvím zpracování dat, kultivací, stanovení citlivostí a určení kmene pomocí různých laboratorních metod. Pro svůj výzkum jsem použila *Escherichia coli* vykultivovanou z moče, využila jsem už dříve určené kmeny. Pro určení správného kmene *Enterobacteriaceae* jsem využila biochemické testy ENTERO test 24 N a ESBL MAST test. Pro bližší určení kmene *Escherichia coli* jsem využila INDOL test a VPT test. Pro stanovení citlivosti k antibiotikům jsem využila test M. I. C. a diskový difúzní test.

Celkem jsem měla k dispozici 3245 pacientů, z toho 250 dětí a 2 995 dospělých pacientů. Celkem to bylo 8491 vyšetření. Pozorovala jsem rezistentní kmeny u dospělých a dětských pacientů, četnosti rezistentních kmenů v porovnání s citlivými kmeny *Escherichia coli*. Vybrala jsem si 10 druhů antibiotik.

U Amoxicilinu jsem zjistila rezistenci ve 48 % případů z 1385 vyšetření. Míra rezistence Amoxicilinu + klavulanátu byla 17 % u 1 439 vyšetřovaných osob.

U 101 vyšetřovaných osob byl použit Amplicin, z toho 95 % osob vykazovalo rezistenci. Takto vysoký výsledek by mohl být způsoben tím, že Amplicin se může podávat již v dětském věku, v době těhotenství a při kojení. Má široké spektrum účinku a je dobře snášen. Amplicin je používán především ve zdravotnických zařízeních. Nejsou k dispozici tabletky, je podáván injekčně. Amplicin + sulbaktam dopadly trochu lépe, rezistence je ale stále vysoká – ze 103 osob vykazovalo 83,5 % rezistenci. Sulbaktam je inhibitor beta-laktamáz (Wikipedia, 2018c).

Pouze u 13 osob byl použit Trimetroprim, skoro 85 % vykazovalo rezistenci. Trimetroprim + sulfonamid byl rezistentní v 29 % z 2235 pacientů. U Cefuroximu byla necitlivost pozorována u 21 % pacientů z 579. Nejlepší výsledky z vybraných antibiotik měl Nitrofurantoin. Rezistenci vykazovalo pouze necelé 2 % vyšetřovaných z celkového počtu 1998 pacientů. Gentamycin neměl špatné výsledky. Byl použit u 547 vyšetřovaných osob. Antibiotickou rezistenci vykazovalo 14 % vyšetřovaných.

**Klíčová slova:** Antibiotika, rezistence, *Escherichia coli*, citlivost, *Enterobacteriaceae*

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

### **Abstract**

The aim of my work was to gather information on resistance of *Escherichia coli* to selected antibiotics. To show wrong use of antibiotics and to prove that this problem should begin to solve. The research part was performed by data processing, cultivation, sensitivity determination and determination of a phylum using various laboratory methods. In my research, I used *Escherichia coli* from the urine – I used phyla previously designated. To determine the correct phylum of *Enterobacteriaceae*, I made use of biochemical tests such as the ENTERO test 24 N and ESBL MAST test, for the *Escherichia coli* phyla, I have used the INDOL test and VPT test. To determinate sensitivity to antibiotics, I used the M.I.C disk diffusion test.

In total, there were 3,245 patients, of whom 250 children and 2,995 adults. Altogether 8,491 examinations were performed. I have observed resistant phyla in adult and paediatric patients and the frequency of resistant phyla compared to sensitive phyla of *Escherichia coli*. I have chosen 10 kinds of antibiotics.

I found out that Amoxicillin was resistant in 48 % of total 1385 studies. Amoxicillin + clavulanate 30 % was resistant 17 %, in 1439 of persons under investigation.

In the group of 101 investigated subjects, Amplicin was used, 95 % of whom had resistance. Such a high result could be due to the fact that Amplicin, can be given in a childhood, during pregnancy and breastfeeding. It has a wide range of effects and is well tolerated. Amplicin is primarily used in healthcare facilities. No pills are available so it is injected. Amplicin + sulbactam (sultamicilin) results were also bad. In a group of 103 subjects, 83 % to them showed resistance. Sulbactam is a beta-lactamase inhibitor (Wikipedia, 2018c).

Only 13 people used Trimetroprim, 85 % of whom were resistant. Trimethoprim + sulphonamide was resistant in 29 % of 2 235 cases. In Cefuroxime, insensitivity was seen in 21 % of 579 patients. The best results from selected antibiotics were Nitrofurantoin. Resistance showed only less than 2 % of the total 1998 patients. Gentamycin results were not bad. Gentamycin was used in 547 people, 14 % of whom showed resistance.

**Key words:** Antibiotics resistance, *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae*

# Obsah

Úvod .....	11
<b>1 Escherichia coli.....</b>	<b>12</b>
1.1 Morfologie .....	12
1.2 Fyziologie .....	13
1.3 Antigenní charakter .....	13
1.4 Patogenita.....	13
1.5 Enteropatogenní kmeny .....	13
1.5.1 Enteropatogenní EPEC.....	13
1.5.2 Enterotoxigenní ETEC.....	14
1.5.3 Enteroinvazivní EIEC .....	14
1.5.4 Enterohemoragické EHEC ( <i>E. coli</i> O157:H7).....	14
1.6 Onemocnění.....	14
1.6.1 Močové infekce .....	14
<b>2 Antibiotika .....</b>	<b>16</b>
2.1 Charakteristika antibiotik.....	16
2.2 Rozdělení antibiotik.....	17
2.2.1 Podle spektra účinnosti.....	17
2.2.2 Podle intenzity účinku.....	17
2.2.3 Podle místa a mechanismu účinku.....	17
2.2.4 Podle chemické struktury.....	18
2.2.4.1 Beta – laktamová ATB.....	18
2.2.4.2 Chinolová ATB.....	20
2.2.4.3 Nitrofuránová ATB.....	21
2.2.4.4 Sulfonamidová a pyridinová ATB .....	21
2.2.4.5 Aminoglykosidová ATB .....	21
2.3 Nežádoucí účinky antibiotik .....	22
2.3.1 Toxické reakce .....	22
2.3.2 Potlačení normální mikroflóry.....	22
2.3.3 Imunosupresivní účinek .....	22
2.3.4 Imunotoleranční nežádoucí účinky .....	22
2.3.5 Rezistence.....	22



<b>3</b>	<b>Rezistence bakterií na antibiotika .....</b>	<b>23</b>
3.1	<i>Vrozená primární a získaná rezistence.....</i>	23
3.2	<i>Příčiny rezistence .....</i>	23
3.2.1	<i>Změna průchodnosti buněčných obalů .....</i>	23
3.2.2	<i>Zneškodnění ATB enzymy .....</i>	23
3.2.3	<i>Vypuzení ATB.....</i>	24
3.2.4	<i>Změna zásahového místa .....</i>	24
3.2.5	<i>AmpC beta-laktamázy.....</i>	24
3.2.6	<i>EMBL rozšířené spektrum beta-laktamázy .....</i>	24
3.2.7	<i>Genetická podstata získané rezistence.....</i>	25
3.3	<i>Multirezistence .....</i>	25
3.4	<i>Dozor (surveillance) a monitorování rezistence .....</i>	25
<b>4</b>	<b>Cíle a hypotézy .....</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>Metodika .....</b>	<b>28</b>
5.1	<i>Kultivace.....</i>	28
5.1.1	<i>Mueller – Hinton agar (MHA).....</i>	28
5.1.2	<i>Endova půda .....</i>	28
5.1.3	<i>Deoxycholát – citrátový agar (DC) .....</i>	28
5.1.4	<i>Krevní agar Columbia (KA) .....</i>	28
5.1.5	<i>CHROMagar.....</i>	29
5.2	<i>Biochemické testy .....</i>	29
5.2.1	<i>ENTERO test 24 N.....</i>	29
5.2.2	<i>INDOL test.....</i>	30
5.2.3	<i>VP test (Voges – Proskareův test).....</i>	31
5.3	<i>Stanovení citlivosti.....</i>	32
5.3.1	<i>ESBL MAST test.....</i>	32
5.3.2	<i>Diskový difuzní test .....</i>	33
5.3.3	<i>M. I. C. test (diluční test) .....</i>	34
<b>6</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>41</b>
	<b>Závěr .....</b>	<b>45</b>
	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>46</b>

<b>Seznam tabulek .....</b>	<b>51</b>
<b>Seznam obrázků .....</b>	<b>52</b>
<b>Seznam příloh.....</b>	<b>53</b>
<b>Seznam zkratek .....</b>	<b>54</b>
<b>Přílohy.....</b>	<b>56</b>

## 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, 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 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*

Doména: bakterie

Kmen: Proteobacteria

Třída: Gamma Proteobacteria

Řád: Enterobacteriaceae

Rod: *Escherichia*

Binomické jméno: *Escherichia coli* (Wikipedia, 2017).

*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).

## 1.1 *Morfologie*

Velikost je 2–3  $\mu\text{m}$  a šířka 0,5  $\mu\text{m}$  (Šilhánková, 2002). Je to gramnegativní rovná tyčka se zaoblenými konci, pohybující se pomocí bičků. 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.

## **1.2 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.

## **1.3 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).

## **1.4 Patogenita**

Patogenita *E. coli* vyvolává dva druhy onemocnění:

- 1) Extraintesticiální (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.
- 2) Způsobují infekce v intersticiálním traktu doprovázené průjmy.

## **1.5 Enteropatogenní kmeny**

### **1.5.1 Enteropatogenní EPEC**

Často vyvolávají novorozenecké průjmy, kdy dochází k dehydrataci při vodnatých průjmech, případně 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.

### **1.5.2 Enterotoxigenní ETEC**

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.

### **1.5.3 Enteroinvazivní EIEC**

Pronikají do buněk, kde se množí. Onemocnění probíhá pod obrazem bacilární dysentérie.

### **1.5.4 Enterohemoragické EHEC (*E. coli* O157:H7)**

Adhezují převážně v tlustém střevě. Produkují toxin označovaný jako shigatoxin nebo verotoxin. Způsobují hemoragickou kolitidu, která může přejít v hemolyticko-uremický syndrom (HUS). Zdrojem nákazy je především infikované hovězí maso. Onemocnění se vyskytuje v dětském věku, a to nejen v rozvojových zemích. Kmeny byly zachyceny i v České republice (Bednář et al., 1996).

## **1.6 Onemocnění**

### **1.6.1 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).

**Tabulka 1 Původci močových infekcí**

<b>Původce</b>	<b>%</b>	<b>Specifická situace</b>
<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

Historie: Už v dávné Číně se používaly obklady z plesnivého sójového mléka. První zmínky o používání antibiotik se objevily už v Egyptě u Núbijců. První vědecké zkoumání učinil Louis Pasteur 1877. V průběhu let se zjistilo, že antimikrobiální účinky má výluh z kolonie, ale to bylo vysoce toxické a nemohlo se to používat dlouhodobě. Doktor Ernest Duchensne zaznamenal, že plíseň (rod štětičkovci) mají antimikrobiální účinky. Jeho výzkum byl bohužel zapomenut. Proto je za prvního objevitele antibiotik považován Alexander Fleming. Během svého výzkumu kultivoval mikroorganismy na agarových půdách. Zjistil, že půda, která byla napadená plísní druhu *Penicillium notatum*, vytvořila zóny bez růstu bakterií. Pochopil, že plíseň vylučuje něco, co hubí mikroorganismy. Neuměl však izolovat účinnou látku (beta – laktamová kruh). Svůj objev popsal v roce 1929. Howard Walter Florey se zabýval rafinací penicilinu a úspěšně během 2. světové války vyprodukoval dostatečné množství aktivní složky, která se dále použila v klinické praxi. Další výzkum vedl k objevení dalších antibiotik a lidé tak mohli používat proti mikroorganismům chemické látky, které dříve neznali. (Wikipedia, 2018e)

### 2.1 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, mají různé chemické povahy. ATB se třídí do skupin, kde je název skupiny odvozen od povahy ATB (Schindler, 2014).



## **2.2 Rozdělení antibiotik**

### **2.2.1 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. Středně širokospektré ATB, příkladem může být penicilín, který 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).

### **2.2.2 Podle intenzity účinku**

Primárně rozlišujeme ATB 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, bakterie usmrcují. 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).

### **2.2.3 Podle místa a mechanismu účinku**

Jedna z klasifikací ATB je podle toho, jak působí na bakterii. Mohou působit na buněčnou stěnu tím, že ji inhibují. Často to dělají beta-laktamová ATB, například 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 baktericidní 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).

Dále jsou to ATB inhibující transkripci, kdy narušují prostorové uspořádání DNA nebo brání zahájení tvorby řetězců.

Dalším druhem jsou ATB, která narušují uplatnění růstových faktorů. Příkladem mohou být sulfoamidy a trimethoprim (Zahradnický, 1982).

## **2.2.4 Podle chemické struktury**

### **2.2.4.1 Beta – laktamová ATB**

Jsou to nejvyužívanější ATB. Ve strukturálním jádru mají beta - laktamový kruh, který svou schopností průchodu do buněčné stěny představuje základní podmínku účinnosti. ATB se vážou na enzymy, které katalyzují tvorbu buněčné stěny. Touto vazbou je narušena syntéza peptidoglykanu. Buňka ztrácí pevnost a osmotickou stabilitu a během jedné nebo několika mála generací zaniká. Při vzniku rezistence se tvoří enzym, který hydrolyticky otevírá beta-laktamovou vazbu a tím ATB inaktivují. Enzym se obecně nazývá beta-laktamáza. Podle svého zaměření se dělí na penicilinázy, cefalosporinázy a širokospektré enzymy, které účinkují jak na peniciliny, tak na cefalosporiny. V malém rozsahu se uplatňuje rezistence podmíněná zhoršováním podmínek pro průnik antibiotik buněčnou stěnou. Další mechanismus může spočívat ve změně citlivosti cílových enzymů vůči účinku beta-laktamového antibiotika (Modr, 1995).

## **Peniciliny**

Hlavní strukturou penicilinů 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 baktericidní působení a malá obecná toxicita podmíněná selektivním ovlivněním cílových struktur nacházejících se u hostitele, tím se umožňuje podání penicilinů 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. Augmentin, což je originální preparát obsahující Amoxicilin + kyselinu klavunovou (Aktuální příbalový leták Augmentin 1 g), se používá u ambulantních pacientů na lokalizované bakteriální infekce, chlamydiové infekce, ale také k léčbě akné. Hojně se využívá i generikum Amoksiklav (Aktuální příbalový leták Amoksilav 1 g), které léčí na stejném principu jako Augmentin. Má široké využití. Narušuje bakteriální stěnu (Štefánek, 2008).

### **Cefalosporiny**

Hlavní složkou je kyselina 7-aminocefalosporinová. V dnešní době se tyto látky připravují průmyslově (Hynie Sixtus, 2003). Toxické jsou jen málo, ale často se na ně objevují alergie. Cefalosporiny se rozdělují na látky 1.–4. generace. Pojmenování je podle období, kdy jednotlivé látky byly připraveny, ale hlavně podle odolnosti proti beta-laktamázám (Hynie, 2001).

Cefalosporiny 1. generace jsou účinné proti G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> kokům. Odolnost proti beta-laktamázám je vyhovující.

Cefalosporiny 2. generace jsou účinné hlavně proti G<sup>-</sup> kokům. Příkladem může být Cefuroxim. Cefuroxim narušuje schopnost vytvářet buněčnou stěnu. Mezi nežádoucí účinky patří bolest hlavy, nechutenství, alergické reakce.

Cefalosporiny 3. generace mají výrazně nižší účinnost na G<sup>+</sup>, ale výrazně vyšší na G<sup>-</sup> bakterie (Krčméry, 1994).

Cefalosporiny 4. generace jsou účinné na G<sup>+</sup> i G<sup>-</sup>, jejich předností je rezistence proti beta-laktamázám. Rychle se vstřebávají do buněčné stěny a tím nemohou být hydrolyzovány nebo vyvázány beta-laktamázami. Zástupcem cefalosporinů 4. generace je Cefepim, který je obsažený v léčivém přípravku MAXIPIME. Používá se u infekcí a využívá se jako empirická terapie febrilní neutropénii (Aktuální příbalový leták).

Nejnovější cefalosporinové ATB je ZINFORO, které obsahuje léčivou látku Ceftarolinum. Patří do skupiny cefalosporinů 5. generace. Je velice účinné proti G<sup>+</sup>,

především pak proti *Stafylococcus aureus*. Slabší účinek má na G- bakterie (Wikipedia, 2018a).

Důležitým zástupcem pro naše využití je Cefotaxime (cefalosporin 3. generace) a Ceftadizim (cefalosporin 3. generace). Cefotaxime obsahují léčivou látku chemotaxim, který 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. Ceftadizim má účinnou látku ceftadizim, který narušuje schopnost bakteriálních buněk tvořit buněčnou stěnu, tím je hubí. Má široké spektrum účinku a funguje proti mnoha bakteriím. Využívá se hlavně u komplikovaných zánětů, např. zánětu mozkových blan, močové infekce, zápalu plic a především u infekcí způsobených *Pseudomonas aeruginosa*, jedná se o tzv. antipseudomonádová ATB apod. (Štefánek, 2008).

### **Karbapenemy**

Jsou výrazně rezistentní proti beta-laktamázám. Mají mimořádně široké spektrum účinku. Působí proti G+, G- i anaerobním bakteriím (Hynie, 2003). Kromě běžné alergické reakce mohou při nesprávné dávce vyvolávat zvracení, křeče a neutropénii. Mohou navodit superinfekci (Modr, 1993). Jako zástupce může být Carbapenem, je to ATB, které patří do skupiny širokospektrálních ATB. Inhibují specifické proteiny pro tvorbu buněčné stěny. Používá se při infekcích ledvin. Je mírně toxický, může vyvolat nevolnost a zvracení (Hellinger et al, 1999).

#### **2.2.4.2 Chinolová ATB**

Chinolová ATB jsou synteticky vyráběná. Mají baktericidní účinky. Inhibují DNA gyrázy, které udržují prostorové uspořádání DNA (Krčméry, 1994). Chinolová ATB lze rozdělit do tří generací. Rozdělení je založeno na rozsahu šíře spektra. Nefluorované chinolony působí bakteriocidně proti běžným infekcím G- bakterií, jako jsou močové infekce. Fluórované chinolony zabraňují infekcím G+ a G- bakterií. Pro nás důležití zástupci jsou Ofloxin a Ciprofloxacin. V další generaci jsou fluorované chinolony s rozšířeným spektrem účinku, které lze aplikovat na rezistentní bakterie vyvolávající infekce. Tato ATB se dobře vstřebávají do tkání a jsou vylučována močí. Bývají dobře snášena. Občas mohou vyvolávat nauzeu, průjmky, závratě, vyrážku a fotosenzitivitu

(Modr, 1993). Ofloxin a Ciprofloxacin jsou ATB, která obsahují léčivou látku ofloxacin a ciprofloxacin, které blokují specifické enzymy nutné pro reparaci bakteriální DNA. Díky tomu je porušeno množení bakterií. Nevhodné je pro těhotné a kojící ženy. Často se používají při infekcích trávicího traktu a gynekologických infekcích (Štefánek, 2008).

#### **2.2.4.3 Nitrofuránová ATB**

Nitrofurantoin je hlavní představitel nitrofuránových ATB. Působí bakteriostaticky na G+ i G- bakterie, které způsobují infekci močových cest (Modr, 1993). Po podání v těle tvoří spoustu reaktivních metabolitů, které poškozují DNA.

#### **2.2.4.4 Sulfonamidová a pyridinová ATB**

Sulfonamidy jsou strukturálně podobné p-aminobenzoové kyselině, která je růstovým faktorem spousty mikroorganismů. Jsou to bakteriostaticky účinná ATB se širokým spektrem účinnosti. Používají se především k léčbě močových infekcí a k infekcím dolních a horních močových cest. Často nežádoucí účinky jsou intersticiální potíže, poruchy ledvin, poruchy krve tvorby, toxická hepatitida apod., např. Triprim (Hynie, 2003). Triprim má účinnou látku trimethoprim, která blokuje bakteriální enzymy, potřebné pro tvorbu kyseliny listové, která funguje jako růstový faktor. Její inhibicí se zpomaluje bakteriální množení (Štefánek, 2008).

#### **2.2.4.5 Aminoglykosidová ATB**

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).

Používaným aminoglykosidovým ATB je např. Gentamicin a Amikacin.

Gentamicin obsahuje účinnou látku gentamicin, který má schopnost narušovat syntézu bílkovin a narušuje buněčnou stěnu. Bakterie zabíjí bakterie nebo zabraňuje jejich množení. Používá se při sepsi v kombinaci s jinými ATB.

Amikacin má schopnost narušovat proteosyntézu bakterií a narušuje bakteriální stěnu. Používá se u hospitalizovaných lidí, a to ve formě injekcí při sepsi a těžkých infekcích. Může mít nefrotoxické a ototoxické účinky (Štefánek, 2008).

Fosfomycin je indikován při zánětu močových cest. Patří do skupiny chemoterapeutik. Je bakteriocidní a narušuje bakteriální stěnu a inaktivuje enzymy. Účinný je proti G- i G+ bakteriím (Wikipedia, 2018b).

### **2.3 Nežádoucí účinky antibiotik**

#### **2.3.1 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).

#### **2.3.2 Potlačení normální mikroflóry**

Některá širokospektrá ATB mohou vyhubit přirozenou mikroflóru, což se často projevuje průjmy nebo superinfekcí rezistentních bakterií.

#### **2.3.3 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.

#### **2.3.4 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).

#### **2.3.5 Rezistence**

Selekční tlak může pozměnit genom bakterií a tím urychlit evoluci. Tímto způsobem vzniká sekundární rezistence. Primární rezistence je dána geneticky, kdy jsou mikroorganismy necitlivé na antibiotika. Zde nezáleží na tom, zdali se s antibiotikem setkaly, či nikoli (Martínková et al., 2007).

## **3 Rezistence bakterií na antibiotika**

### **3.1 Vrozená primární a získaná rezistence**

Přirozená rezistence je poměrně vzácná. Odvíjí se od různých kmenů bakterií a jejich přirozených vlastností. Bakterie jsou rezistentní bez změny genomu. ATB jsou neúčinná, protože nenesou zásahové místo. Příkladem mohou být G- bakterie, které jsou méně citlivé k ATB než G+ bakterie na penicilínové ATB. Přirozená vícenásobná rezistence se může objevit u mikroorganismů, které byly vystaveny účinku ATB (voda, půda).

Získaná (sekundární) rezistence (častá) je důsledkem mutací a změnami genomu. Bakterie začnou být odolné k antibiotikům, která je předtím usmrcovala (Spížek, 1999). Působením ATB se postupně rozdělí populace odolná proti ATB, která slouží jako zásoba rezistentních genů. Velice škodlivé je podávání nízkých koncentrací ATB, protože nezabijí všechny bakterie a tím dávají možnost k přežití rezistentním mutantům (Rozsypal, 2015).

### **3.2 Příčiny rezistence**

#### **3.2.1 Změna průchodnosti buněčných obalů**

Obal má dvě buněčné membrány, a to vnitřní a vnější. Pomocí membrány získává mikroorganismus živiny a probíhá zde látková výměna. I když G+ bakterie mají silnou buněčnou stěnu, pro ATB to není překážka. Problém zůstává u G- bakterií, které mají buněčnou stěnu tvořenou z fosfolipidů. Fosfolipidy a lipopolysacharidy tvoří klasickou fosfolipidovou dvojvrstvu, která má hydrofobní účinky. Tím brání průniku hydrofilních i hydrofobních ATB. Hydrofobní ATB vstupují do buněk G- napříč tukovou vrstvou membrány. Husté uspořádání může průchod ATB mechanicky zastavit. Hydrofilní ATB (většina) procházejí dovnitř pomocí membránových proteinů (poriny), které tvoří membránové kanálky. Některé rezistence mohou vzniknout tím, že je snížena koncentrace porinů.

#### **3.2.2 Zneškodnění ATB enzymy**

Například beta-laktamová ATB (cefalosporiny, penicilíny). Rezistentní mikroorganismy produkují enzym beta-laktamázu. Beta-laktamáza štěpí beta-laktamový kruh v místě,

kde se nachází aminokyselina serin. Tím je porušena účinnost ATB. Neváže se na zásahové místo.

### **3.2.3 Vypuzení ATB**

Je to aktivní děj, kdy je vypuzení ATB způsobeno membránovými proteiny Tet. Pro tento způsob rezistence jsou typické tetracyklinová a některá chinolová ATB. Takto se bakterie mohou bránit některým dezinfekčním prostředkům a těžkým kovům. Tato rezistence je poměrně častá.

### **3.2.4 Změna zásahového místa**

Toto způsobí, že se ATB nenaváže, např. penicilínová ATB. Bakterie mají několik vazebných míst pro penicilínové proteiny. Buňky tato vazebná místa potřebují (jedná se o enzymy) pro proteosyntézu buněčné stěny a pro buněčný růst. Tato ATB zastavují aktivitu vazebné bílkoviny a zabraňují buněčnému růstu a dělení. V důsledku je poškozená buněčná stěna a dochází k lýze mikroorganismu.

### **3.2.5 AmpC beta-laktamázy**

Je enzym, který je kódován na chromozomu či plazmidu enterobakterií a některých dalších bakterií. Klinický význam má, že vytváří rezistenci proti penicilínům, cefalosporinům I.–III. generace i kombinaci těchto antibiotik s inhibicí beta-laktamáz. Mohou přenášet ve spojení s plazmidy rezistenci na další druhy antibiotik (karbapenemů). Souvisí to s mutací. Výskyt produkce AmpC enzymu u mikroorganismů vyvolávající onemocnění je nižší než u EMBL enzymů, avšak dlouho byla přítomnost AmpC kmenů podhodnocována, protože chyběl správný diagnostický postup pro identifikaci produkce AmpC enzymu (Schréterová et al., 2014a).

### **3.2.6 EMBL rozšířené spektrum beta-laktamázy**

Jsou to enzymy produkované zejména *E. coli* a *Klebsiela spp.* EMBL kmeny mohou způsobit vážná onemocnění. Často jsou odolné proti ATB včetně penicilínů a cefalosporinů (Surrey and Sussex Healthcare NHS, 2016).

Širokospektrální beta-laktamázy vznikají změnou sekvencí aminokyselin úzkospektrálních beta-laktamáz. Změna katalytického místa umožňuje hydrolyzovat větší molekuly a tím inaktivovat penicilíny, cefalosporiny I.–IV. Generace,



ale nedokážou inaktivovat karbapenemy. Pevnou vazbu s katalytickým místem inaktivují inhibitory beta-laktamáz (kyselina klavulanová). V dnešní době (2014) známe přes 300 typů ESBL (Schréterová et al., 2014b).

### **3.2.7 Genetická podstata získané rezistence**

Získaná rezistence vzniká v důsledku mutací ovlivňujících geny nebo tím, že bakterie získá geny proti rezistenci z původní (citlivé) bakterie. U bodové mutace může dojít k delecii, substituci či adici páru bází v DNA (deoxyribonukleová kyselina), tím se změní jedna nebo více aminokyselin v peptidové struktuře. Jde o přenos rezistence na bakterie, které byly citlivé k ATB. Pomocí plazmidů, což jsou nezávisle se replikující molekuly DNA, které mohou být i mimo chromozóm a tím mohou nést rezistenci proti ATB. Přenášejí se konjugací, transdukcí pomocí bakteriofágů nebo transformací DNA bez nosiče. Přenos konjugací je v přírodě častý. Plazmidy mají omezené spektrum hostitelů. Další způsob je pomocí transpozonu, což jsou specifické části DNA, jež se mohou pohybovat z jedné replikační jednotky na druhou. Mohou kódovat rezistenci v širokém spektru ATB. Nesou i řadu jiných vlastností. Poslední možností přenosu jsou genové kazety obsahující jeden gen kódující rezistenci pouze proti jednomu ATB. Pohyb rezistenčních genů umožňuje vnesení a vytržení integronů (Spížek, 1999).

### **3.3 Multirezistence**

Mikrobi mohou být rezistentní k několika příbuzným ATB, jedná se o tzv. zkříženou rezistenci. Rezistentní mohou být mikrobi i na ATB, která mají podobnou chemickou strukturu. Jedná se o kumulaci různých mechanismů a v takovém případě hrají roli geny. Multirezistence je často způsobená genem *mar*, který je do značné míry univerzální. Bakterie mají proteiny, jež dokáží vypudit tetracyklin z buňky mechanismem nazývaným nespecifický eflux. Genů *mar* je několik desítek a jsou nejčastější příčinou rezistence. Kombinovaná rezistence na cefalosporiny 3. generace, Aminoglykosidů a Fluorochinolonům u *E. coli* stoupá, a to u 40 % kmenů. To je velice znepokojující.

### **3.4 Dozor (surveillance) a monitorování rezistence**

Po světě existují zařízení, která sledují rezistenci. V České republice to sleduje NRL u invazivních kmenů. Dozor (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 a hypotézy**

Cíl mé práce spočívá v nashromáždění informací o rezistenci *Escherichia coli* na vybraná antibiotika, poukázat na jejich špatné užívání a dokázat, že tento problém by se měl začít řešit.

Hypotéza č. 1: Bude více dospělých pacientů než dětí.

Hypotéza č. 2: Děti budou mít méně rezistentních kmenů.

Hypotéza č. 3: Z rezistentních kmenů bude více než 50 % na vybraná antibiotika.

## 5 Metodika

Data mám nashromážděna za rok 2016 z Nemocnice Písek, a.s., kde jsem je měla k dispozici a následně jsem je zpracovala statisticky. Prakticky jsem si vyzkoušela určení mikroba a jeho zařazení. Pomocí chí kvadrátu jsem určila, že rezistence na ATB není pouze náhodný, nevysvětlitelný jev, naopak se jedná o jev statisticky významný.

### 5.1 *Kultivace*

#### 5.1.1 *Mueller – Hinton agar (MHA)*

Je to kultivační půda vhodná 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, tetracyklíny) (Aryal, 2015).

#### 5.1.2 *Endova půda*

Je to půda světle růžové barvy. Potlačuje růst G+. Dále dělí bakterie podle toho, zda jsou pozitivní na laktózu, kdy se začnou tvořit aldehydy, které reagují s fuchsinem v Endově půdě za tvorby Schiffových bází, a kolonie se zbarví do tmavě růžové (viz příloha Obrázek 1). Bakterie, které jsou laktóza negativní, mají svou původní barvu.

#### 5.1.3 *Deoxycholát – citrátový agar (DC)*

Opět je to půda potlačující růst G+. Bakterie, které štěpí laktózu, mají růžové až červené zbarvení. Obsahuje thiosíran sodný, který vytvoří na koloniích černé špičky (Salmonela, Citrobacter). DC agar potlačuje plazivý růst protea.

#### 5.1.4 *Krevní agar Columbia (KA)*

Tmavě červené kultivační médium obsahuje 5 % beraní krve. Používá se na všechny typy vzorků. (BioVendor, 2013) Rostou na něm G+ i G- bakterie. KA je vhodný pro odlišení hemolytických bakterií (WikiSkripta, 2017). 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 – vidirace = tvoří se meziprodukty a agar se okolo kolonií barví zelenohnědě, Beta hemolýza – úplná = v okolí kolonií je projasněný agar, Gama hemolýza = bez změny (Smíšek, 2008).

### 5.1.5 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).

## 5.2 Biochemické testy

Po kultivaci je důležité bližší určení mikroba. V dnešní době máme 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 příště přítomen stejný kmen.

### 5.2.1 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 reagentie (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 parafinového 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).

#### **5.2.2 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).

### **5.2.3 VP test (Voges – Proskareův 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 ( $\alpha$  – naftol) a VP II (alkalické prostředí) (viz příloha Obrázek 8), v případě tvorby acetoinu vznikne červené zbarvení. VP test je určen pro rychlou detekci produkce acetoinu, slouží jako dodatekový 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).

### 5.3 Stanovení citlivosti

Difúzní metody (kvalitativní metody): Zjistíme přímo citlivost, či necitlivost na vybrané antibiotikum. Principem je difúze antibiotik do agaru s naočkovanými bakteriemi. Dochází ke vzniku inhibičních zón v případě citlivosti k vybranému ATB. Mezi tyto metody patří diskový difúzní test.

Diluční metody (kvantitativní): S jejich pomocí se dozvíme minimální inhibiční koncentraci MIC. MIC je koncentrace ATB, která je schopna zastavit růst bakterií. Principem je inhibice růstu v určité koncentraci ATB (WikiSkripta, 2018).

#### 5.3.1 ESBL MAST test

##### **Princip a použití**

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

Princip: jako indikátorové antibiotikum může být použit cefoxitin. Toto ATB velmi dobře hydrolyzuje většinu AmpC beta-laktamázy. 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 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 agarů umístíme disky soupravy MAST DISC – ABCD (viz příloha Obrázek 9) pomocí jehly ve vzdálenosti 2 cm od sebe.

## **Hodnocení**

Provádí lékař. 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).

### **5.3.2 Diskový difuzní test**

#### **Princip a použití**

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

Princip: vyšetřovaná čistá kolonie se naočkuje po celé ploše kultivačního média (MHA). Poté se položí papírové disky obsahující antibiotika. Antibiotikum difunduje do agarů 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).

### **5.3.3 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.

Princip: je hodnocení minimální inhibiční koncentrace (MIC) v jamkách mikrotitrační 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 suspenzní medium MIC přidáme 60  $\mu$ l bakteriální suspenze (0,5 McF).
4. Do dávkovací vaničky vylijeme celé množství média ze zkumavky s bakteriální suspenzí, příslušnou destičku pipetujeme osmikanálovou pipetou, 100  $\mu$ l 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 – 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).

## 6 Výsledky

Pro svou práci jsem využila oddělení Klinické mikrobiologie, Nemocnice Písek a. s. Celkem jsem měla k dispozici 3 245 odběrů a bylo provedeno 8 491 citlivostí na vybraná ATB, kde jsem měla určený bakteriální kmen. Sama jsem si prakticky vyzkoušela určit kmen *E. coli* a určit citlivost k vybraným ATB. Většinu dat pro můj výzkum jsem získala v laboratorní databázi vyšetření. Kultivace byly vždy provedené z moče.

**Tabulka 2 Přehled citlivostí a rezistencí rozdělených podle skupin**

Antibiotikum	Skupina							
	Dospělí				Děti			
	rezistentní	citlivé	% rezistentních kmenů	celkový počet vyšetřovaných	rezistentní	citlivé	% rezistentních kmenů	celkový počet vyšetřovaných
Amoxicilin	596	635	48,42%	1 231	70	84	45,45%	154
Amoxicilin + klavulanát	237	1 050	18,41%	1 287	12	140	7,89%	152
Ampicilin	95	5	95,00%	100	1	0	100,00%	1
Ampicilin + sulbaktam	85	17	83,33%	102	1	0	100,00%	1
Aztreonam	69	21	76,67%	90	1	0	100,00%	1
Cefuroxim	120	308	28,04%	428	4	147	2,65%	151
Gentamicin	70	328	17,59%	398	7	142	4,70%	149
Trimetoprim + sulfonamid	604	1 478	29,01%	2 082	54	99	35,29%	153
Nitrofurantoin	37	1 807	2,01%	1 844	1	153	0,65%	154
Trimetoprim	9	2	81,82%	11	2	0	100,00%	2

Zdroj: vlastní výzkum

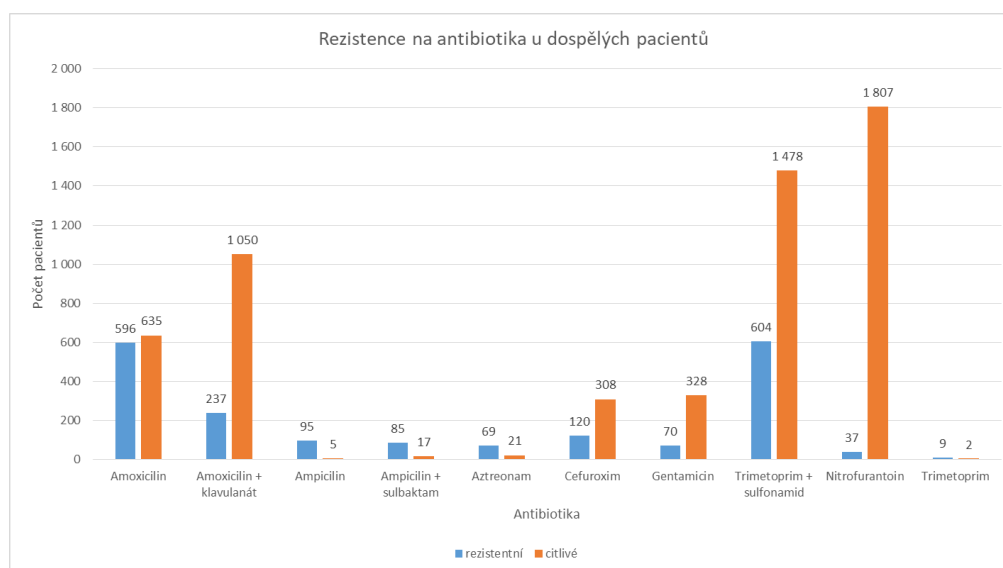
V tabulce 2 vidíme, že většina pacientů byli dospělí. U dospělých pacientů převládá rezistence na ATB, kdy rezistentní kmeny mají zastoupení v 25,37 % u dospělých osob a u dětí je 16,66 %, což bych zhodnotila jako alarmující fakt. Menší počet rezistentních kmenů u dětí by se dal připsat tomu, že mají menší výběr ohledně antibiotik a podle tabulky méně trpí infekcemi způsobenými *E. coli*.

**Tabulka 3 Celkový počet citlivostí a rezistencí *E. coli* za rok 2016, vykultivované z moče**

Antibiotikum	Suma			
	rezistentní	citlivé	% rezistentních kmenů	celkový počet vyšetřovaných
Amoxicilin	666	719	48,09%	1 385
Amoxicilin + klavulanát	249	1 190	17,30%	1 439
Ampicilin	96	5	95,05%	101
Ampicilin + sulbaktam	86	17	83,50%	103
Aztreonam	70	21	76,92%	91
Cefuroxim	124	455	21,42%	579
Gentamicin	77	470	14,08%	547
Trimetoprim + sulfonamid	658	1 577	29,44%	2 235
Nitrofurantoin	38	1 960	1,90%	1 998
Trimetoprim	11	2	84,62%	13

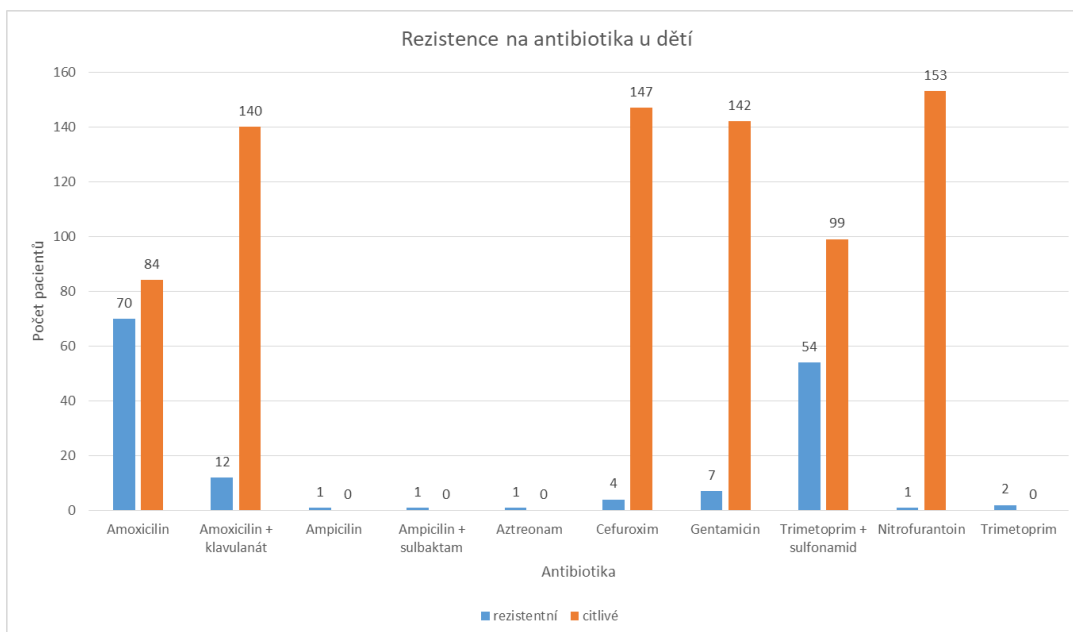
Zdroj: vlastní výzkum

Tabulka 3 obsahuje celkový počet rezistentních kmenů na vybraná antibiotika za rok 2016 u obou skupin. Celkem bylo provedeno 8 491 vyšetření. Z toho 2 075 se jeví jako rezistentní, což je skoro ¼ vyšetření (24,43 %). 6 416 (75,56 %) případů bylo citlivých na ATB.



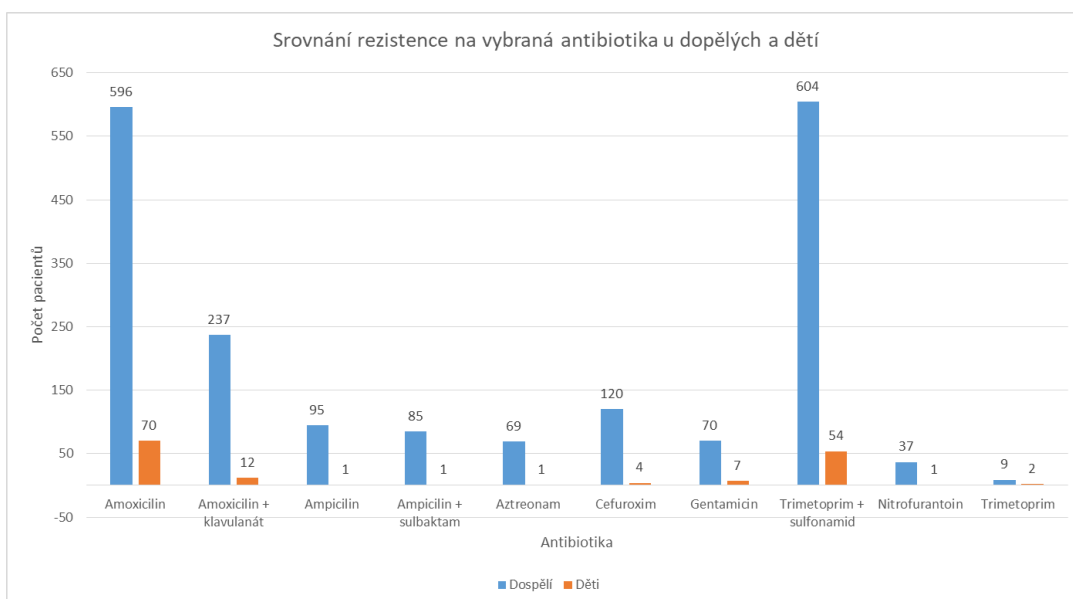
**Obrázek 1 Rezistence na vybraná ATB u dospělých pacientů**

Zdroj: vlastní výzkum



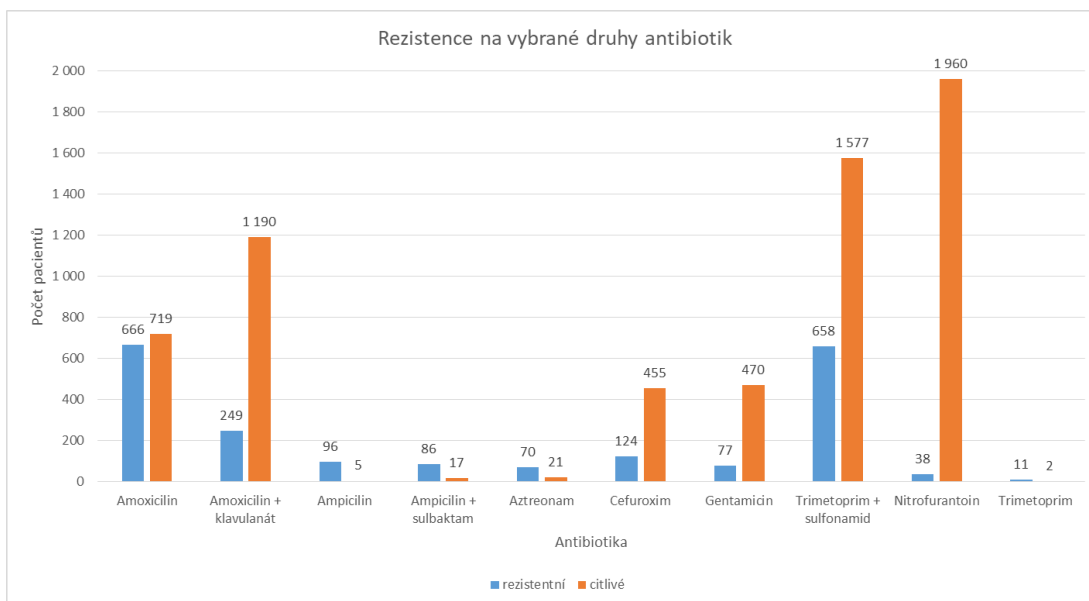
**Obrázek 2 Rezistence na ATB u dětí**

Zdroj: vlastní výzkum



**Obrázek 3 Srovnání rezistencí u dětí a dospělých**

Zdroj: vlastní výzkum



**Obrázek 4 Celkový poměr rezistentních a citlivých kmenů za rok 2016**

Zdroj: vlastní výzkum

**Tabulka 4 Pozorované (empirické) četnosti  $n_{ij}$**

	Amoxicilin	Amoxicilin + klavulanát	Ampicilin	Ampicilin + sulbaktam	Aztreonam	Cefuroxim	Gentamicin	Trimetoprim + sulfonamid	Nitrofurantion	Trimetoprim	součty $n_{i.}$
Rezistentní	666	249	96	86	70	124	77	658	38	11	2 075
Citliví	719	1 190	5	17	21	455	470	1 577	1 960	2	6 416
součty $n_{.j}$	1 385	1 439	101	103	91	579	547	2 235	1 998	13	8 491

Zdroj: vlastní výzkum

**Tabulka 5 Teoretické četnosti  $e_{ij}$**

	Amoxicilin	Amoxicilin + klavulanát	Ampicilin	Ampicilin + sulbaktam	Aztreonam	Cefuroxim	Gentamicin	Trimetoprim + sulfonamid	Nitrofurantion	Trimetoprim
Rezistentní	338,46	351,66	24,68	25,17	22,24	141,49	133,67	546,18	488,26	3,18
Citliví	1 046,54	1 087,34	76,32	77,83	68,76	437,51	413,33	1 688,82	1 509,74	9,82

Zdroj: vlastní výzkum

**Tabulka 6 Tabulka testovaného kritéria  $K_{ij}$**

	Amoxicilin	Amoxicilin + klavulanát	Ampicilin	Ampicilin + sulbaktam	Aztreonam	Cefuroxim	Gentamicin	Trimetoprim + sulfonamid	Nitrofurantion	Trimetoprim
Rezistentní	316,97	29,97	206,07	147,00	102,58	2,16	24,03	22,89	415,22	19,26
Citliví	102,51	9,69	66,65	47,54	33,18	0,70	7,77	7,40	134,29	6,23

Zdroj: vlastní výzkum

Hodnotu chí – kvadrát jsem spočítala součtem  $K_{ij}$ . Vyhodnotila jsem pravděpodobnost, že hodnota chí-kvadrát nebyla pouze výsledkem náhodných jevů.

Chi – sp = 1 702,12

p – value = 0,00

Z toho vyplývá, že výsledek je 0, což znamená 0,00 %. To je méně než kritérium posuzování hypotéz (5 %). Je tedy menší pravděpodobnost než 5 % (konkrétně 0,00 %), že mé měření četností by vzniklo náhodou (to znamená vlivem malých neidentifikovatelných jevů). Proto nultou ( $H_0$ ) hypotézu, že jsou proměnné nezávislé, zamítám a přijmu alternativní hypotézu. Alternativní hypotéza: Statisticky významný vliv rezistence antibiotik na výsledek existuje. Výsledky měření lze brát jako relevantní.



## 7 Diskuze

V dnešní době se zvyšuje počet rezistentních kmenů. Nejčastěji je to způsobeno nesprávným užíváním antibiotik. Antibiotika se využívají k léčbě, kde jsou naprosto zbytečná. Příkladem mohou být virová onemocnění. Podle mého výzkumu přibližně ¼ ze všech vyšetření *E. coli* byla rezistentní na vybraná ATB za rok 2016.

Pro určení kmenů *E. coli* jsem využila několika biochemických testů pro určení druhu a kmenu bakterie. V první řadě jsem je vykultivovala z odebraného vzorku, v mém případě z moče. Pro identifikace středních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* jsem využila ENTERO test 24N, kdy se strip obsahující lyofilizované substráty naočkováním suspenzí vyšetřované bakterie ustálí a během inkubace dojde ke změně zbarvení. Reakce se vyhodnotí v počítačovém programu (Příbalový leták k testu ENTERO test 24N).

Po zjištění čeledi, v mém případě šlo o *E. coli*, se provádí INDOL test, který nám pomůže blíže určit kmen *E.coli* podle toho, zda reakce vyjde indol pozitivní, či indol negativní (Příbalový leták INDOL test).

VP proužek obsahuje pyruvát sodný, který reaguje při tvorbě acetoinu. Proužek se ponoří do suspenze vyšetřované bakterie, po uplynutí inkubační doby se zakápnou VP I. a VP II. činidlem. V případě tvorby acetoinu vznikne červené zbarvení (Příbalový leták VP test).

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 většina 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 inhibitory 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 (Příbalový leták ESBL MAST test).

Ke stanovení citlivosti jsem použila diskový difúzní test. Suspenzi vyšetřovaného kmene jsem si naředila a naočkovala na MHA. Pomocí raznice jsem položila antibiotické disky. Po inkubaci jsme odečetla IZ.

Pro hodnocení minimální inhibiční koncentrace (MIC) v jamkách mikrotitrační destičky, které obsahují zvolené koncentrace antibiotik, se naočkují suspenze bakterií a po uplynutí inkubační doby se odečítá MIC jako nejnižší množství antibiotika, které inhibuje viditelný růst (Příbalový leták M. I. C. test).

Ve své bakalářské práci jsem se zaměřila na *E. coli* kultivovanou z moče. Pro svůj výzkum jsem využila data z laboratoře oddělení Klinické mikrobiologie Nemocnice Písek, a.s. Celkem jsem měla k dispozici 3245 pacientů a 8491 testů citlivostí za rok 2016. Vybrala jsem si několik druhů ATB.

Jako první ATB je Amoxicilin, kdy bylo provedeno 1 231 vyšetření. Z toho bylo 635 citlivých kmenů a u 596 vyšetření byla zjištěna antibiotická rezistence. Poměr rezistentních kmenů je tedy 48,42 %. Při stanovení citlivosti Amoxicilinu je používán amplicinový disk a výsledek je totožný pro Amoxicilin bez klavulanátu. U dětí byl Amoxicilin zkoumán ve 154 případech. Z toho bylo 84 citlivých a 70 rezistentních. Poměr rezistentních kmenů je 45,45 %, což je podobné jako u dospělých pacientů. Amoxicilin se používá především pro léčbu lokálních zánětů (sinusitida, tonzilitida, bronchitida, záněty středního ucha, záněty močového ústrojí). Též se používá k léčbě akné (Wikipedia, 2018c). Amoxicilin + klavulanát byl použit v 1 287 případech. 1 050 testů vyšlo jako citlivých a 237 bylo rezistentních, v poměru rezistentních kmenů je to 18,41 %. U dětí bylo provedeno 152 vyšetření, z toho 140 vyšlo citlivých a pouze 12 jako rezistentní. V poměru rezistentních kmenů je to 7,89 %.

Amplicin byl testován u 100 pacientů. U 95 pacientů byl rezistentní a u pouhých 5 účinný. Z toho vyplývá, že poměr rezistentních kmenů je celých 95 %. U dětí byl použit pouze jednou, a to neúčinně. Amplicin se ve zdravotnických zařízeních používá na bakteriální záněty (Drugs.com, 2000–2018).

Amplicin + sulbaktam byly použity u 102 pacientů, z toho 85 bylo rezistentních a 17 citlivých. Ani s pomocnou látkou to nejsou lepší výsledky. U dětí byl použit jednou a opět neúčinně. U Amoxicilinu i Amplicinu se často objevuje rezistence, což potvrzuje

i můj výzkum. Proto by si měl lékař předem rozmyslet, zda je správné tato ATB indikovat (Beneš, 2009).

Aztreonam, v 69 případech byla prokázána antibiotická rezistence a ve 21 případech by byl účinný, to je 76,67 % rezistentních kmenů. Aztreonam se v nemocnici Písek a.s. nepoužívá, ale považoval za zajímavé se o něm zmínit, protože má vysokou antibiotickou rezistenci.

Cefuroxim (Xorimax) je účinný na G+ i G- bakterie. Rozšířená je rezistence u *Enterobacteriaceae* jako *E. coli* či *Klebsiella spp.* produkující ESBL (Maňasková, 2010). Bylo provedeno 428 testů. Z toho 120 bylo na vybrané antibiotikum rezistentních a 308 citlivých. Poměr rezistentních kmenů je 28,04 %, proto Cefuroxim patří mezi 4 vybraná antibiotika s nejnižším procentem rezistentních kmenů. U dětí byla provedena citlivost u 151 případů a z toho 4 byly rezistentní a 147 citlivých. Cefuroxim je vhodný pro děti. Poměr rezistentních dětských kmenů je 2,65 %.

Gentamicin dopadl dobře. Z 398 vyšetření vyšlo 70 rezistentních a 328 citlivých. Počet rezistentních kmenů je tedy 17,59 %. U dětských pacientů bylo provedeno 149 vyšetření a z toho 7 bylo rezistentních a 142 citlivých, poměr rezistentních pacientů je 4,70 %. Používá se při sepsi i u novorozenců, při opakovaných závažných infekcích močových cest, u břišních infekcí či popálenin (Příbalová informace Gentamicin LEK).

Trimetroprim + sulfonamid (MEDITEK TRISULFA 240) působí baktericidně. Rezistence může být způsobena dlouhodobým a častým užíváním (Příbalový leták MEDITEK TRISULFA 240). V mém výzkumu nedopadl nejhůř, poměr rezistentních kmenů byl 29,01 % a počet vyšetření byl 2082, z toho 604 rezistentních a 1 478 citlivých. U dětí bylo provedeno vyšetření u 153 pacientů a rezistentních bylo 54 a 99 citlivých. Poměr rezistentních kmenů je 35,29 %, což je podle mě je dost vysoké číslo, v mém výzkumu u dětských pacientů dopadl nejhůře.

Trimethoprim patří do skupiny chemoterapeutik (jsou chemického původu). a působí bakteriostaticky. Používá se při akutních i chronických infekcích močového ústrojí a ledvin, při infekcích trávicího systému, ale i infekce dýchacího systému. Vhodný je pro děti od 5 let věku, mladistvé a dospělé (Příbalový leták Triprim 200 mg). Byl použit pouze v 11 případech a z toho 9 bylo rezistentních a 3 citlivé, u dětí byla provedena pouze 2 vyšetření a ta vyšla rezistentní.

Nitrofurantoin není vhodný pro pacienty s onemocněním plic (cystická fibróza) či s onemocněním jater (chronická hepatitida). Není vhodný pro děti. Indikuje se tehdy, pokud není možné použít účinnější a bezpečnější ATB nebo chemoterapeutika. Může se používat k léčbě močových cest od citlivých kmenů, jako jsou *E. coli*, enterokoky, *Proteus spp.* apod. (Nitrofurantoin – ratiopharm® 100 mg). Bylo provedeno 1 844 citlivostí, z toho 37 bylo rezistentních a 1807 citlivých. Celkový počet rezistentních kmenů je pouze 2,01 %. Vyšetření u dětí bylo provedeno 154 a z toho pouze 1 bylo rezistentní a 153 citlivých, takže poměr rezistentních kmenů je 0,65 %. Pro děti toto ATB není vhodné, i když má výborné výsledky.

Na základě výpočtu hodnoty chí-kvadrát a volných stupňů volnosti mohu tvrdit, že je menší pravděpodobnost než 5 % (konkrétně 0,00 %), že by takovéto četnosti měření vznikly „náhodou“ (tj. vlivem jen mnoha malých neidentifikovatelných příčin), proto nultou hypotézu, že jsou proměnné nezávislé, zamítáme a přijmeme alternativní hypotézu.

Alternativní hypotéza je: Statisticky významný vliv rezistence antibiotik na výsledek existuje a výsledky měření lze brát jako relevantní.

Z výše uvedeného mohu tedy říci, že hypotéza č. 1 (Bude více dospělých pacientů než dětí) je potvrzena. Rovněž hypotézu č. 2 (Děti budou mít méně rezistentních kmenů) považuji za potvrzenou. Hypotéza č. 3 byla ale vyvrácena (Rezistentních kmenů bude více než 50 %).

## Závěr

Závěrem bych chtěla říci, že jsem si vyzkoušela laboratorní práci od kultivace až po biochemické určení kmene *E. coli*. Cílem mé práce bylo nashromáždit informace o rezistenci *Escherichia coli* na vybraná antibiotika a poukázat na pravděpodobně špatné užívání antibiotik a dokázat, že by se tento problém měl řešit. Z mé práce vyplývá, že 24,43 % kmenů *Escherichia coli* bylo rezistentních na vybraná antibiotika. Mezi antibiotiky byly poměrně velké rozdíly v procentech rezistentních kmenů. Proto lze snadno vyčíst, jaká antibiotika se používají častěji, v některých případech i zbytečně. Vyplývá z toho, že rezistence na antibiotika představuje závažný problém a do budoucna se bude situace zhoršovat, pokud nebude nalezeno vhodné řešení. Postupně se počty zvyšují. Antibiotika do organismu vstřebáváme nejen při léčbě bakteriálních infekcí, ale v dnešní době stopové množství získáváme také ve vodě a potravinách.

Vyšetřovanými pacienty byly nejčastěji ženy, protože prodělávají více infekcí způsobených *Escherichia coli* než muži. Důvodem je toto, že ženy mají kratší močovou trubici, která se nachází blízko konečníku, a tím může dojít k přenosu bakterií z konečníku do močové trubice. Močové infekce se často opakují. Z mého výzkumu vyplývá, že nejlépe z antibiotik si vedl Nitrofurantoin, který měl poměr rezistentních kmenů pouhých 2,01 %. Nejhůře si vedly Amplicin a Amoxicilin používané ve zdravotnických zařízeních (95,00 %). Vysoká čísla u rezistence na Amplicin by mohla být způsobena tím, že ve zdravotnických zařízeních se častěji setkáme s odolnějšími kmeny. Nemocniční kmeny mají vyšší rezistenci k antibiotikům.

Ze statistického hlediska není rezistence na antibiotika pouze náhodným, nevysvětlitelným jevem, protože podle hodnoty chí-kvadrátu a volných stupňů volnosti je pravděpodobnost menší než 5 %, v mém případě se rovná 0,00 %. Četnosti mého měření lze tedy brát jako relevantní, výsledek existuje, nejedná se o náhodu.

## Seznam literatury

1. ARYAL, S., 2017. Mikrobiology info: Mueller-hinton agar MHA 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/>
2. BEDNÁŘ, M. et al., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil. 560 s. ISBN 80-238-0297-6.
3. BENEŠ, J., 2009. Vlastnosti a dávkování aminopenicilinových antibiotik. *Postgraduální medicína: PM příloha 7/2009* [online]. **11**, 48 [cit. 2018-04-08]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/vlastnosti-a-davkovani-447155>
4. 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>
5. 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/>
6. Drugs.com, 2018. *Amplicin* [online]. New York: Drugs.com [cit. 2018-04-08]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/cdi/ampicillin.html>
7. EMedicineHealth, 2010. Azactam. *eMedicineHealth.com* [online]. San Clemente, California, 15. 12. 2010 [cit. 2018-04-08]. Dostupné z: [https://www.emedicinehealth.com/drug-aztreonam/article\\_em.htm#moreinfo](https://www.emedicinehealth.com/drug-aztreonam/article_em.htm#moreinfo)
8. HELLINGER, W. C., BREWER, N. S., 1999. Carbapenems and Monobactams: Imipenem, Meropenem, and Aztreonam. *Mayo Clinic Proceedings* [online]. **74**(4), 420–434, doi: 10.4065/74.4.420. [cit. 2018-02-17]. ISSN 00256196. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025619611644108>
9. HORÁČEK, J., 2000. *Základy lékařské mikrobiologie*. Praha: Karolinum. 308 s. ISBN 80-246-0006-4.

10. HYNIE, S, 2001. *Lékařská mikrobiologie – vyšetřovací metody*. 2., přeprac. vyd. Praha: Triton. 504 s. ISBN 978-80-86850-04-7.
11. HYNIE, S., 2003. *Speciální farmakologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0656-9.
12. 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>
13. JANOVSÁ 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/crpmst-2015/antibiotika-lab.pdf](https://www.upce.cz/sites/default/binary_www_old/fcht/uechi/crpmst-2015/antibiotika-lab.pdf)
14. KRČMĚRY, V., 1994. *Aktuálne farmakoterapeutiká*. Martin: Osveta. 182 s. ISBN 80-217-0238-9.
15. 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>
16. LINCOVÁ, D., FARGHALI, H. 2007. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén. 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0.
17. 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>
18. MAĎAR, R., PODSTATOVÁ, R., ŘEHOŘOVÁ, J., 2006. *Prevence nozokomiálních nákaz v klinické praxi*. Praha: Grada. 178 s. ISBN 80-247-1673-9.
19. MAŇASKOVÁ, D., 2010. *Cefuroxim axetil - Xorimax* [online]. Praha: Medicinman [cit. 2018-04-08]. Dostupné z: <http://medicinman.cz/?p=leky-latky/cefuroxim-axetil>

20. MAREK, J., 2010. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 4., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. 808 s. ISBN 978-802-4726-397.
21. MARTÍNKOVÁ, J. et al., 2007. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada. 380 s. ISBN 978-80-247-1356-4.
22. MATUSCHEK, E., BROWN, D. F. J., KAHLMETER, G., 2013. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. **20**, 255-265 [cit. 2018-03-02]. Dostupné z: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/General\\_documents/Publications/Disk\\_diffusion\\_paper\\_printed\\_version\\_March\\_2014.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Publications/Disk_diffusion_paper_printed_version_March_2014.pdf)
23. MODR, Z., 1995. *Antibiotika a chemoterapeutika: stručný přehled pro praxi*. Praha: Lek pharma. 125 s.
24. PINCUS, D. H., MILLER, M. J., 2013 (ed). *Encyklopedia Of Rapid Mikrobiological Methods Volume 4: Microbial Identification Using The Biomérieux Vitek® 2 System*. River Grove, IL, USA: PDA. 243 s. ISBN 1-933722-66-5.
25. ROZSYPAL, H., 2015. *Základy infekčního lékařství*. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum. 572 s. ISBN 9788024629322.
26. Sandoz, 2018. 2: *Antibiotika* [online]. Praha: Sandoz [cit. 2018-03-21]. Dostupné z: <https://www.sandoz.cz/o-spolecnosti-sandoz/nase-terapeuticke-oblasti/antibiotika>
27. SCHINDLER, J, 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada. 248 s. ISBN 978-80-247-4771-2.
28. SCHRÉTEROVÁ, E., TAKÁČOVÁ, V., PASTVOVÁ, L., SIEGFRIED, L. 2014b. Metódy dôkazu ESBL u enterobaktérií. *Spravy klinickej mikrobiológie* [online]. **XIV**.(1–2), 4 [cit. 2018-03-26]. ISSN 1338-645X. Dostupné z: [http://www.sskm.tym.sk/skm/Spravy\\_2014\\_1-2.PDF#page=13](http://www.sskm.tym.sk/skm/Spravy_2014_1-2.PDF#page=13)
29. SCHRÉTEROVÁ, E., TAKÁČOVÁ, V., PASTVOVÁ, L., SIEGFRIED, L., 2014a. Metódy dôkazu produkcie AmpC u enterobaktérií. *Spravy klinickej*



- mikrobiologie* [online]. **XIV.**(1–2), 13 [cit. 2018-03-26]. ISSN 1338-645X. Dostupné z: [http://www.sskm.tym.sk/skm/Spravy\\_2014\\_1-2.PDF#page=13](http://www.sskm.tym.sk/skm/Spravy_2014_1-2.PDF#page=13)
30. 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](http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/vseob/P1v/kultivace_vs_tisk.pdf)
31. SPÍŽEK, J., 1999. Rezistence na antibiotika: Je třeba hledat nové látky a nové postupy. *Vesmír* [online]. 1 [cit. 2018-02-17]. ISSN 1214-4029. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1999/cislo-1/rezistence-antibiotik-a.html>
32. Surrey and Sussex Healthcare NHS Trust, 2016. *Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) – Escherichia coli (E.coli) and Klebsiella* [online]. Redhill: East Surrey Hospital, Redhill, [cit. 2018-03-26]. Dostupné z: <https://www.surreyandsussex.nhs.uk/patients-visitors/infection-control/extended-spectrum-beta-lactamases-esbls-escherichia-coli-e-coli-and-klebsiella/>
33. ŠILHÁNKOVÁ, L., 2002. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3., opr. a dopl., vyd. Praha: Academia. 364 s. ISBN 80-200-1024-6.
34. ŠTEFÁNEK, J., 2010. *Medicína, nemoci, studium na I. LF UK* [online]. Praha: UK [cit. 2018-02-12]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/>
35. VOTAVA, M., 2010. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 495 s. ISBN 978-80-86850-04-7.
36. Wikipedia, 2017. *Escherichia coli* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-2018, 7. 12. 2017 [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Escherichia\\_coli](https://cs.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli)
37. Wikipedia, 2018a. *Ceftaroline fosamil* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-2018, 26. 2. 2018a [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Ceftaroline\\_fosamil](https://en.wikipedia.org/wiki/Ceftaroline_fosamil)
38. Wikipedia, 2018b. *Fosfomycin* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-2018, 23. 1. 2018b [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Fosfomycin>

39. Wikipedia, 2018c. *Amoxicilin* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-2018, 1. 5. 2018 [cit. 2018-04-08]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Amoxicilin#L%C3%A9%C4%8Diva>
40. Wikipedia, 2018d. *Sulbaktam* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-2018, 20. 1. 2018 [cit. 2018-04-06]. Dostupné z: <https://pl.wikipedia.org/wiki/Sulbaktam>
41. Wikipedia, 2018e. *Antibiotikum: Historie* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-2018, 2. 3. 2018 [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Antibiotikum>
42. WikiSkripta, 2017. *Kultivační půdy* [online]. Praha: MEFANET, 1.6 2017 [cit. 2018-03-24]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Kultiva%C4%8Dn%C3%AD\\_p%C5%AFdy](https://www.wikiskripta.eu/w/Kultiva%C4%8Dn%C3%AD_p%C5%AFdy)
43. WikiSkripta, 2018. *Testování citlivosti na antibiotika* [online]. Praha: MEFANET 3. 2. 2018 [cit. 2018-04-12]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Testov%C3%A1n%C3%AD\\_citlivosti\\_na\\_antibiotika](https://www.wikiskripta.eu/w/Testov%C3%A1n%C3%AD_citlivosti_na_antibiotika)
44. ZAHRADNICKÝ, J., 1982. *Základy racionální terapie antibiotiky a chemoterapeutiky*. Praha: Avicenum. 246 s.

## Seznam tabulek

Tabulka 1 Původci močových infekcí .....	15
Tabulka 2 Přehled citlivostí a rezistencí rozdělených podle skupin.....	36
Tabulka 3 Celkový počet citlivostí a rezistencí <i>E. coli</i> za rok 2016, vykultivované z moče .....	37
Tabulka 4 Pozorované (empirické) četnosti $n_{ij}$ .....	39
Tabulka 5 Teoretické četnosti $e_{ij}$ .....	37
Tabulka 6 Tabulka testovaného kritéria $K_{ij}$ .....	39

## **Seznam obrázků**

Obrázek 1 Rezistence na vybraná ATB u dospělých pacientů .....	37
Obrázek 2 Rezistence na ATB u dětí .....	38
Obrázek 3 Srovnání rezistencí u dětí a dospělých .....	38
Obrázek 4 Celkový poměr rezistentních a citlivých kmenů za rok 2016 .....	39

## **Seznam příloh**

Příloha 1 Testování (obrázek 1-14) .....	53
--	----

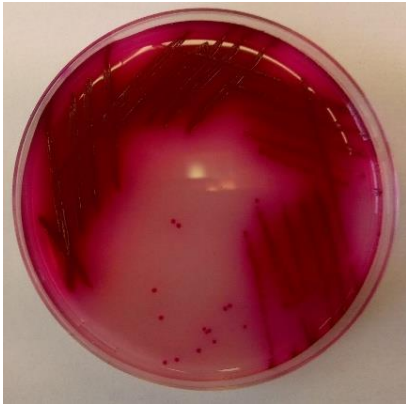
## Seznam zkratek

AmpC	beta-laktamázy typu AmpC
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+	gram pozitivní
H	bičíkový antigen
ID	identifikace
IZ	inhibiční zóna
K	kapsulární antigen
KA	Krevní agar
McF	McFarland
MH (A)	Mueller – Hinton agar
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NRL	Národní referenční pracoviště
O	somatický antigen
OXA	oxacillin
S. Aureus	Stafylokokus Aureus
S. Saprophyticus	Stafylokokus Saprophyticus

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 zpracování



**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



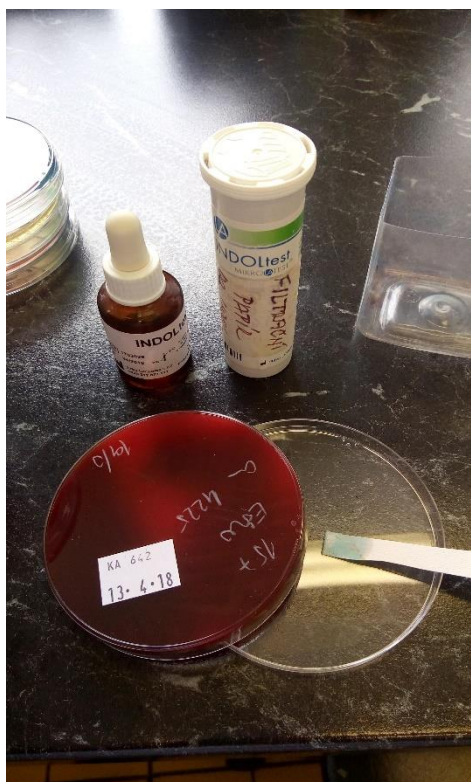
**Obrázek 5 Vortex a Denzitometr**

Zdroj: vlastní

1		H URE	G ARG	F ORN	E LYS	D H <sub>2</sub> S	C SCI	B MAL	A ONP
	POZ	Red	Blue	Blue	Blue	Black	Blue	Blue	Yellow
	NEG	Red	Green	Green	Green	Grey	Green	Green	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

**Obrázek 6 Schéma barevných změn pro určení biochemické aktivity**

Zdroj: Příbalový leták ENTERO test 24N



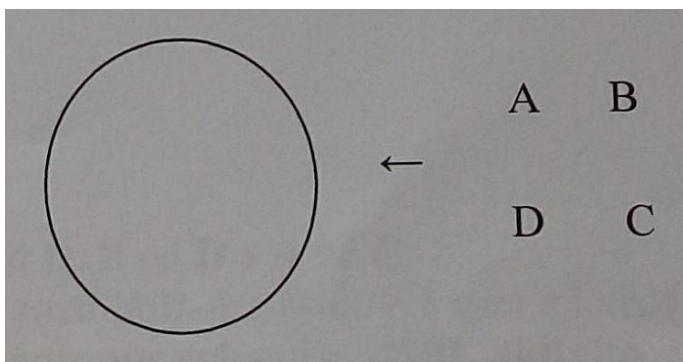
**Obrázek 7 INDOL test a pozitivní výsledek**

Zdroj: vlastní



**Obrázek 8 VP-I a VP-II činidla**

Zdroj: vlastní



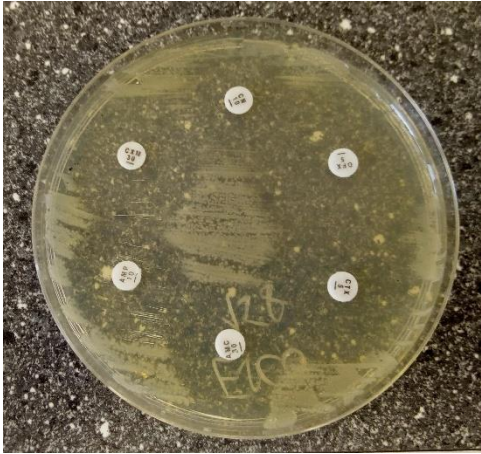
**Obrázek 9 Schéma polohy disků Ampc beta-laktamáza**

Zdroj: vlastní



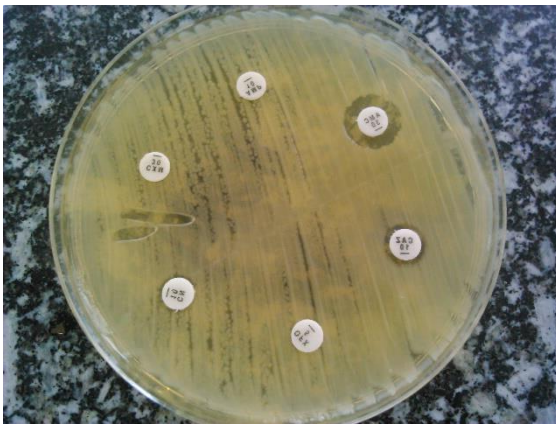
**Obrázek 10 Růst bakterií kolem disků ABCD**

Zdroj: vlastní



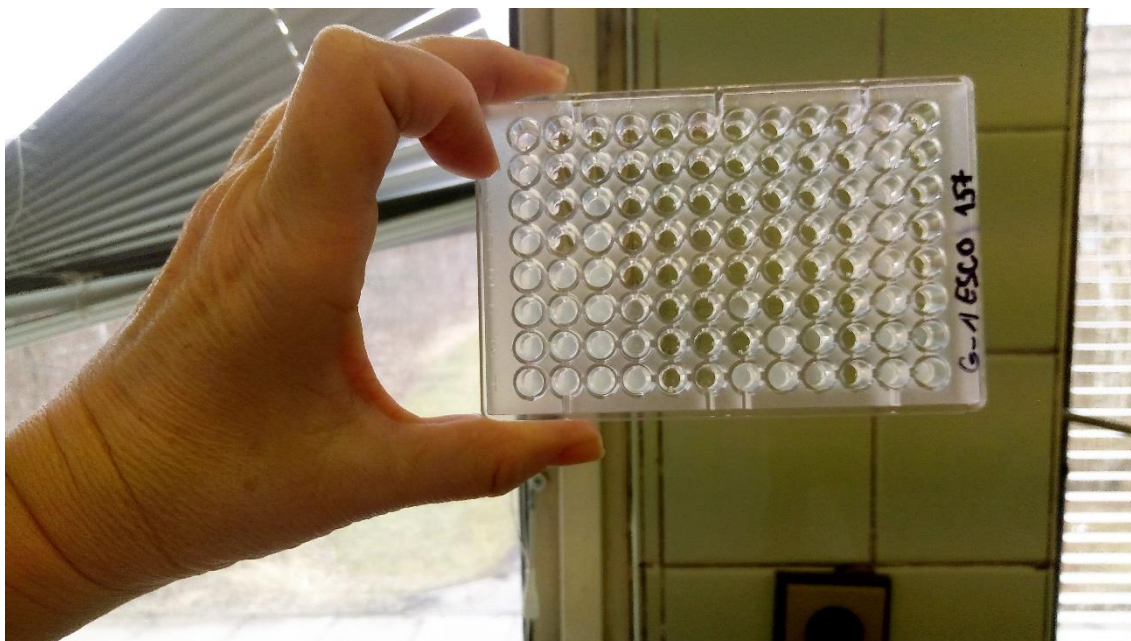
**Obrázek 11 Diskový difuzní test – citlivý kmen**

Zdroj: vlastní



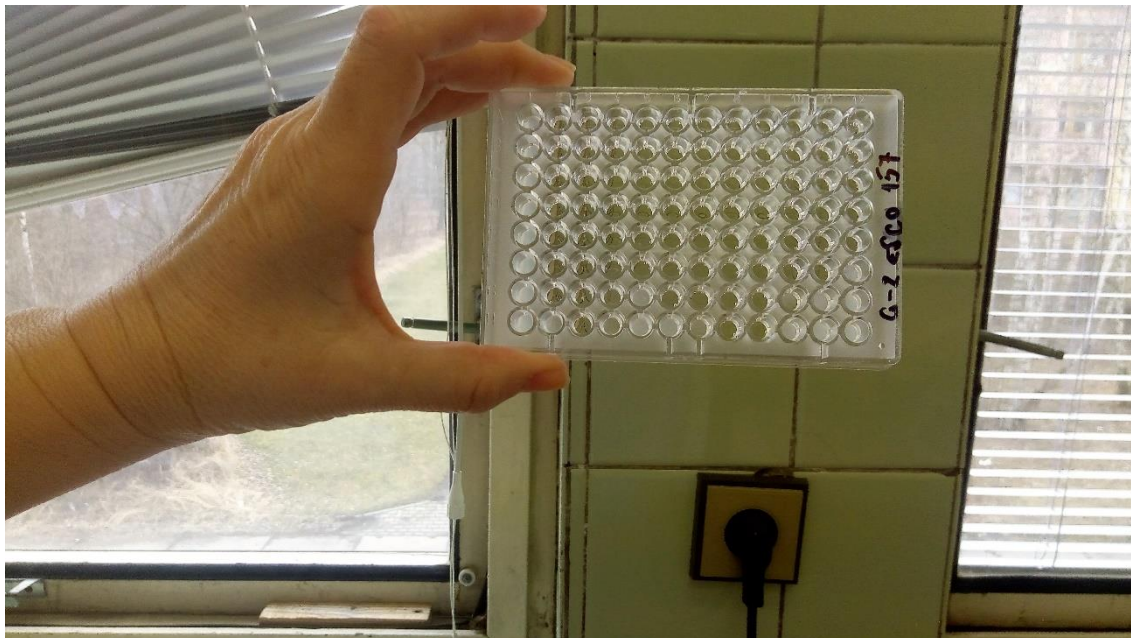
**Obrázek 12 Diskový difuzní test – rezistentní kmen**

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