

**Veterinární a farmaceutická univerzita Brno**

**Farmaceutická fakulta**

**Ústav infekčních chorob a mikrobiologie**

**Citlivost izolátů *Escherichia coli* porcinního původu vůči  
ceftiofuru a fluorovaným chinolonům.**

(Diplomová práce)

**Autor diplomové práce: Lenka Vinklárková**

**Vedoucí diplomové práce: Alois Čížek, Prof. MVDr. CSc**

**Brno, 2012**

Ústav infekčních chorob a mikrobiologie

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení: **Lenka VINKLÁRKOVÁ**

Osobní číslo: **F07130**

Studijní program: **M5206 farmacie**

Studijní obor: **farmacie**

Název tématu: **Citlivost izolátů Escherichia coli porcinného původu vůči ceftiofuru a fluorovaným chinolonům**

**Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :**

Soubor kultur E. coli animálního původu bude fenotypově charakterizován s ohledem na produkci širokospektrých betalaktamáz (ESBL). Předběžně určené izoláty budou dále typizovány dalšími fenotypovými metodami a metodami molekulární biologie. Při experimentální práci budou použity tyto postupy: stanovení hodnot MIC, DDST, průkaz genů rezistence metodou PCR.

Seznam vhodné literatury:

1.NCCLS. 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolates from animals, approved standard-second edition. NCCLS dokument M-A, Vol.19 No.11. Edited by NCCLS, Wayne, Pennsylvania 2002, 85 s. 2.Vybrané publikace z vědeckého časopisu Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Antimicrobial Agents and Chemotherapy aj. 3.Laboratorní manuály zaměřené na studovanou problematiku

Vedoucí diplomové práce:

Prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.  
Ústav infekčních chorob a mikrobiologie

Datum zadání diplomové práce:

27. dubna 2010

Termín odevzdání diplomové práce:

20. dubna 2012

  
Diplomant

  
Přednosta ústavu  
VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ  
UNIVERZITA BRNO  
Ústav infekčních chorob a mikrobiologie  
612 42 Brno, Palackého tř. 1/3  
IČ: 621 57 124  
DIČ: C262157124

  
Děkan  
Děkanát  
Farmaceutické fakulty  
Veterinární a farmaceutické univerzity Brno  
Palackého 1/3  
612 42 Brno

V Brně dne 27. dubna 2010



## **Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat vedoucímu práce Prof. MVDr. Aloisi Čížkovi CSc. a MVDr. Ludmile Kohoutové za cenné rady a připomínky, dále pracovníkům Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie a Ústavu biologie a chorob volně žijících zvířat za odborné vedení mé práce v laboratoři.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Citlivost izolátů *Escherichia coli* porcinního původu vůči ceftiofuru a fluorovaným chinolonům“ vypracovala pod vedením vedoucího diplomové práce samostatně za použití uvedené literatury.

Prohlašuji, že tato diplomová práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.

Dne 11.4.2012

Lenka Vinklárková

## Abstrakt:

Cílem mé práce bylo zjistit citlivost izolátů *Escherichia coli* z prasat k vybraným chinolonům a ceftiofuru agarovou diluční metodou a následně u izolátů se sníženou citlivostí prokázat geny rezistence. Bylo testováno 247 izolátů z let 2005 až 2010, z nichž mělo 27 izolátů MIC ciprofloxacinu  $\geq 0,25$ mg/l a u nich byly metodou PCR zjišťovány plazmidově vázané geny rezistence k chinolonům (PMQR): *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qnrD*, *aac(6')Ib*, *qepA*, *oqxAB*. U těchto 27 izolátů byla také zjišťována citlivost k olachindoxu agarovou diluční metodou. Z 27 izolátů byla PMQR prokázána u dvou izolátů. V jednom případě se jednalo o gen *qnrS* a v druhém případě o gen *oqxAB*. Z 22 izolátů *E. coli* s MIC ceftiofuru  $\geq 32$  mg/l byl metodou PCR a následným sekvenováním prokázán gen kódující širokospektrou betalaktamázu CTX-M1 u osmi izolátů.

**Klíčová slova:** *E. coli*, PMQR, geny *qnr*, *qnrS*, *bla*<sub>CTX-M1</sub>, *oxqAB*

## Abstract:

The aim of my study was to investigate the susceptibility of *E. coli* isolates from swine to quinolones and ceftiofur with help of agar dilution method and to prove genes of resistance. For investigation 247 isolates from 2005 to 2010 were used. These 27 isolates, of which MIC<sub>CIP</sub> was higher or the same as 0,25 mg/l, were chosen for PCR testing of plasmid mediated quinolone resistance genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qnrD*, *aac(6')Ib*, *qepA* and *oqxAB*. these 27 isolates were also tested by agar dilution method for olaquinox. From these 27 isolates PMQR genes were proved in two isolates - in isolate 63590 it was *qnrS* gene, in isolate 73624 *oqxAB* gene. From 22 isolates, of which MIC<sub>CEF</sub> was higher or the same as 32mg/l, ESBL CTX-M1 was proved by using PCR and sequencing in 8 isolates.

**Keywords:** *E. coli*, PMQR, *qnr* genes, *qnrS*, *bla*<sub>CTX-M1</sub>, *oxqAB*

## Obsah:

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Antibiotická politika.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2 Chov prasat.....</b>	<b>9</b>
<b>2.3 <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>9</b>
2.3.1 Charakteristika.....	9
2.3.2 Patogenní <i>E.coli</i> .....	10
<b>2.4 Terapie infekcí vyvolaných <i>E.coli</i> u prasat.....</b>	<b>11</b>
<b>2.5 Chinolonová chemoterapeutika.....</b>	<b>11</b>
2.5.1 Vlastnosti.....	11
2.5.2 Dělení chinolonů.....	11
2.5.3 Mechanismus účinku.....	12
2.5.4 Mechanismy rezistence.....	12
2.5.5 Vybrané chinolony.....	12
<b>2.6 Cefalosporiny.....</b>	<b>12</b>
2.6.1 Vlastnosti.....	12
2.6.2 Dělení cefalosporinů.....	13
2.6.3 Mechanismus účinku.....	13
2.6.4 Mechanismy rezistence.....	13
2.6.5 Ceftiofur.....	14
<b>2.7 Vznik a přenos antibiotické rezistence.....</b>	<b>14</b>
<b>2.8 Geny rezistence k chinolonům.....</b>	<b>15</b>
2.8.1 Plasmidově vázané geny (geny PMQR).....	15
2.8.2 Chromozomálně vázané geny.....	16
<b>2.9 Geny rezistence k cefalosporinům.....</b>	<b>17</b>

2.9.1 Třída A.....	17
2.9.2 Třída B.....	18
2.9.3 Třída C.....	18
2.9.4 Třída D.....	18
<b>3. CÍL PRÁCE.....</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIÁL A METODIKA.....</b>	<b>20</b>
4.1 Pomůcky a materiál, přístroje, agary, kmeny bakterií.....	20
4.2 Metodika.....	21
<b>4.2.1 Agarová diluční metoda.....</b>	<b>21</b>
4.2.1.1 Složení a příprava kultivačních půd.....	21
4.2.1.2 Zásobní roztoky ATB.....	22
4.2.1.3 Ředění ATB.....	23
4.2.1.4 Stanovení MIC <i>E. coli</i> k antimikrobiálním látkám agarovou diluční metodou.....	24
<b>4.2.2 PCR.....</b>	<b>26</b>
4.2.2.1 Podstata PCR.....	26
4.2.2.2 Příprava vzorků pro PCR.....	27
4.2.2.3 Multiplex PCR pro <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrC</i> , <i>qnrS</i> .....	28
4.2.2.4 PCR pro <i>qnrD</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> a <i>qepA</i> geny.....	29
4.2.2.5 Simplex PCR pro <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> a <i>aac(6')Ib-cr</i> geny.....	29
4.2.2.6 Detekce produktu PCR agarózovou gelovou elektroforézou.....	29
<b>4.2.3 Přejzatá data.....</b>	<b>30</b>
<b>5. VÝSLEDKY.....</b>	<b>31</b>
<b>5.1 Vyhodnocení citlivosti <i>E. coli</i> z prasat k ceftiofuru agarovou diluční metodou.....</b>	<b>31</b>
<b>5.2 Vyhodnocení citlivosti <i>E. coli</i> u prasat k ciprofloxacinu agarovou diluční metodou.....</b>	<b>31</b>
<b>5.3 Vyhodnocení citlivosti <i>E. coli</i> u prasat k nalidixové kyselině agarovou diluční metodou.....</b>	<b>32</b>

<b>5.4 Vyhodnocení citlivosti <i>E. coli</i> u prasat k enrofloxacinu agarovou diluční metodou...</b>	<b>32</b>
<b>5.5 Vyhodnocení citlivosti vybraných izolátů <i>E.coli</i> k olachindoxu agarovou diluční metodou.....</b>	<b>33</b>
<b>5.6 Vyhodnocení PCR.....</b>	<b>34</b>
<b>6. DISKUZE.....</b>	<b>40</b>
<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>45</b>
<b>8. LITERATURA.....</b>	<b>46</b>
<b>9. POUŽITÉ ZKRATKY.....</b>	<b>51</b>
<b>10. PŘÍLOHY.....</b>	<b>54</b>

## 1. Úvod:

V průběhu dvacátého století jsme byli svědky objevování a zavádění různých skupin antibakteriálních látek do boje s infekčními nemocemi člověka. Současně s tím se tato antibiotika a chemoterapeutika začala používat ke snížení výskytu bakteriálních infekcí u zvířat, čímž se snížila jejich nemocnost a ztráty hynutím. Navíc bylo v minulosti využívání těchto látek povoleno také v subterapeutických dávkách ke stimulaci jejich růstu. Tato počáteční éra byla v důsledku neustále se zvyšujícího výskytu antibiotické rezistence vystřídána érou omezování použití antibiotik nebo přímo zákazem použití některých skupin antibiotik a chemoterapeutik. Dnes národní autority členských zemí EU prosazují opatření, která by měla zamezit neuváženému nadužívání těchto léčiv při terapii i profylaxi bakterióz zvířat.

Významným negativním dopadem použití antibakteriálních látek u zvířat je možný přenos rezistentních bakterií na člověka, jelikož zvířata jsou kolonizována podobným spektrem bakterií a používané antimikrobně účinné látky jsou povětšinou stejné v humánní i veterinární medicíně. Znáмым příkladem bylo použití avoparcinu u drůbeže a prasat, jenž vedlo k selekci vankomycin rezistentních kmenů enterokoků, které cestou potravního řetězce kolonizovaly střevo člověka. Riziko možného přenosu průnikem rezistentních bakterií do potravního řetězce člověka trvá i dnes. Objevují se informace o negativním důsledku použití cefalosporinů 3. a 4. generace a fluorovaných chinolonů u potravinových zvířat, který spočívá v případě cefalosporinů v indukci a selekci enterobakterií, které produkují betalaktamázy širokého spektra, a v případě fluorochinolonů v selekci plazmidově vázané rezistence (PMQR). Oba tyto typy rezistence bakterií mohou být přenosné jak vertikální, tak i horizontální cestou, a průnik takových bakterií do potravního řetězce člověka by představoval zvyšování rizika takzvaných komunitních infekcí lidí.

Z uvedených důvodů jsme se rozhodli provést vyšetření souboru izolátů *E. coli* získaných z prasat v období po registraci ceftiofuru (3. generace cefalosporinů) a posoudit jejich citlivost k tomuto antibiotiku a současně také k fluorovaným chinolonům. V návaznosti na získané výsledky pak hledat geny odpovědné za případnou rezistenci.



## 2. Teoretická část

### 2.1 Antibiotická politika

Antibiotická politika se uplatňuje ve veterinární i humánní medicíně. Jejím cílem je zajištění odborné antimikrobní léčby, zamezit rozšíření rezistentních kmenů a taktéž bránit jejich vzniku tak, aby se zajistila účinnost stávajících antimikrobiálních látek co nejdéle. Nové účinné chemické struktury je totiž obtížné nalézt či vyrobit, nehledě na velmi nákladné klinické studie a rychlý vznik rezistence při nekontrolovaném, nadměrném či zbytečném užívání. Za antibiotickou politiku v ČR odpovídá SVS a ÚSKVBL. V rámci antibiotické politiky se provádí monitorování spotřeby antimikrobiálně působících látek na našem území, monitorování rezistence vybraných kmenů bakterií <http://www.bezpecnakrmiva.cz/index.php?id=32> (28.2.2012), <http://www.vetweb.cz/Antibioticka-politika-ve-veterinarnimedicines1497x49636.html> (28.2.2012).

### 2.2 Chov prasat

V druhé polovině dvacátého století rostla poptávka po vepřovém mase, což vedlo k ústupu malých farem a ke vzniku velkochovů s větší produkcí. To však vedlo i k větší spotřebě antibiotik a chemoterapeutik, jelikož se snížila úroveň ošetřování a případná nákaza se rychle šířila na velký počet zvířat. Tyto látky lze podat například jako medikované krmivo, součást pitné vody nebo injekčně. Dále lze provádět vakcinaci prasnic i selat ke zvýšení imunity (Guardabassi et al., 2008).

Pro zdraví prasat jsou velmi důležité podmínky, ve kterých jsou chována. Základem je dostatečná ventilace a zábrana stresovým podmínkám, především přílišné koncentraci prasat ve stání, změně krmiva nebo příliš brzkému odstavení. Je doporučováno neodstavovat selata dříve než po 28 dnech věku. Odstavuje se však běžně mezi 21. a 35. dnem věku selat. Při dřívějším odstavení se sice snižuje možnost přenosu nálezů z prasnice na sele, ale zvyšuje se možnost průjmu z odstavení (Guardabassi et al., 2008; Čechová a kol., 2003).

### 2.3. *Escherichia coli*

#### 2.3.1 Charakteristika

Tato bakterie byla objevena Theodorem Escherichem, německým lékařem, v roce 1885. *E. coli* řadíme do čeledi Enterobacteriaceae do rodu *Escherichia* (Votava a kol., 2003). Je to gramnegativní, fakultativně anaerobní bakterie tyčinkovitého tvaru s bičíky na svém

povrchu, díky kterým je schopna pohybu. Může získávat energii oxidací nebo kvašením. Dokáže štěpit laktózu a glukózu, neštěpí však močovinu. Je kataláza pozitivní a oxidáza negativní, čehož se využívá u testu na průkaz této bakterie. Běžně se nachází v trávicím traktu, kde je součástí střevní mikroflóry a svou produkcí kolicinů působí toxicky na jiné patogenní bakterie a dále je významným zdrojem vitamínu K. *Escherichia coli* však může být také původcem průjmových onemocnění a infekcí močových a žlučových cest a způsobit i zápal plic. Infekce mohou nastat fekálně-orální cestou, nebo mají endogenní původ. *E. coli* se stala modelovým organismem pro mikrobiologii a hojně se využívá v genovém inženýrství, proto patří k nejprostudovanějším mikroorganismům (Votava a kol., 2003).

### 2.3.2 Patogenní *E. coli*

V rámci druhu *E. coli*, který je běžným komenzálem střeva obratlovců, existují skupiny patogenních *E. coli*:

**EPEC (EAEC).** Enteropatogenní (enteroadherentní) *E. coli* způsobují dispeptické potíže a novorozenecké průjmy. Nejčastějšími antigenními typy jsou O55, O111, O126, O86.

**STEC (VTEC, EHEC).** Shiga-like toxigenní *E. coli* (verotoxigenní *E. coli*, enterohemoragické *E. coli*) způsobují těžké průjmy s krvácením. Nakazit se člověk může nedostatečně tepelně opracovaným hovězím masem. Léčba antibiotiky není účelná, jelikož se tím uvolní toxiny z lyzovaných buněk bakterie. Nejvýznamnější sérotyp STEC je O157:H7.

**ETEC.** Enterotoxigenní *E. coli* způsobuje cestovatelské vodnaté průjmy díky tepelně labilnímu enterotoxinu, způsobujícího aktivaci adenylátcyklázy. To vede k produkci cAMP a nadměrné sekreci vody do střeva. Naproti tomu tepelně stabilní enterotoxin způsobuje aktivaci guanylátcyklázy, která zvyšuje koncentraci cGMP.

**EIEC.** Enteroinvazivní *E. coli* způsobuje krvavé průjmy. Příkladem je serotyp O 124.

**EaggEC.** Enteroagregativní *E. coli* taktéž způsobuje cestovatelské průjmy a vyskytuje se hlavně v oblasti Asie.

**DAEC.** Difúzně adherentní *E. coli* produkuje alfa D invazin a Alfa E adhezín díky alfa operonu.

**UPEC.** Uropatogenní *E. coli* způsobuje infekce močových cest díky specifickým faktorům virulence (adhesiny) (Votava a kol., 2003).

## 2.4 Terapie infekcí vyvolaných *E. coli* u prasat

Koliinfekce se nejčastěji vyskytují v období od narození po dosažení pěti týdnů věku prasat (Svoboda a Drábek, 2005). Vhodný výběr ATB by se měl opírat o přesnou diagózu a vyšetření citlivosti patogenního kmene. Léčivý první volby u běžných infekcí prasat, způsobených *E. coli*, jsou kolistin a trimethoprim kombinovaný se sulfonamidy, druhou volbou je neomycin. Poslední možností je použití amoxicilinu, jeho kombinace s klavulanátem nebo použití cefalosporinů či fluorovaných chinolonů. Použití cefalosporinů a fluorochinolonů by mělo být dobře zváženo, jelikož tato ATB jsou hojně využívána v humánní medicíně. Při výběru vhodné antimikrobiální látky by se měl brát ohled také na konkrétní stav rezistence *E. coli* v dané oblasti (Guardabassi et al., 2008).

## 2.5 Chinolonová chemoterapeutika

### 2.5.1 Vlastnosti

Nefluorovaná chemoterapeutika byla používána od roku 1963 k léčbě infekcí GIT, dýchacích a močových cest způsobených gramnegativními bakteriemi (Šimůnek a Smola, 2007; Hernández et al., 2011).

Chinolony se řadí k chemoterapeutikům se širokým spektrem účinku a baktericidním působením. Mají výborné perorální i parenterální vstřebávání, dobrý průnik do žluči, slin, sputa, prostaty a kostí. Vylučování probíhá především ledvinami, kde se tato chemoterapeutika koncentrují. Z těchto důvodů se využívají především k léčbě infekcí močových cest, bronchitid, infekcí měkkých tkání, kostí, kloubů i kůže. Vstřebávání chinolonů snižují soli dvojmocných a trojmocných kovů (Lincová a Farghali, 2007).

### 2.5.2 Dělení chinolonů

Do první generace chinolonů patří nefluorovaná chemoterapeutika odvozená od nalidixové kyseliny. Jejich využití je omezené na infekce močových cest, jelikož jinde nedosahují terapeutické hladiny. Zástupcem této generace je již zmiňovaná nalidixová kyselina, dále oxolinová a pipemidová kyselina a cinoxacin. Druhá generace již zahrnuje fluorované chinolony - enrofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin a jiné. Jejich použití je širší než u nefluorovaných chinolonů - infekce GIT, kůže, močových a dýchacích cest. Třetí generace působí i na *Streptococcus pneumoniae* a jiné G<sup>+</sup>-koky, hlavními zástupci jsou gatifloxacin a tosufloxacin. Čtvrtá generace má zvýšenou aktivitu vůči grampozitivním

kokům a působí na některé anaeroby. Řadí se sem trovafloxacin, gemifloxacin a sitafloxacin (Lincová a Farghali, 2007; Šimůnek a Smola, 2007).

### 2.5.3 Mechanismus účinku

Tato chemoterapeutika inhibují topoisomerasu IV a DNA-gyrazu, čímž brání replikaci bakteriálního chromozomu (Lincová a Farghali, 2007).

### 2.5.4 Mechanismy rezistence

Rezistence může nastat více způsoby. Může to být impermeabilita buněčné stěny, která způsobí, že chemoterapeutikum se do buňky vůbec nedostane, nebo se může bakterie chinolonu zbavit zvýšeným effluxem. Taktéž může dojít ke změně DNA-gyrazy či topoisomerasy IV (Lincová a Farghali, 2007).

### 2.5.5 Vybrané chinolony

**Nalidixová kyselina:** Používá se u infekcí močových cest vyvolaných *E. coli*. Váže se na bílkoviny krevní plazmy a rychle na ni vzniká rezistence (Šimůnek a Smola, 2007).

**Ciprofloxacin:** Má široké spektrum účinku, působí na *E. coli* i *Pseudomonas aeruginosa*. Má nižší vazbu na bílkoviny oproti nalidixové kyselině, terapeutických koncentrací dosahuje v ledvinách a plicích. Používá se u infekcí GIT, močového a respiračního ústrojí (Šimůnek a Smola, 2007). Využití má i v humánní medicíně.

**Enrofloxacin:** Dávkování enrofloxacinu je 2,5 - 5 mg/kg u p.o. i i.m. podání. Má baktericidní účinek na *E. coli*, při nekontrolovaném užívání rychle vzniká rezistence. Váže se na plazmatické bílkoviny okolo 25 %. U prasat se koncentruje především v GIT. Jeho metabolitem je ciprofloxacin. Ochranná lhůta je u prasat po p.e. podání 7 - 9 dní, po p.o. podání 5 - 12 dní (Šimůnek a Smola, 2007).

## 2.6 Cefalosporiny

### 2.6.1 Vlastnosti

Tato antibiotika byla objevena roku 1945 na Oxfordské univerzitě, kde byla zkoumána produkce antimikrobních látek bakterie *Cefalosporium acremonium*. Základní strukturu tvoří  $\beta$ -laktamový kruh kyseliny 7-aminocefalosporanové, jejíž obměnou se získaly 4 generace se zvyšující se odolností vůči betalaktamázám. Jsou málo toxické. Mají široké spektrum účinku s výjimkou u enterokoků (Šimůnek a Smola, 2007; Votava, 2005). Do biologických tekutin

pronikají dobře, do buněk jen málo. Cefalosporiny se vylučují močí, některé žlučí (Lincová a Farghali, 2007).

### 2.6.2 Dělení cefalosporinů

První generace působí především na bakterie rodu *Escherichia*, *Klebsiella* a *Proteus*. Hlavními zástupci jsou cefalexin, cefadroxil, cefaclor, cefazolin a cefalotin. Druhá generace je odolnější k betalaktamázám, kromě působení na gramnegativní bakterie má účinek i na *Haemophilus influenzae*. Do této generace patří cefuroxim axetil, cefprozil, cefoxitin, cefamandol a cefuroxim. Třetí generace nejvíce působí na gramnegativní bakterie ve srovnání s předešlými generacemi. Dobře působí na čeleď Enterobacteriaceae a na grampozitivní koky s výjimkou stafylokoků. Liší se v působení na pseudomonády. Měly by být užívány pouze u život ohrožujících infekcí. Některé se vylučují také žlučí, proto mohou ovlivnit i střevní mikroflóru. Do třetí generace se řadí ceftriaxon, cefotaxim a ceftiofur. Do protipseudomonádových cefalosporinů 3. generace patří ceftazidim, cefoperazon a cefsulodin. Čtvrtá generace působí na grampozitivní i gramnegativní bakterie, navíc má účinek i na *Pseudomonas aeruginosa*. Je stabilnější vůči betalaktamázám. Čtvrtá generace cefalosporinů se využívá u těžkých infekcí, je možné je kombinovat s aminoglykosidy. Až na působení na bakterie, odolné vůči antipseudomonádovým cefalosporinům 3. generace, nevykazuje 4. generace větší zlepšení oproti předešlé generaci. Dobře působí na Enterobacteriaceae. Patří sem cefpirom, cefepim, cefchinom a cefalonium (Lincová a Farghali, 2007; Šimůnek a Smola, 2007).

### 2.6.3 Mechanismus účinku

Brání syntéze buněčné stěny bakterií interakcí při tvorbě peptidoglykanu. Takto poškozená buňka bakterie není schopna přežít (Lincová a Farghali, 2007).

### 2.6.4 Mechanismy rezistence

- G<sup>-</sup>-bakterie mohou mít sníženou permeabilitu buněčné stěny, čímž je znesnadněn přístup cefalosporinu k cílovým enzymům.
- Bakterie mohou tvořit enzymy schopné rozkládat antibiotikum, betalaktamázy-cefalosporinázy TEM-1 a TEM-2. Tento způsob rezistence je nejčastější.
- Díky mutaci genů kódujících vazebné proteiny je bakterie také rezistentní vůči cefalosporinům.

- Aktivním transportem cefalosporinu ven z buňky effluxní pumpou
- (Lincová a Farghali, 2007).

### 2.6.5 Ceftiofur

Podává se u prasat i.m. v koncentraci 3 – 10 mg/kg co 24 hodin 3 – 5 dní v podobě sodné soli. V případě hydrochloridu stačí 3 mg/kg po tři dny. Nejčastější indikací je onemocnění dýchacích cest u prasat a skotu. Ochranná lhůta po i.m. aplikaci je u prasat 12 hodin – sodná sůl a 5 dní – hydrochlorid (Šimůnek a Smola, 2007).

## 2.7 Vznik a přenos antibiotické rezistence

Rezistence bakterií může být přirozená či získaná. Přirozená (primární) rezistence je vázaná chromozomálně a není přenosná horizontálně. Bakterii chybí cílové místo pro působení antimikrobiální látky. Získaná rezistence vzniká u původně citlivých bakterií mutací nebo přijetím genů rezistence, k čemuž dochází různými způsoby (Bystroňová, 2009; Spížek, 1999).

Mutace mohou vznikat spontánně nebo indukovaně mutageny. Spontánní mutace se vyskytují přibližně u jedné z  $10^7$  až  $10^{11}$  buněk, což značí ne příliš běžný výskyt. Může jít o změnu v jednom nukleotidu, pak jde o bodovou mutaci, nebo v sekvencích nukleotidů, kde se rozlišuje delece, inverze a inserce. Pokud dojde díky mutaci ke změně cílové struktury pro ATB, stává se bakterie odolnou vůči této látce (Votava, 2005).

Při přenosu genů rezistence se významně uplatňují transponovatelné elementy DNA, jako jsou plazmidy, transpozony a integrony. Plazmidy jsou tvořeny extrachromozomální kruhovou DNA, která je schopná samostatné replikace. Tato genetická informace není pro buňku nezbytná, ale může nést například geny rezistence, které konkrétní bakterii zvýhodňují při použití selekčního faktoru - antimikrobiální látky. Většinou existuje v buňce v několika kopiích. Plazmidy konjugativní se mohou přenášet pomocí sex pili z dárcovské buňky  $F^+$  do recipientní buňky  $F^-$ . Taktéž je možná integrace plazmidu do chromozomu, pak jde o episomální plazmid (Votava, 2005). Plazmidy mohou přenášet také informaci pro tvorbu kolicinů, což jsou bakteriální toxiny s baktericidním účinkem na jiné bakterie stejného / podobného druhu (Lazdunski, 1988). Na plazmidech mohou být umístěny geny umožňující rezistenci k ATB. Nejzávažnějšími takovými determinantami, které se vyskytují u *E. coli* a způsobují rezistenci k chinolonům, jsou *qnr*, *qepA*, *aac* a *oqxAB* geny. Rezistence k cefalosporinům pak může být mimo jiné způsobena plazmidově vázanými geny, které

kódují širokospektré betalaktamázy, především SHV, TEM a CTX-M. Dalšími elementy, které umožňují přenos genů rezistence, jsou transpozony. Pomocí transpozonů je možný přenos informace mezi plazmidem a DNA nebo jen mezi DNA genomu. Transpozony nejsou schopny se samy replikovat ani existovat mimo chromozom jako plazmidy. Příkladem transpozonů jsou inzerční sekvence, nesou pouze informaci pro transposasu a jsou zakončeny z obou stran převrácenými repeticemi. Složené transpozony kromě genu pro transposasu nesou geny rezistence k antibiotikům či jiné geny (Votava, 2005). Poslední zmiňované, integrony, obsahují genové kazety, gen pro integrasu a rekombinační místo (Votava, 2005). Zatím byly popsány 4 třídy integronů vyskytujících se u gramnegativních bakterií. Nejčastěji se však vyskytuje první třída integronů, která je také schopná nést rezistenci k různým antibiotikům (Chen et al., 2009).

## 2.8 Geny rezistence k chinolonům

*E. coli* má mnoho způsobů, jak se vyhnout působení chinolonů. Může to být změna exprese porinových proteinů OmpF a OmpC, které zajišťují pasivní prostup chemoterapeutika do buňky. Velkou roli hrají také effluxní pumpy, především AcrAB-TolC. Při mutaci represoru *acrR* se zvýší aktivita pumpy a chinolon je odstraňován z buňky ven. Mutace genů pro DNA-gyrázu bez aktivace pumpy nezpůsobují přílišnou rezistenci, teprve kombinace mutace *gyrA* a aktivace effluxní pumpy či mutace *parC* genu vede k zaznamenání rezistence. Rezistence může být vázaná jak v genomu, tak na plazmidech (Jacoby, 2005).

### 2.8.1 Plazmidově vázané geny (geny PMQR)

Geny PMQR se rozdělují do několika skupin a v rámci nich se rozlišují varianty označené arabskými čísly:

#### ***qnrA***

Tento gen kóduje protein o 218 aminokyselinách, který chrání DNA-gyrázu a topoizomerázu IV bakterie před inhibicí chinolony (Poirel et al., 2005). Je známo 6 variant tohoto genu (Kang et al., 2009). Poprvé byl izolován z *Klebsiella pneumoniae* v Alabamě a popsán v roce 1998 (Cavaco et al., 2009).

#### ***qnrB***

Byl nalezen v plazmidu, kódujícím CTX-M15 betalaktamázu v *Klebsiella pneumoniae*, izolované v jižní Indii. *QnrB1* chrání DNA-gyrázu a kóduje protein o 226

aminokyselinách. *QnrB2* kóduje protein o 215 aminokyselinách a liší se od *qnrB1* v pěti aminokyselinách (Jacoby et al., 2006). Je známo 20 variant *qnrB* genu (Cavaco et al., 2009).

#### ***qnrC***

Tento gen byl nalezen v *Proteus mirabilis* (Cavaco et al., 2009). Kóduje protein o 221 aminokyselinách (Wang et al., 2009).

#### ***qnrS***

Tento gen kóduje protein o 218 aminokyselinách a vykazuje pouze 59% shodu aminokyselin s *qnrA*. Byl nalezen v *Shigella flexneri* v Japonsku (Kehrenberg et al., 2006) a jsou známy 4 varianty *qnrS* genu (Cavaco et al., 2009).

#### ***qnrD***

Byl nalezen v izolátech *Salmonella enterica* v Číně a kóduje protein o 214 aminokyselinách (Cavaco et al., 2009).

#### ***aac(6)Ib-cr***

Kóduje aminoglykosid – acetyltransferázu, která je schopna specificky acetylovat hydrofilní fluorochinolony jako například ciprofloxacin. Tento gen je velmi rozšířen v čeledi Enterobacteriaceae (Frasson et al., 2011).

#### ***qepA***

Umožňuje rezistenci k fluorochinolonům přes effluxní pumpu. Kóduje protein o 511 aminokyselinách, který pravděpodobně obsahuje 14 transmembránových segmentů (Yamane et al., 2007).

#### ***OqxAB***

Umožňuje rezistenci k olachindoxu přes effluxní pumpu bakterie a zvyšuje rezistenci k ostatním fluorovaným chinolonům. Protein *oqxAB* je kódován geny *oqxA* a *oqxB* umístěných na stejném operonu (Zhao et al., 2010). Olachindox byl používán jako stimulant růstu u prasat (Kim et al., 2009).

### **2.8.2 Chromozomálně vázané geny**

#### ***gyrA a gyrB***

*GyrA* a *gyrB* geny kódují DNA-gyrázu, což je tetramerní peptid nutný pro replikaci bakteriální DNA (Oram et al., 1992).



### ***parC a parE***

Jsou geny kódující topoizomerázu IV. Mutace v těchto genech zvyšuje rezistenci k fluorovaným chinolonům (Moon et al., 2010).

## **2.9 Geny rezistence k cefalosporinům**

Hlavní způsob rezistence k cefalosporinům je tvorba betalaktamáz. První penicilináza byla nalezena v *E. coli* v roce 1940 Abrahamem a Chainem ještě předtím, než se začal penicilin používat (Drawz and Bonomo, 2010).

S objevováním stále nových betalaktamáz bylo potřeba nějakým způsobem enzymy roztřídit. První dělení betalaktamáz navrhli v roce 1970 Jack a Richmond, v roce 1973 bylo rozšířeno Richmondem a Sykesem. Betalaktamázy byly děleny podle toho, zda jsou kódovány chromozomálně či plazmidově, podle citlivosti k inhibitorům a podle hydrolytického spektra. V roce 1989 navrhnul Bush jiné dělení betalaktamáz dle substrátu, na který enzymy působí. Zde však byl háček, protože bodovou mutací v genu kódujícím enzym se mohla změnit substrátová specifita. Proto byl Amblerem navržen další způsob dělení (Livermore, 1995). Ambler dělí betalaktamázy do tříd A, B, C, D dle sekvence aminokyselin a mohou být kódovány chromozomálně či plazmidově (Šimůnek a Smola, 2007). Třídy A, C, D obsahují serinové enzymy, třída B zahrnuje Zn<sup>+2</sup> dependentní enzymy (Livermore, 1995).

Infekce způsobené ESBL produkovanými G<sup>-</sup>bakteriemi komplikují léčbu, navíc je omezen výběr antibiotik, které lze použít (Ramphal and Ambrose, 2006). ESBL tak představují hrozbu pro lidské zdraví i pro zvířata (Ewers et al., 2011). Poprvé byly ESBL popsány v roce 1983, v průběhu devadesátých let se nejvíce vyskytovaly TEM a SHV v *Klebsiella pneumoniae*, v současné době CTX-M betalaktamázy u *E. coli* (Coque et al., 2008).

### **2.9.1 Třída A**

Obsahuje betalaktamázy, které jsou inhibovány klavulanátem, tazobaktamem sulbaktamem. Jako první byly objeveny TEM a SHV. Z ESBL sem patří CTX-M, který je nejčastěji izolovanou širokospektrovou betalaktamázou v Evropě (Drawz and Bonomo, 2010).

#### **CTX-M**

Tento typ ESBL se rozšířil v devadesátých letech. Je známo 60 typů CTX-M betalaktamáz a dělí se pod skupiny CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9, CTX-M25 (Galas et al., 2008).

## **SHV**

Většina SHV typů betalaktamáz se vyskytuje v *P. aeruginosa*. SHV-1 způsobuje rezistenci k ampicilinu (Bradford, 2001).

## **TEM**

TEM enzymy byly poprvé objeveny v roce 1965 kódované na plazmidu (Livermore, 1995). U gramnegativních bakterií se nejčastěji vyskytuje TEM-1, která u *E.coli* způsobuje rezistenci k ampicilinu (Bradford, 2001). Zatím je známo 196 betalaktamáz tohoto typu <http://www.lahey.org/studies/temtable.asp> (3.3.12).

### **2.9.2 Třída B**

Patří sem  $Zn^{+2}$  dependentní betalaktamázy, odolné vůči používaným inhibitorům těchto enzymů. Geny kódující MBL mohou být plazmidově nebo chromozomálně vázané, mohou se přenášet i pomocí integronů (Drawz and Bonomo, 2010). Jsou citlivé na látky tvořící cheláty s dvojmocnými kovy jako je EDTA a thiolové sloučeniny (Tan et al., 2008).

### **2.9.3 Třída C**

Do této třídy se řadí ampC cefalosporinázy, které jsou kódovány buď plazmidově nebo chromozomálně (Aouf et al., 2011). způsobují rezistenci k cefalosporinům, penicilinům, kombinacím s inhibitory betalaktamáz (Drawz and Bonomo, 2010).

### **2.9.4 Třída D**

Typ OXA–betalaktamáz způsobuje rezistenci k cefalotinu a ampicilinu. Nejčastěji byl OXA typ betalaktamáz nalézán v *Pseudomonas aeruginosa* (Bradford, 2001).

### 3. Cíl práce

Antibiotická terapie infekcí potravinových zvířat je regulována Zákonem o léčivech a Veterinárním zákonem a souvisejícími předpisy v platném znění, především Vyhláškou č. 291/2003 Sbírky, která upravuje použití látek s farmakologickým účinkem, včetně antibiotik, sulfonamidů a chinolonů, u hospodářských zvířat.

Ceftiofur je pro veterinární užití v ČR registrován od roku 2004, chinolony již déle. Nadužívání fluorovaných chinolonů a cefalosporinů vyšších generací v chovech prasat může vést k selekci epidemiologicky významných typů antibiotické rezistence u bakterií, včetně komenzálních jako je *E. coli*. Tyto bakterie mohou prostřednictvím výkalů kontaminovat prostředí a při jatečném zpracování prasat maso a následně i tepelně neopracované masné výrobky. To může vytvořit podmínky pro přenos zmíněné rezistence potravním řetězcem na člověka. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli zjistit výskyt PMQR a producentů betalaktamáz širokého spektra u izolátů *E. coli* z prasat.

**Prvním cílem** DP bylo zjistit u izolátů *E. coli* porcinního původu z let 2005 - 2010 citlivost k ceftiofuru, nalidixové kyselině, ciprofloxacinu, enrofloxacinu a olachindoxu agarovou diluční metodou.

**Druhým cílem** bylo zjistit přítomnost některého z genů PMQR u izolátů *E. coli* se sníženou citlivostí k ciprofloxacinu a olachindoxu (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac*, *qepA*, *oqxAB*). U izolátů se zvýšeným MIC ceftiofuru hledat geny kódující některou z betalaktamáz širokého spektra.

## 4. Materiál a metodika

### 4.1 Pomůcky a materiál, přístroje, agary, kmeny bakterií:

- **Referenční kmen:** *E. coli* ATCC 25922
- **Testované kmeny:** zamražené izoláty *E. coli* porcinního původu z let 2005-2010
- **Agary:**
  - MHA (Oxoid, CM0337, UK)
  - MPA (Oxoid, CM0003, UK)
  - MCA (Oxoid, CM0115, UK)
- **Materiál a pomůcky:**
  - Sterilní destilovaná voda
  - Sterilní fyziologický roztok
  - Zásobní roztoky ATB
  - Petriho misky
  - Zkumavky „eppendorf“
  - Densila zkumavky
  - „Urinky“ zkumavky
  - Mikrotitrační destičky
  - Sterilní mikroinokulátor
  - Plastové inokulační kličky
  - Automatická pipeta, mikropipety a sterilní špičky
  - Sterilní skleněná pipeta
  - Laboratorní sklo
  - Sterilní jednorázové rukavice
  - Parafilm
  - TBE pufr
  - Agaróza

- **Přístroje:**

Autokláv IP 44 (CertoClav, Rakousko)

Analytické váhy Explorer (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Vodní lázeň (GFL, Německo)

Laminární box II.bezpečnostní třídy (Steril Antares, Itálie)

Vortex MS 2 Minishaker (IKA-WORKS, USA)

Denzitometr (Densi-La-Meter, LIAP, Litva)

Termostat Sanyo-MIR-153 (Sanyo, Japonsko)

Chladnička (Elektrolux, Švédsko)

Mrazicí box na uskladnění vzorků (Gorenje, Slovinsko)

Chlazená odstředivka Micro 22 R (Hettich, Německo)

Transluminátor s fotodokumentačním zařízením Ultra Lum (Claremont, USA)

Termocycler PTC 200 (MJ Research, USA)

Mikrovlnná trouba (Bosch, Německo)

Zařízení pro elektroforézu

## **4.2 Metodika**

### **4.2.1 Agarová diluční metoda**

#### **4.2.1.1 Složení a příprava kultivačních půd**

##### **MCA (Oxoid, CM0115, UK)**

**Složení:** 20 g/l peptonu, 10 g/l laktózy, 1,5 g/l žlučových solí, 5 g/l NaCl, 0,03 g/l neutrální červeně, 0,001 g/l krystalové violeti, 15 g/l agaru

Tento typ agaru slouží k odlišení koliformních bakterií od laktózu nefermentujících mikroorganismů. Koliformní bakterie mají fialovočervené kolonie (například *E. coli* ATCC 25922), zatímco laktózu nefermentující bakterie rostou bezbarvé.

**Příprava:** Do 0,5 l destilované vody jsem přidala adekvátní množství agaru v prášku stanovené výrobcem. Láhev jsem protřepala, víčko mírně povolila a láhev dala do autoklávu, kde se vysterilizovala. Poté jsem médium přemístila do vodní lázně a nechala vytemperovat

na 50 °C. Zchlazený agar jsem rozlila do Petriho misek a nechala ztuhnout. Označila jsem víčka datem přípravy agaru a druhý den uskladnila připravené agary v lednici.

#### **MPA (Oxoid, CM0003, UK)**

**Složení:** 23 g/l speciálního peptonu, 1 g/l škrobu, 5 g/l NaCl, 10 g/l agaru

MPA slouží k rychlému nárůstu velkých kolonií a při použití krve také ke zjištění zóny hemolýzy u hemolytických bakterií.

**Příprava:** Do 0,5 l destilované vody jsem přidala množství prášku stanovené výrobcem na obalu. Láhev jsem protřepala, víčko mírně povolila a láhev dala do autoklávu, kde se vysterilizovala. Poté jsem médium přemístila do vodní lázně a nechala vytemperovat na 50 °C. Zchlazený agar jsem rozlila do Petriho misek a nechala zchladnout a zatuhnout, označila datem přípravy a druhý den uskladnila v lednici.

#### **MHA (Oxoid, CM0337, UK)**

**Složení:** 300 g/l hovězího extraktu, 17,5 g/l hydrolyzátu kaseinu, 1,5 g/l škrobu, 17 g/l agaru

Hlavní využití má u testů stanovujících citlivost bakterií k antibiotikům.

**Příprava:** Do 0,5 l destilované vody jsem přidala 19 g MHA v prášku – množství stanovené výrobcem. Láhev jsem protřepala, víčko mírně povolila a přemístila do autoklávu. Po uvaření a vysterilizování jsem médium nechala vychladnout ve vodní lázni na 50 °C.

### **4.2.1.2 Zásobní roztoky ATB**

#### **Zásobní roztok nalidixové kyseliny**

Na přípravu 25 ml zásobního roztoku o výsledné koncentraci 512 mg/l jsem potřebovala 130,612 mg nalidixové kyseliny. Výpočet jsem provedla s ohledem na 98% účinnost ATB.

#### **Zásobní roztok olachindoxu**

Na přípravu 25 ml zásobního roztoku o výsledné koncentraci 64 mg/25 ml jsem navázila 0,0642 g olachindoxu, rozpustila ve 2 ml methanolu a poté dopipetovala 23 ml sterilní vody. Zásobní roztok jsem zvortexovala, rozplnila do zkumavek po 4 ml a rychle nechala zmrazit.

### **Zásobní roztok enrofloxacinu**

Navážením 16,327 mg enrofloxacinu na analytických vahách a doplněním sterilní vodou na výsledný objem 25 ml vznikl zásobní roztok ATB. Enrofloxacin má 98% účinnost.

### **Zásobní roztok ciprofloxacinu**

Navážila jsem 16,32 mg ciprofloxacinu na 25 ml roztoku. Navážku ciprofloxacinu jsem rozpustila ve 3 ml 0,1 N HCl. Za použití automatické pipety doplnila sterilní vodou objem na 25 ml v umělohmotném kontejnerku. Roztok jsem zvortexovala a pomocí automatické pipety rozplnila do označených urinek přibližně po 4,1 ml.

#### **Výpočet:**

64 mg/1000 ml

0,64 mg/10 ml

1,60 mg/25 ml x 10 = 16 mg na 25 ml roztoku při 100% účinnosti ATB, ciprofloxacin však má 98% účinnost, proto jsem navážila 16,326 mg na analytických vahách.

### **Zásobní roztok ceftiofuru**

Připravila jsem zásobní roztok o koncentraci 64 mg/l. Na 25 ml roztoku jsem navážila 16,16 mg ceftiofuru a počítala s 99% účinnosti antibiotika. Všechny základní roztoky jsem pak uchovávala v mrazničce při - 40 °C.

#### **4.2.1.3 Ředění ATB**

CEF: 64-32-16-8-4-2-1-0,5-0,25-0,125-0,0625-0,03-0,015

CIP: 64-32-16-8-4-2-1-0,5-0,25-0,125

NAL: 256-128-64-32-16-8-4

ENRO: 64-32-16-8-4-2-1-0,5-0,25-0,125

OLA: 256-128-64-32-16-8-4

#### **Řada s enrofloxacinem a ceftiofurem**

U enrofloxacinu jsem do první zkumavky odebrala 2 ml ze zásobního roztoku o koncentraci 64 mg/l. Do ostatních zkumavek jsem neprve pipetou odměřila 2 ml sterilní destilované vody. Do druhé zkumavky jsem ke 2 ml sterilní destilované vody přidala pipetou 2 ml enrofloxacinu. Obsah jsem zhomogenizovala vortexem. Poté jsem z této zkumavky

odebrala 2 ml roztoku a vpravila do třetí zkumavky a zvortexovala její obsah. Tímto způsobem jsem naředila enrofloxacin až po koncentraci 0,125 mg/l v poslední zkumavce, zbylé 2 ml jsem zlikvidovala i s použitou špičkou.

Takto jsem postupovala i u ceftiofuru, jelikož zásobní roztok měl koncentraci 64 mg/l. Ředění probíhalo až po koncentraci 0,015 mg/l. Při prvních měřeních jsem používala ředění jen po koncentraci 0,125 mg/l, v roce 2008 bylo u 30 izolátů použito ředění po koncentraci 2 mg/l.

#### **Řada s ciprofloxacinem**

U ciprofloxacinu bylo zapotřebí myslet na to, že zásobní roztok měl koncentraci 32 mg/l, proto jsem vždy do první zkumavky odměřila pipetou 4 ml, do druhé zkumavky 2 ml zásobního roztoku ciprofloxacinu a až od třetí zkumavky probíhalo ředění, tedy 2 ml ATB a 2 ml sterilní destilované vody.

#### **Řada s nalidixovou kyselinou**

U nalidixové kyseliny byl zásobní roztok o koncentraci 512 mg/l, proto jsem ředění prováděla už od první zkumavky, tedy 2 ml ATB a 2 ml sterilní destilované vody jsem zhomogenizovala vortexem a poté jsem odebrala 2 ml roztoku do druhé zkumavky se 2 ml sterilní destilované vody a pokračovala v ředění.

#### **Řada s olachindoxem**

Měření MIC u olachindoxu proběhlo až u vybraných 27 izolátů (dle  $MIC_{CIP} \geq 0,25$  mg/l). Do první zkumavky jsem odpipetovala ze zásobního roztoku 2 ml. Do druhé zkumavky taktéž, přičemž jsem tyto 2 ml zředila sterilní vodou v poměru 1:1. Po zvortexování jsem pipetou odebrala 2 ml do třetí zkumavky se 2 ml sterilní vody a takto pokračovala dál až k poslední zkumavce.

#### **4.2.1.4 Stanovení MIC *E. coli* k antimikrobiálním látkám agarovou diluční metodou**

##### **Vlastní postup**

Agarová diluční metoda slouží ke zjištění nejnižší koncentrace antibiotika (MIC), která je schopná inhibovat růst vyšetřované bakteriální kultury.

Ke stanovení jsem použila izoláty *E. coli*, které byly uchovány v zamraženém stavu v laboratorní sbírce Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie. Z „ependorfky“ jsem nabrala kulturu sterilním tamponkem a nanesla na MCA a pokračovala izolačním očkovaním.



Používané „eppendorfy“ s izoláty *E. coli* jsem uchovávala v „cooleru“, aby nerozmrzly a ihned po naočkování je vracela do mrazničky. Petriho misky jsem po naočkování nechala inkubovat dnem vzhůru v termostatu při 37 °C po 24 hodin. Mezitím na MCA agaru narostly izolované bakteriální kolonie.

Pro další postup jsem si nachystala MPA agar a nalila do Petriho misek. Ty jsem opět označila identifikačním kódem izolátů *E. coli* (popřípadě jen číslem v číselné řadě, ke kterým jsem v pracovním sešitě přiřadila identifikační číslo pro zjednodušení práce), rokem zamražení, datem, kdy jsem s Petriho miskou pracovala, a dále popisem „*E. coli*.“ Na ¼ MPA agaru jsem přeočkovala vždy jednu izolovanou kolonii z MCA. Takto přeočkované izoláty jsem opět nechala inkubovat dnem vzhůru při 37 °C po 24 hodin. Současně v tento den jsem si vyředila antibiotika a připravila MHA. Do označených Petriho misek jsem pak vpravila 2 ml naředěného antibiotika (4 ml v případě ciprofloxacinu u koncentrace 64 mg/l). Dále jsem do misek odpipetovala 18 ml (u nejvyšší koncentrace ciprofloxacinu 16 ml) MHA vychladlého na 50 °C. Při pipetování jsem si počínala co nejrychleji, protože agar rychle tuhne. Po nalití příslušného objemu agaru do Petriho misky jsem ještě opatrně miskou zahýbala, aby se obsah promísil a koncentrace ATB byla rovnoměrná. Takto připravené misky jsem nechala do druhého dne zchladnout a zatuhnout. Celý tento proces probíhal v laminárním boxu, za použití sterilních jednorázových rukavic tak, abych při přípravě misky nekontaminovala.

Třetí den jsem si připravila zákaly z izolátů narostlých na MPA agaru. Do označených Densila zkumavek jsem odpipetovala 2 ml sterilní deionizované vody. Sterilním tamponkem jsem se dotkla příslušné kultury na MPA agaru. Tamponkem jsem vpravila do Densila zkumavky a připravila suspenzi. Po promísení bakteriální suspenze vortexem jsem zkumavku vložila do densitometru, přičemž hustota zákalu musela odpovídat 0,5 stupně McFarlandovy stupnice. Z takto připravené suspenze jsem odebrala 30 µl pipetou a vpravila do 3 ml fyziologického roztoku ve zkumavce a opět zvortexovala. Po nachystání všech vzorků jsem ze zkumavek v laminárním boxu odebrala 200 µl suspenze do jamek mikrotitrační destičky, na kterou se vešlo maximálně 48 izolátů včetně kontrolní *E. coli* v šesti řadách po osmi izolátech. Sterilním mikroinokulátorem (Trios) jsem tyto izoláty nanášela do připravených Petriho misek s MHA, který už obsahoval naředěná antibiotika. Jedna Petriho miska obsahovala pouze MHA bez ATB, sloužila jako kontrola správného postupu a také pro porovnání růstu bakteriální kolonie na agaru s a bez antibiotika.

Takto naočkované Petriho misky jsem nechala 24 h v termostatu při 37 °C a poté vyhodnotila minimální inhibiční koncentrace antibiotika, které již potlačily růst *E. coli*.

Příkladem může sloužit koncentrace 4 mg/l a 8 mg/l. Pokud při koncentraci ATB 4 mg/l *E. coli* narostla a při 8 mg/l nenarostla, pak MIC je 8 mg/l. Skutečná koncentrace ATB, která inhibuje růst bakterie, však nemusí být 8 mg/l ale může ležet v intervalu (4 mg/l a 8 mg/l).

Celkem bylo touto metodou vyšetřeno 247 izolátů *E. coli* porcinního původu z let 2005 – 2010 k ceftiofuru, 236 izolátů k nalidixové kyselině, ciprofloxacinu, enrofloxacinu a 27 izolátů k olachindoxu.

## **4.2.2 PCR**

### **4.2.2.1 Podstata PCR**

Je to metoda, kterou se dá zmnožit určitá část DNA in vitro za pomoci primerů, termostabilní polymerázy a dNTP. Denurací dsDNA při 94 – 96 °C vznikají dva komplementární ssDNA řetězce, ke kterým při teplotě okolo 30 – 65 °C nasedají primery. Primery označují 5'-konec nově syntetizovaného řetězce a syntéza probíhá k 3'-konci pomocí termostabilní DNA polymerázy při 72 °C. Takto vzniklé dsDNA řetězce opět zdenaturují při cca 94 – 96 °C a cyklus se opakuje dále (25 - 35 cyklů). Cílem je získat velký počet amplikonů, což jsou úseky dsDNA přesně ohraničené z obou konců amplifikovaného úseku primery (Šmarda a kol., 2005).

Metodou PCR lze testovat přítomnost jak rezistence vázané na plazmidy (geny *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qnrD*, *aac(6')Ib-cr*, *qepA*), tak přítomnost chromozomálních mutací v genech *gyrA*, *gyrB* (u DNA gyrázy) a genech *parC*, *parE* (u topoizomerázy IV). Konkrétní použité primery jsou uvedeny v tabulce č. 1, jednotlivé programy pro PCR reakci v tabulce č. 2 (dle laboratorní metodiky Ústavu biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE, VFU Brno).

**Tabulka č. 1: Seznam použitých primerů**

gen	primery	sekvence (5'→3')	délka produktu (bp)	T <sub>a</sub> [°C]	zdroj	
qnrA	qnrA-F	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	516	53	Robiscek et al., 2006	
	qnrA-R	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA				
qnrB	qnrB-F	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	476			Kim., 2009
	qnrB-R	ATGAGCAACGATGCCTGGTA				
qnrC	qnrC-F	GGGTTGTACATTTATTGAATCG	307		Kim., 2009	
	qnrC-R	CACCTACCCATTTATTTTCA				
qnrS	qnrS-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428		Cattoir et al., 2007	
	qnrS-R	TCTAAACCGTCGAGTTCCGGCG				
qnrD	qnrD-F	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	582	57	Cavaco et al., 2009	
	qnrD-R	AACAAGCTGAAGCGCCTG				
aac(6')Ib	aac(6')Ib-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	55	Park et al., 2006	
	aac(6')Ib-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTC				
qepA	qepA-F	TGGTCTACGCCATGGACCTCA	1136	53	Périchon et al., 2007	
	qepA-R	TGAATTCGGACACCGTCTCCG				

**Tabulka č. 2: Programy a jednotlivé kroky PCR**

Jednotlivé programy PRC reakce					
postup	děj	program			
		qnr	qnrD	aac	qepA
		teplota(°C)/čas			
1.	úvodní denaturace DNA	94/7 min	94/10 min	94/10 min	94/4 min
2.	denaturace DNA	94/45 s	94/1 min	94/45 s	94/1 min
3.	připojení primerů	53/45 s	57/1 min	55/45 s	55/1 min
4.	syntéza DNA řetězce	72/1 min	72/1 min	72/45 s	72/1,5 min
5.	opakování kroků 2-4	32 cyklů	30 cyklů	35 cyklů	30 cyklů
6.	závěrečná syntéza DNA řetězce	72/10 min			
7.	chlazení	4/alespoň 5 min			

#### 4.2.2.2 Příprava vzorků pro PCR

Vyočkovala jsem 29 izolátů *E. coli* s MIC ciprofloxacinu  $\geq 0,25$  mg/l na McConkey agar křížovým roztěrem a nechala kultivovat 24 hodin v termostatu při 37 °C. Na MPA agar jsem rozetřela vždy jednu čistou kolonii *E. coli* z MCA a opět nechala 24 hodin kultivovat. Třetí den jsem sterilním tamponkem setřela kulturu *E. coli* a suspendovala v 0,5 ml sterilní destilované vody v „eppendorfce.“ Takto připravené vzorky jsem vortexovala a nechala 10 minut vařit na vodní lázni při 100 °C a poté centrifugovala po 3 minuty při 13000 otáčkách za

minutu. Vzniklý supernatant jsem odpipetovala do označených „eppendorfek“ a vzorky DNA zmrazila pro další použití.

Ve výsledcích pak uvádím pouze 27 vzorků. Dva vzorky jsem vyřadila z hodnocení, jelikož jeden izolát (69648) byl telecího a ne porcinního původu a druhý vzorek (71105) měl různé MIC při dvou měřeních, přičemž opravné měření jsem provedla až v průběhu testování pomocí PCR. Jelikož MIC<sub>CIP</sub> bylo nižší než 0,25 mg/l, vyřadila jsem tento izolát z hodnocení výsledků.

#### 4.2.2.3 Multiplex PCR pro *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*

Všechny komponenty PCR reakce jsem nechala rozmraznout, zvortexovala a zcentrifugovala. Těsně před použitím jsem promíchala špičkou pipety. K měření jsem použila DNA 29 rezistentních vzorků *E. coli*, dále jsem do měření zařadila pozitivní a negativní kontrolu. Počítala jsem se 2 vzorky na propipetování, proto výpočet množství komponent dohromady, odpovídal 33 vzorkům. V každé „eppendorfce“ tedy bylo 12,5 µl směsi s DNA, kromě negativní kontroly, kde jsem místo vzorku DNA nepřidávala nic, takže množství směsi bylo 12 µl. Nachala jsem proběhnout PCR reakci. Dle výsledků z agaróзовé gelové elektroforézy jsem provedla u pozitivních vzorků singleplex PCR pro jednotlivé geny *qnr*. Množství jednotlivých komponent pro multiplex reakci je uvedeno v tabulce č. 3.

**Tabulka č. 3: Přehled množství komponent pro multiplex PCR pro *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS***

komponenty	množství v µl	množství pro 33 vzorků v µl
PPP Master Mix	6,25	206,25
PCR voda	5,35	176,55
primer qnr A-F	0,05	1,65
primer qnr A-R	0,05	1,65
primer qnr B-F	0,05	1,65
primer qnr B-R	0,05	1,65
primer qnr C-F	0,05	1,65
primer qnr C-R	0,05	1,65
primer qnr S-F	0,05	1,65
primer qnr S-R	0,05	1,65
vzorek DNA	0,50	

#### 4.2.2.4 PCR pro *qnrD*, *aac(6')Ib-cr* a *qepA* geny

Probíhá podobně jako multiplex pro *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* a *qnrS*. Vzorky DNA jsem rozdělila do 6 „ependorfek“ po 5 vzorcích. Množství směsí je uvedeno v tabulce č. 4. Počítala jsem se směsí na 8 „ependorfek“ (6 směsných vzorků, pozitivní a negativní kontrola). U PCR pro *qepA* gen, bylo nutné přidat DMSO a o to méně přidat PCR vody. Při výpočtech jsem zahrnula vždy jeden imaginární vzorek navíc na propipetování.

**Tabulka č. 4: Množství komponent u PCR pro *qnrD*, *aac(6')Ib-cr* a *qepA* geny**

komponenty	<i>aac(6')Ib-cr</i>	komponenty	<i>qnrD</i>	komponenty	<i>qepA</i>
	množství v $\mu$ l		množství v $\mu$ l		množství v $\mu$ l
PPP Master Mix	56,25	PPP Master Mix	56,25	PPP Master Mix	56,25
PCR voda	29,25	PCR voda	29,25	PCR voda	18,00
primer AAC P1	2,25	primer qnrD P1	2,25	primer qepA P1	2,25
primer AAC P2	2,25	primer qnrD P2	2,25	primer qepA P2	2,25
DNA v $\mu$ l	2,50	DNA v $\mu$ l	2,50	DNA v $\mu$ l	2,50
				DMSO	11,25

#### 4.2.2.5 Simplex PCR pro *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* a *aac(6')Ib-cr* geny

Pro ověření pravděpodobné rezistence vzorků sledovaných pomocí multiplex PCR jsem provedla ještě simplex PCR. Na termocycleru jsem zvolila stejný program jako pro multiplex reakci. Množství komponent pro jednotlivé vzorky této reakce uvádí tabulka č. 5.

**Tabulka č. 5: Množství komponent u simplex PCR pro *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* a *aac(6')Ib-cr* geny**

komponenty	množství v $\mu$ l
PPP Master Mix	6,25
PCR voda	5,65
primer 1	0,05
primer 2	0,05
vzorek DNA	0,50

#### 4.2.2.6 Detekce produktu PCR agarózovou gelovou elektroforézou

Nejprve jsem si připravila 2,5% agarózový gel (pro produkty multiplex PCR) / 1,5% gel (pro simplex PCR a PCR genu *aac(6')Ib-cr*). Ke 2 g / 1,2 g agarózy jsem přidala 80 ml 1x

koncentrovaného TBE pufru a vařila tuto suspenzi v mikrovlnné troubě, dokud nebyl gel hotov. Po vychladnutí přibližně na 60 °C (pod tekoucí vodou) jsem přidala automatickou pipetou 80 µl naředěného ethidium bromidu. Tuto směs jsem nalila do „traye“ s hřebínkem / hřebínky a případné bublinky odstranila špičkou pipety tak, aby nepřekážely při měření. Gel jsem nechala 30 až 40 minut ztuhnout při pokojové teplotě ve vodorovné poloze. Poté jsem opatrně vyjmula hřebínek a gel přenesla do elektroforetické vany s TBE puftrem. Gel by měl být alespoň půl centimetru pod hladinou TBE pufru. Vana musela být umístěná tak, aby se záporně nabitá DNA mohla pohybovat v gelu směrem k anodě. Elektroforéza multiplex produktů probíhala při 130 V 75 minut, u simplex produktů 25 minut. Do jamek od hřebenu jsem nanesla PCR produkty v množství 3 µl, negativní kontrolu, 1 µl pozitivní kontroly smíchané s 1,5 µl STOP MIXU a dále v každé řadě nesměl chybět „DNA marker“ (určuje přibližnou velikost jednotlivých PCR produktů) v množství 2 µl. Použila jsem univerzální DNA marker s fragmenty o velikosti 100 – 1500 bp.

Po vypnutí proudu a odpojení elektrod jsem přenesla gel na transluminátor (UV = 305 nm) a vyfotografovala pomocí fotoaparátu napojeného k počítači. Velikost jednotlivých fragmentů se dá porovnat s použitým DNA markerem. Je-li některý vzorek pozitivní, provádí se sekvenace ke zjištění přesného pořadí nukleotidů v PCR produktu

(vypracováno dle laboratorní metodiky Ústavu biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE, VFU Brno).

#### **4.2.3 Převzatá data**

Do DP byly převzaty výsledky průkazu genů rezistence u izolátů *E. coli* z let 2005 – 2010 porcinního původu, testovaných na přítomnost širokospektrých betalaktamáz SHV, TEM, CTX-M. U 212 izolátů *E. coli* byla provedena agarová diluční metoda a u izolátů se zvýšenou MIC ceftiofuru byla sledována tvorba ESBL double disk synergy testem. Metodou PCR byla potvrzena produkce CTX-M1 celkem u 8 izolátů (Kohoutová a kol., 2010).

Dále byly převzaty výsledky průkazu genu *oqxAB* u 27 izolátů *E. coli* porcinního původu z let 2005 – 2010. U těchto izolátů jsem testovala MIC k olachindoxu agarovou diluční metodou. Izoláty se zvýšenou hodnotou MIC byly následně prověřeny na přítomnost tohoto genu.

## 5. Výsledky

### 5.1 Vyhodnocení citlivosti *E. coli* z prasat k ceftiofuru agarovou diluční metodou

Výsledky MIC ceftiofuru jsou dokumentovány v tabulce č. 6. Z dosažených výsledků vyplývá, že populace souboru izolátů *E. coli* porcinního původu z let 2005 - 2010 je rozdělena na citlivou část ( $MIC \leq 2$  mg/l), středně citlivou (4 mg/l) a rezistentní ( $\geq 8$  mg/l). Izoláty středně citlivé a rezistentní byly podrobeny testování přítomnosti genů kódujících betalaktamázy širokého spektra (viz. kapitola č. 4.2.3 Převzatá data).

V roce 2007 měly 2 izoláty  $MIC \leq 0,125$  mg/l, jelikož původní ředění ceftiofuru bylo 0,125 až 64 mg/l, až později jsem prováděla ředění ATB od 64 mg/l po 0,015 mg/l. Tyto dva izoláty byly v tabulce č. 6 zařazeny ke koncentraci 0,125 mg/l.

V roce 2008 bylo u třiceti z celkových 74 izolátů použito ředění ATB 2 mg/l až 64 mg/l, proto hodnoty  $MIC \leq 2$  mg/l byly v tabulce č. 6 zařazeny ke koncentraci 2 mg/l. Hodnoty průměrných MIC u těchto 30 izolátů k testovanému ceftiofuru jsou uvedeny v příloze č. 3, hodnoty MIC ostatních izolátů *E. coli* jsou uvedeny v přílohách č. 1, 2 a 4.

**Tabulka č. 6: Výsledky agarové diluční metody pro ceftiofur**

rok	koncentrace ATB v mg/l												počet izolátů	
	$\leq 0,015$	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32		$\geq 64$
2005	2			17	12	4								35
2006				2	10	24	2	1	1		1	2		43
2007				4	7	34	4	1						50
2008				1	8	21	5	13	2		1	1	22	74
2009					3	15	1							19
2010					8	3	8	3			4			26
celkem	0	2	0	7	53	109	24	18	3	0	6	3	22	247

### 5.2 Vyhodnocení citlivosti *E. coli* z prasat k ciprofloxacinu agarovou diluční metodou

Výsledky MIC ciprofloxacinu jsou dokumentovány v tabulce č. 7. Z dosažených výsledků vyplývá, že populace souboru izolátů *E. coli* porcinního původu z let 2005 - 2010 je rozdělena na citlivou část ( $MIC \leq 0,25$  mg/l) středně citlivou (0,5 – 1 mg/l) a rezistentní ( $MIC \geq 2$  mg/l). Jelikož se ciprofloxacin u prasat nepoužívá, použila jsem pro interpretaci dat hraniční hodnoty enrofloxacinu. Rezistence k ciprofloxacinu byla spíše ojedinělá.

**Tabulka č. 7: Výsledky agarové diluční metody pro ciprofloxacin**

rok	koncentrace ATB v mg/l										počet izolátů
	≤ 0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	≥ 64	
2005	35	4									39
2006	36	3	1					1			41
2007	36			1			1		1		39
2008	63	1	4			1		1			70
2009	21										21
2010	18	6	1			1					26
celkem	209	14	6	1	0	2	1	2	1	0	236

### 5.3 Vyhodnocení citlivosti *E. coli* z prasat k nalidixové kyselině agarovou diluční metodou

Výsledky MIC nalidixové kyseliny jsou dokumentovány v tabulce č. 8. Z dosažených výsledků vyplývá, že populace souboru izolátů *E. coli* porcinního původu z let 2005 - 2010 je rozdělena na citlivou část (MIC ≤ 8 mg/l), středně citlivou (16 mg/l) a rezistentní (MIC ≥ 32 mg/l). Výskyt rezistentních izolátů k tomuto chinolonu je dle výsledků častý.

**Tabulka č. 8: Výsledky agarové diluční metody pro nalidixovou kyselinu**

rok	koncentrace ATB v mg/l							počet izolátů
	≤ 4	8	16	32	64	128	≥ 256	
2005	25	6	1			3	4	39
2006	25	4		3	3	2	4	41
2007	25	11					3	39
2008	47	15	1		1		6	70
2009	18	2			1			21
2010	16	3					7	26
celkem	156	41	2	3	5	5	24	236

### 5.4 Vyhodnocení citlivosti *E. coli* z prasat k enrofloxacinu agarovou diluční metodou

Výsledky MIC enrofloxacinu jsou zaznamenány v tabulce č. 9. Z dosažených výsledků vyplývá, že populace souboru izolátů *E. coli* porcinního původu z let 2005 - 2010 je rozdělena na citlivou část (MIC ≤ 0,25 mg/l), středně citlivou (0,5 – 1 mg/l) a rezistentní (MIC ≥ 2 mg/l). Byl zaznamenán ojedinělý výskyt rezistentních izolátů v jednotlivých letech.



**Tabulka č. 9: Výsledky agarové diluční metody pro enrofloxacin**

rok	koncentrace ATB v mg/l										počet izolátů
	≤ 0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	≥ 64	
2005	35	1	3								39
2006	34	3	3						1		41
2007	36		1				2				39
2008	63	1	4		1					1	70
2009	21										21
2010	19	4	1	1			1				26
celkem	208	9	8	4	1	1	0	3	1	1	236

Hodnoty MIC k CIP, NAL a ENRO v jednotlivých letech jsou uvedeny v přílohách č. 5, 6, 7, 8, 9 a 10.

### 5.5 Vyhodnocení citlivosti vybraných kmenů *E. coli* k olachindoxu agarovou diluční metodou

Vybrané izoláty (27 izolátů, přičemž výběr izolátů se řídil hodnotou MIC<sub>CIP</sub> ≥ 0,25 mg/l) z let 2005 – 2010 byly testovány agarovou diluční metodou na olachindox. Výsledky jsou zaznamenány v tabulce č. 10 a hodnoty MIC v příloze č. 11. Tyto vzorky byly dále testovány metodou PCR a PGE na přítomnost genů *oqxAB*.

**Tabulka č. 10: Výsledky agarové diluční metody pro olachindox u 27 izolátů**

koncentrace olachindoxu [mg/l]							celkový počet izolátů	MIC <sub>50</sub> [mg/l]	MIC <sub>90</sub> [mg/l]	rozsah ATB [mg/l]
4	8	16	32	64	128	256				
12	14	1					27	16	16	8,0-32

Legenda: MIC<sub>50</sub> představuje koncentraci ATB, která je schopná inhibovat růst 50 % bakteriálních kmenů; MIC<sub>90</sub> představuje koncentraci ATB, která inhibuje 90 % bakteriálních kmenů; rozsah udává rozpětí koncentrací ATB od nejnižší po nejvyšší koncentraci, kde byla zaznamenána inhibice nárůstu kmenů bakterií. U jednotlivých koncentrací olachindoxu je uveden počet inhibovaných kmenů *E. coli*.

Tabulka číslo 11 dokumentuje přehled o hodnotách MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> a rozsahu MIC všech testovaných ATB v jednotlivých letech. Z výsledků vyplývá, že nálezy zvýšených MIC

ceftiofuru se vyskytly sporadicky pouze v letech 2006, 2008 a 2010, což ovlivnilo uvedené hodnoty.

V případě fluorovaných chinolonů CIP a ENRO nebyl během sledovaného období zaznamenán vývoj hodnot MIC. V případě NAL byly v jednotlivých letech získány nekonzistentní výsledky.

**Tabulka č. 11: MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> jednotlivých ATB v letech 2005-2010**

ATB	rok	2005	2006	2007	2008	2009	2010
CEF	MIC <sub>50</sub>	0,25	0,5	0,5	2	0,5	1
	MIC <sub>90</sub>	1	2	0,5	64	0,5	16
	rozsah	0,03-1	0,125-32	0,125-2	0,125-64	0,25-1	0,25-16
CIP	MIC <sub>50</sub>	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
	MIC <sub>90</sub>	0,25	0,25	0,125	0,125	0,125	0,25
	rozsah	0,125-0,25	0,125-16	0,125-32	0,125-16	0,125-0,125	0,125-4
NAL	MIC <sub>50</sub>	4	4	4	4	4	4
	MIC <sub>90</sub>	256	128	8	16	8	256
	rozsah	4,0-256	4,0-256	4,0-256	4,0-256	4,0-64	4,0-256
ENRO	MIC <sub>50</sub>	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
	MIC <sub>90</sub>	0,25	0,25	0,125	0,125	0,125	0,5
	rozsah	0,125-1	0,125-32	0,125-16	0,125-64	0,125-0,125	0,125-16

Legenda: MIC<sub>50</sub> představuje koncentraci ATB, která je schopná inhibovat růst 50 % bakteriálních kmenů; MIC<sub>90</sub> představuje koncentraci ATB, která inhibuje 90 % bakteriálních kmenů; rozsah udává rozpětí koncentrací ATB od nejnižší po nejvyšší koncentraci, kde byla zaznamenána inhibice nárůstu kmenů bakterií.

## 5.6 Vyhodnocení PCR

Dvacet sedm izolátů s MIC ciprofloxacinu  $\geq 0,25$  mg/l bylo testováno metodou PCR a gelovou elektroforézou na plazmidově vázané geny rezistence *aac(6')Ib-cr*, *qepA*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*. Byl prokázán gen rezistence *qnrS* u izolátu 63590 z roku 2008. Ostatní izoláty měly negativní výsledek (viz. tabulka č. 15, fotografie č. 1).

Dále bylo těchto 27 izolátů testováno na *oqxAB*, s jediným pozitivním výsledkem u vzorku 73624 z roku 2010. Výsledky PCR a elektroforézy dokumentuje fotografie č. 2, tabulka č. 16. Ověření přítomnosti obou genů u pozitivního vzorku dokumentuje fotografie č.

3 a tabulka č. 17. Nejprve byla zjišťována přítomnost genu *oqxB*, až u pozitivních výsledků (byl jen jeden) byla zjišťována přítomnost genu *oqxA* zároveň s *oqxB*.

Dvě stě dvanáct izolátů *E.coli* porcinního původu z let 2005 - 2010 bylo testováno k ceftiofuru agarovou diluční metodou. Izoláty s hodnotou MIC u ceftiofuru  $\geq 1$  mg/l byly podrobeny double disc synergy testu na prokázání tvorby ESBL. Izoláty s pozitivním výsledkem byly testovány metodou PCR a PFGE na přítomnost genů kódujících tvorbu ESBL. V roce 2008 mělo 22 izolátů  $MIC_{CEF} \geq 32$  mg/l, které byly také testovány metodou PCR na přítomnost genů kódujících betalaktamázy CTX-M, SHV a TEM, poté byly pomocí PFGE charakterizovány. Osm izolátů mělo pozitivní výsledek na gen *bla*<sub>CTX-M1</sub> (Kohoutová a kol., 2010). Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 13.

**Tabulka č. 12: Výsledky průkazu genů PMQR u 27 izolátů *E. coli* s hodnotou MIC u CIP  $\geq 0,25$ mg/l**

Geny PMQR						
<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrC</i>	<i>qnrD</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac</i>	<i>oqxAB</i>
0/27*	0/27	0/27	0/27	1/27	0/27	1/27

Legenda: PMQR – plazmidově zprostředkovaná rezistence k chinolonům, MIC – minimální inhibiční koncentrace, \* počet pozitivních / počet vyšetřených

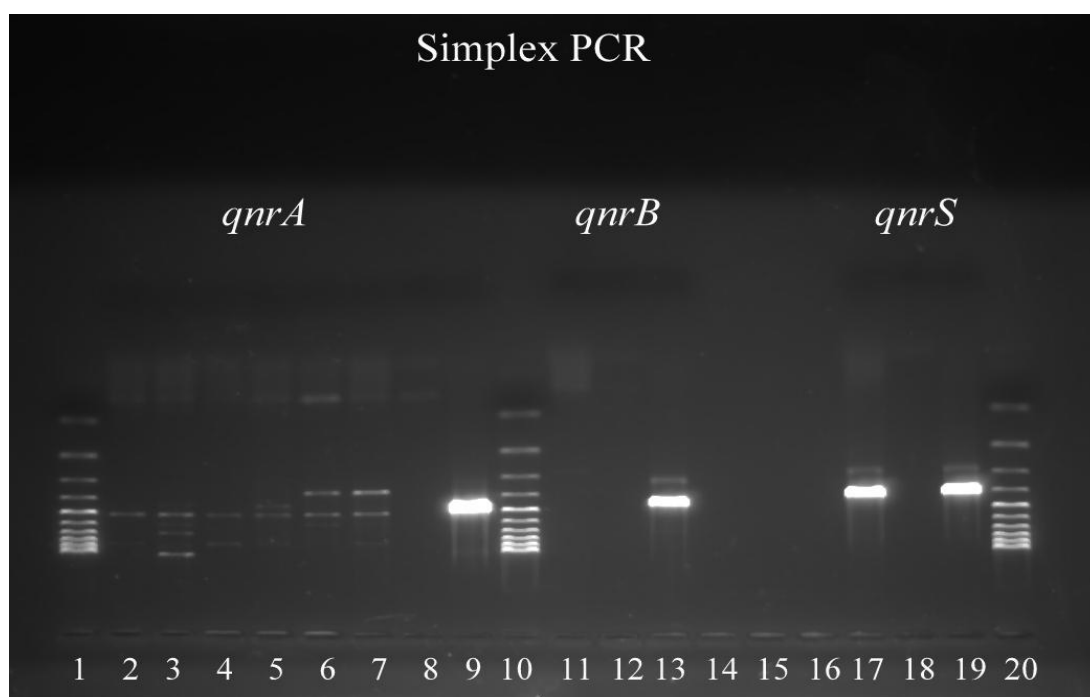
**Tabulka č. 13: Přehled MIC ceftiofuru a průkazu *bla*<sub>CTX-M1</sub> u *E. coli* porcinního původu z roku 2008**

číslo izolátu	MIC [mg/l]	gen <i>bla</i> <sub>CTX-M1</sub>	číslo izolátu	MIC [mg/l]	gen <i>bla</i> <sub>CTX-M1</sub>
63457	64	<b>pozitivní</b>	63471	$\geq 64,00$	<b>pozitivní</b>
63458	64	negativní	63472	$\geq 64,00$	negativní
63462	64	negativní	63474	$\geq 64,00$	<b>pozitivní</b>
63463	64	negativní	63475	32	negativní
63464	$\geq 64,00$	negativní	63476	$\geq 64,00$	negativní
63465	$\geq 64,00$	negativní	63478	$\geq 64,00$	negativní
63466	$\geq 64,00$	<b>pozitivní</b>	63479	$\geq 64,00$	<b>pozitivní</b>
63467	$\geq 64,00$	<b>pozitivní</b>	63480	$\geq 64,00$	negativní
63468	$\geq 64,00$	<b>pozitivní</b>	66606	$\geq 64,00$	negativní
63469	$\geq 64,00$	<b>pozitivní</b>	66608	$\geq 64,00$	negativní
63470	$\geq 64,00$	negativní	66609	$\geq 64,00$	negativní
počet testovaných vzorků na gen <i>bla</i> <sub>CTX-M1</sub>					22
počet pozitivních vzorků					8

Tabulka č. 14: Výsledek multiplex PCR pro *qnr* geny

číslo jamky	vzorek	možný gen	číslo jamky	vzorek	možný gen
1	marker		1	marker	
2	43207		2	63951	
3	43206		3	63590	<i>qnrB, qnrS</i>
4	43521		4	66609	<i>qnrA</i>
5	49119		5	66608	<i>qnrA</i>
6	54804		6	69648 - tele	
7	pozitivní kontrola		7	marker	
8	marker		8	73575	
9	54611		9	73569	
10	55744		10	77566	
11	54356		11	73624	
12	55653	<i>qnrA</i>	12	112A	
13	56246	<i>qnrA</i>	13	pozitivní kontrola	
14	marker		14	marker	
15	57122		15	71105 - omyl	
16	58461	<i>qnrA</i>	16	73578	
17	62480		17	74464	
18	62375		18	71558	
19	63463	<i>qnrA</i>	19	marker	
20	marker		20		

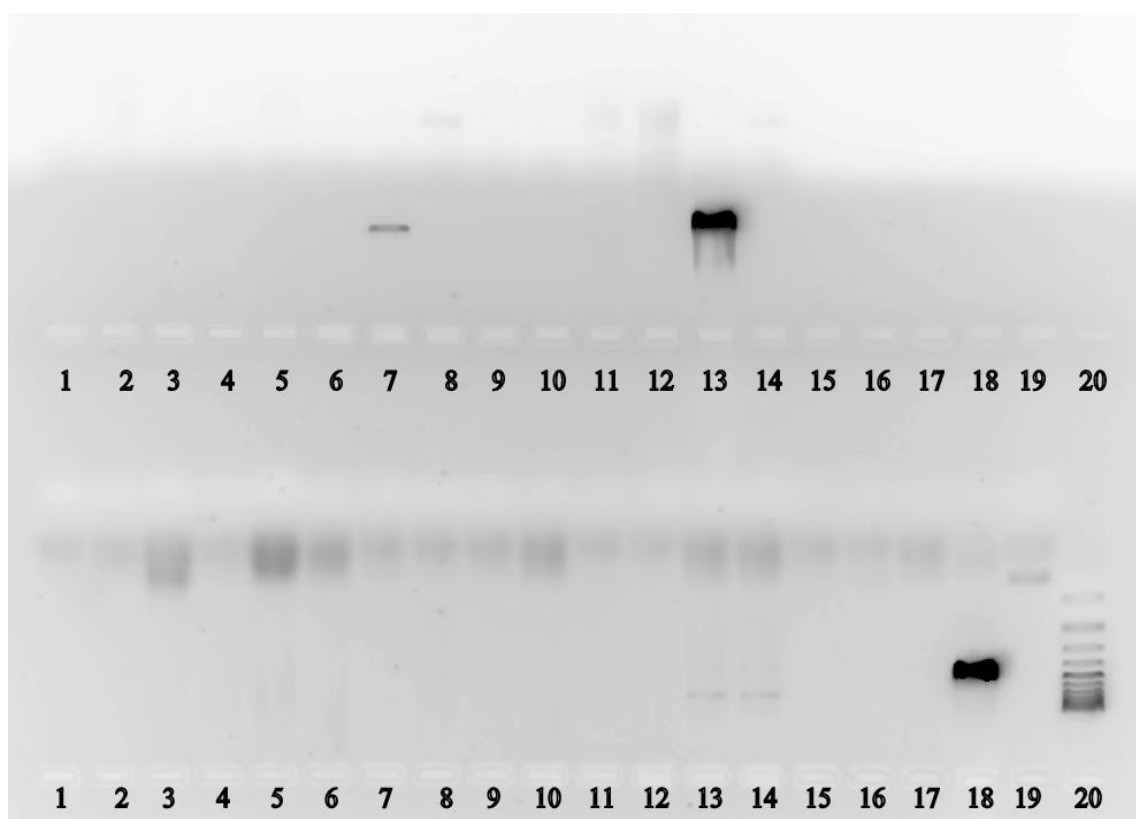
Fotografie č. 1: Singleplex PCR pro geny *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*



**Tabulka č. 15: Komentář k fotografii dokumentující simplex PCR pro *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* geny**

gen	číslo jamky	vzorek	výsledek	gen	číslo jamky	vzorek	výsledek
<i>qnrA</i>	1	marker		<i>qnrB</i>	11	63590	negativní
	2	55653	negativní		12	neg.kontrola	
	3	56246	negativní		13	poz.kontrola	
	4	58461	negativní		14	nic	
	5	63463	negativní		15	nic	
	6	66609	negativní	<i>qnrS</i>	16	nic	
	7	66608	negativní		17	63590	pozitivní
	8	neg. kontrola			18	neg. kontrola	
	9	poz. kontrola			19	poz. kontrola	
	10	marker			20	marker	

**Fotografieč. 2: Výsledek PCR na *oqxB* MVDr.Kohoutové:**

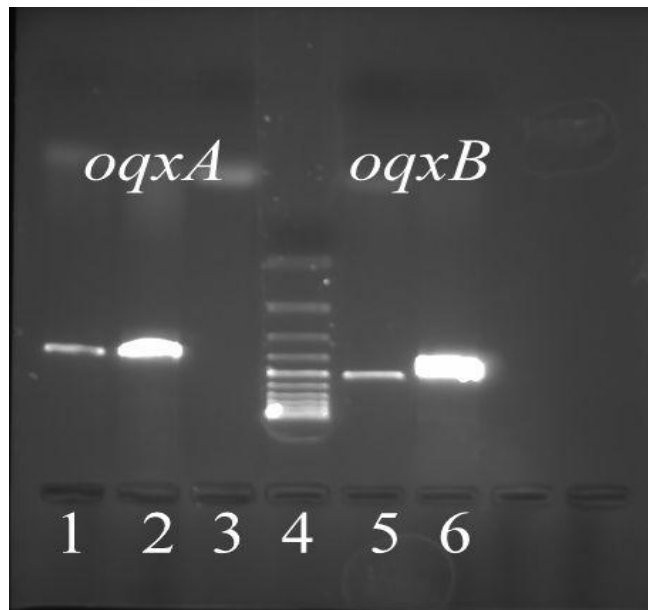


**Tabulka č. 16: Komentář k fotografii PCR pro *oqx*B gen**

číslo jamky	izolát	výsledek	číslo jamky	izolát	výsledek
1	66609	negativní	1	43207	negativní
2	66608	negativní	2	43206	negativní
3	69648-tele	negativní	3	43521	negativní
4	73575	negativní	4	49119	negativní
5	73569	negativní	5	54804	negativní
6	77566	negativní	6	54611	negativní
7	73624	<b>pozitivní</b>	7	55744	negativní
8	112A	negativní	8	54356	negativní
9	71105-omyl	negativní	9	55653	negativní
10	73578	negativní	10	56246	negativní
11	74464	negativní	11	57122	negativní
12	71558	negativní	12	58461	negativní
13	pozitivní kontrola		13	62480	negativní
14	negativní kontrola		14	62375	negativní
15			15	63463	negativní
16			16	63951	negativní
17			17	63590	negativní
18			18	pozitivní kontrola	
19			19	negativní kontrola	
20			20	marker	
<b>horní řada fotografie</b>			<b>dolní řada fotografie</b>		

Legenda: Horní řada jamek fotografie pro *oqx*B je v tabulce uvedena vlevo, dolní řada jamek na fotografii je okomentovaná v pravé části tabulky.

**Fotografie č. 3: Výsledek PCR pro geny *oqxA* a *oqxB***



**Tabulka č. 17: Komentář k fotografii PCR pro geny *oqxA* a *oqxB***

číslo jamky	izolát	výsledek
1	73624	pozitivní
2	pozitivní kontrola <i>oqxA</i>	
3	negativní kontrola	
4	marker	
5	73624	pozitivní
6	pozitivní kontrola <i>oqxB</i>	

## 6. Diskuze

Antibiotika patří mezi nejčastěji používaná léčiva ve veterinární medicíně. Rezistence k nim zpočátku nebyla příliš rozšířena a byly nalézány i syntetizovány stále nové struktury, schopné inhibovat růst nebo zabíjet původce nebezpečných onemocnění, tudíž byl nárůst rezistence dlouho opomíjen (Schwarz et al., 2006). Postupem času se však tento problém stal celosvětovým a bylo nutno zavést postupy, které by vedly ke snížení nárůstu počtu rezistentních mikroorganismů a účinnost antibiotik nebyla snižována zbytečným nadužíváním. Důležitou součástí těchto postupů je i monitoring výskytu rezistence. Přenos rezistentních bakterií je nebezpečný nejen proto, že se rychle šíří mezi zvířaty v chovu, ale také je možný přenos na člověka, především pracovníky farmy, jak dokazuje dánská studie z roku 2009, kde byl sledován přenos genu *bla*<sub>CTX-M1</sub> (Moodley and Guardabassi, 2009). Kromě toho se mohou rezistentní izoláty dostat i do volné přírody z exkrementů potravinových zvířat a jsou poté nalézány i u divoce žijících savců a ptáků, především v oblastech s vysokou hustotou chovů zvířat (Dolejská a kol., 2007; Guenther et al., 2010).

Mým cílem bylo sledovat citlivost izolátů *E. coli* porcinního původu k ceftiofuru a chinolonům. K ceftiofuru bylo mezi lety 2005 - 2010 testováno celkem 247 izolátů agarovou diluční metodou. Dále jsem sledovala citlivost 236 izolátů *E. coli* z let 2005 - 2010 k ciprofloxacinu, enrofloxacinu a nalidixové kyselině taktéž agarovou diluční metodou a poté u vybraných kmenů pomocí PCR plazmidově vázané geny rezistence k (fluor)chinolonům. Rozdíl v množství sledovaných izolátů k jednotlivým léčivým látkám je způsoben tím, že testování k ceftiofuru a k chinolonům neprobíhalo současně a při testování agarovou diluční metodou k CIP, NAL, ENRO některé izoláty během studie uhynuly a byly vyřazeny. Proto u výsledků existuje nesoulad v počtu izolátů testovaných na citlivost vůči jednotlivým ATB.

Cefalosporiny i (fluor)chinolony jsou látky běžně používané i v humánní medicíně, proto jsou bedlivě sledovány. Například ciprofloxacin je používán u závažných infekcí u lidí (Gosling et al., 2012). Při neuváženém používání těchto ATB u potravinových zvířat může docházet k vyselektování rezistentních bakterií a je možný přenos právě na člověka. Proto Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) stanovil minimální požadavky na sledování výskytu antimikrobiální rezistence u potravinových zvířat, aby tato data byla mezi státy EU porovnatelná a mohla být základem pro sledování vývoje rezistence v závislosti na spotřebě antimikrobiálních látek v jednotlivých zemích. Tato doporučení jsou na webových stránkách EFSA. Ve své zprávě EFSA dokumentuje výskyt ESBL a upozorňuje na to, že od roku 2000



se širokospektré betalaktamázy značně rozšířily. Poukazuje na to, že selekce rezistentních bakterií je vyvolána hlavně používáním antibiotik včetně 3. a 4. generace cefalosporinů a také (fluor)chinolonů, které mohou způsobit koselekcí rezistentních kmenů, produkujících širokospektré betalaktamázy. Zároveň doporučuje omezení až zastavení používání cefalosporinů 3. a 4. generace i dalších antimikrobiálních látek, aby se nezvyšoval selekční tlak a tím i výskyt genů rezistence (EFSA, 2011). Program ESVAC (European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption), koordinovaný agenturou EMA (European Medicines Agency), se snaží o jednotný sběr informací o používání antimikrobiálních látek v Evropě. V rámci EU je tak sledována spotřeba antimikrobiálních látek v jednotlivých členských státech včetně ČR. Tyto údaje o veterinárním užití antimikrobiálních látek poskytuje ÚSKVBL. Spotřeba veterinárních ATB (amfenikoly, aminoglykosidy, ansamyciny, cefalosporiny a jiné) se uvádí v kilogramech za rok [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document\\_listing/document\\_listing\\_000302.jsp&mid=WC0b01ac0580153a00&jsenabled=true](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document_listing/document_listing_000302.jsp&mid=WC0b01ac0580153a00&jsenabled=true) (23.3.2012).

**Tabulka č. 18: Spotřeby cefalosporinů a (fluor)chinolonů v letech 2005-2010**

Spotřeba cefalosporinů a (fluor)chinolonů v ČR v letech 2005-2010						
rok	2005	2006	2007	2008	2009	2010
ATB	[kg]	[kg]	[kg]	[kg]	[kg]	[kg]
cefalosporiny	337,76	291,39	420,33	546,94	473,64	599,92
(fluor)chinolony	1273,19	1124,49	1072,22	1406,57	1263,23	1157,70

(Hera a kol., 2011)

Tabulka č. 18 uvádí spotřebu cefalosporinů a (fluor)chinolonů u zvířat v ČR v letech 2005 - 2010. Největší spotřeba cefalosporinů byla v roce 2010, u (fluor)chinolonů se jednalo o rok 2008. Zatímco spotřeba (fluor)chinolonů od roku 2008 postupně klesá, spotřeba cefalosporinů má v posledních dvou sledovaných letech stoupající charakter. Tato stoupající spotřeba je spojená se zvýšeným rizikem selekce rezistentních kmenů bakterií a je proto nutný monitoring výskytu rezistence na tato antibiotika. Je vhodné zamyslet se nad tím, zda je opravdu nutné takové množství použitých cefalosporinů v roce 2010, když před čtyřmi lety, v roce 2006, vystačila ČR s polovičním množstvím těchto antibiotik. Navíc se počty chovaných hospodářských zvířat (prasata, skot) v průběhu sledovaného období trvale snižovaly. Jednotlivá spotřebovaná množství ATB jsem porovnávala s mými hodnotami,

získanými agarovou diluční metodou k testovaným ATB, přesněji s procentuálním zastoupením izolátů se sníženou citlivostí k ceftiofuru ( $MIC \geq 2 \text{ mg/l}$ ) a enrofloxacinu ( $MIC \geq 2 \text{ mg/l}$ ) v jednotlivých letech. Ciprofloxacin se u prasat nepoužívá a nalidixová kyselina je obsolentní, je však důležitým epidemiologickým markerem pro sledování vývoje rezistence bakterií k fluorovaným chinolonům. Proto má pouze enrofloxacin výpovědní hodnotu vzhledem ke spotřebám ATB v ČR. Původní domněnka, že by výskyt rezistence mohl být v důsledku zvýšené spotřeby ATB v jednotlivých letech v ČR, se nepotvrdila. Může to být způsobeno více faktory. Spotřeby ATB nejsou uváděny u konkrétních léčivých látek, ale u skupin ATB, dále nejsou spotřeby rozlišeny na konkrétní druhy zvířat. Nelze pak zjistit, kolik kg bylo spotřebováno pro prasata a kolik pro jiné druhy zvířat. Dále je zahrnuto i lokální a topické užití ATB, tento faktor však u cefalosporinů a (fluor)chinolonů lze zanedbat (Šimůnek a Smola, 2007; Hera a kol., 2011). Navíc z roční spotřeby ATB nelze vypočítat momentální užití daných antimikrobiálních látek v jednotlivých chovech, které mohlo mít vliv na selekci rezistentních kmenů *E. coli*.

Rezistence *E. coli* k ceftiofuru se vyskytovala pouze na dvou farmách v letech 2006, 2008 a 2010. Na základě interview s terénním veterinářem bylo zjištěno, že ceftiofur byl zde použit k léčbě a prevenci klostridiových enteritid selat, čímž lze vysvětlit výskyt rezistence.

Přestože chinolony byly v terapii prasat registrovány dříve než ve sledovaném období 2005 – 2010, byl výskyt rezistence u enrofloxacinu relativně nízký (3 %). To lze vysvětlit pouze spotřebou tohoto chemoterapeutika u prasat. Bohužel, údaje o takové spotřebě u prasat chybí.

V roce 2008 byla uveřejněna studie z provincie Guangdong v Číně, která sledovala výskyt *qnr* genů u *E. coli* z drůbeže a prasat, přičemž nejvíce byl zastoupen gen *qnrS* z testovaných – *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*. Všechny izoláty, u kterých se vyskytovala rezistence díky *qnr* genům, měly  $MIC_{CIP}$  větší než 0,25 mg/l (Yue et al., 2008). Touto hodnotou jsem se také řídila při výběru izolátů pro PCR testování v mé práci po provedení agarové diluční metody na CIP, NAL, ENRO. Bylo vybráno 27 izolátů, majících  $MIC_{CIP} \geq 0,25 \text{ mg/l}$ , které byly podrobeny testování na geny PMQR a potvrdil se výskyt *qnrS* a *oqxAB* genů. Zatímco jinde byl již výskyt *qnrS* genu u prasat běžný, v Evropě byl poprvé zaznamenán až v roce 2011 (Szmolka et al., 2011). Má práce dokazuje, že tento výskyt nebyl ojedinělý a pravděpodobně bude hlášen výskyt *qnrS* i v dalších zemích Evropy. *QnrS* byl již hlášen u jiných zvířat (Han et al., 2012) a dokonce i u lidí (Cavaco et al., 2008). Ve Velké Británii byla dokonce zaznamenána přítomnost *qnrS* genu v kombinaci s dalšími determinanty rezistence (*bla<sub>CTX</sub>*-

*m*, *bla*<sub>TEM</sub> a další) u skotu (Kirchner et al., 2011). V porovnání s Čínou je však obecně výskyt genů PMQR v Evropě nízký (Yang et al., 2008), což ovšem neznamená, že by se neměla této problematice věnovat přílišná pozornost. Cílem by mělo být udržet tento příznivý stav co nejdéle všemi dostupnými prostředky a dále monitorovat stav rezistence a reagovat na případné změny.

Jelikož byl olachindox používán jako růstový stimulátor, vyvinula se rezistence zprostředkovaná effluxní pumpou OqxAB kódovanou na plazmidu pOLA52 genem *OqxAB* (Hansen et al., 2005). Jako růstový stimulátor je v EU zakázán od roku 1999 (Laine et al., 2004), geny rezistence k této látce se však vyskytují i nadále, jak dokazují naše výsledky testování přítomnosti genů *oqxAB* u 27 izolátů *E. coli* porcinního původu z let 2005 – 2010.

U ostatních izolátů, které byly vybrány pro testování metou PCR za účelem zjištění přítomnosti genů *qnr*, *aac(6')Ib-cr*, *qepA*, následně také *oqxAB*, lze jen spekulovat, jaká determinanta rezistence mohla způsobit jejich odolnost vůči sledovaným (fluor)chinolonům. Pravděpodobně se mohlo jednat o chromozomálně vázanou rezistenci, jejíž determinanty testovány nebyly, popřípadě o jiné dosud nezjištěné geny PMQR.

Ceftiofur byl v této práci sledován spolu s (fluor)chinolony také proto, že je ve světě zachycen výskyt PMQR zároveň s ESBL u čeledi Enterobacteriaceae rezistentní k tomuto cefalosporinu (Ma et al., 2009). Výskyt plasmidově vázané rezistence k chinolonům u bakterií za současné produkce ESBL představuje velké nebezpečí (Kanamori et al., 2011).

U izolátů *E. coli* porcinního původu z let 2005 - 2010 byla potvrzena produkce CTX-M1 na jedné farmě. Ceftiofur byl u pozitivních vzorků použit k léčbě meningitidy (Kohoutová a kol., 2010). To, že produkce betalaktamázy CTX-M1 byla prokázána na jedné určité farmě, vede ke zjištění, že je nutno sledovat spotřeby ceftiofuru a jiných cefalosporinů 3. a 4. generace na území ČR nejen plošně, ale i konkrétně v jednotlivých chovech. Žádný z 8 izolátů *E. coli* z roku 2008, u kterých se vyskytoval gen *bla*<sub>CTX-M1</sub>, dle výsledků agarové diluční metody nevykazoval výraznější rezistenci k (fluor)chinolonům, na geny PMQR tedy nebyly tyto izoláty testovány. Ve své studii Chander et al. (2011) uvádí, že i izoláty *E. coli*, citlivé k ceftiofuru, mohou nést geny rezistence k cefalosporinům. Bylo by zajímavé zjistit, že to platí i u genů PMQR, a u 8 izolátů *E. coli* porcinního původů provést PCR na plasmidově vázané geny rezistence k chinolonům, ačkoli jejich MIC k ciprofloxacinu nepřesahovalo 0,25 mg/l. V tabulce č. 13 mělo několik izolátů MIC ceftiofuru  $\geq 64$  mg/l, avšak testované geny, kódující širokospektré betalaktamázy, u nich prokázány nebyly. U těchto izolátů mohla být

rezistence k ceftiofuru způsobena tvorbou jiných typů betalaktamáz. Často se vyskytuje například rezistence k ceftiofuru způsobená AmpC betalaktamázami.

Ve většině vyspělých zemí se provádí všemožná opatření, jak zabránit šíření rezistentních kmenů bakterií. Použití ATB je nebezpečné z hlediska selektování takových izolátů, schopných účinně se bránit jejich mechanismům působení. Základním krokem je tedy zjišťování spotřeby ATB, monitoring výskytu rezistentních kmenů a dodržování zásad antibiotické politiky. Velký důraz se pak klade na to, aby se nezvyšovala rezistence u těch ATB, která se používají zároveň ve veterinární i humánní medicíně. Problémem jsou však rozvojové země, kde chybí dohled nad správným užíváním ATB a antibiotická politika je neznámým pojmem. Určitě by napomohlo, kdyby i tyto země měly možnost regulovat použití ATB a byly schopné reagovat na zvýšený výskyt rezistence na svém území.

## 7. Závěr

V diplomové práci jsem se zabývala citlivostí izolátů *E. coli* porcinního původu z let 2005 - 2010 k ceftiofuru a k chinolonům – ciprofloxacinu, enrofloxacinu, nalidixové kyselině a olachindoxu. Mezi izoláty se našly jak citlivé, tak i vysoce rezistentní kmeny *E. coli* vůči jednotlivým testovaným antimikrobně působícím látkám. U vybraných izolátů *E. coli* byla sledována přítomnost genů rezistence - *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')Ib*, *qepA*, *oqxAB*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*. Byla potvrzena přítomnost genu *qnrS* u jednoho izolátu z roku 2008, dále gen *oqxAB* u jednoho izolátu z roku 2010. Gen *bla<sub>CTX-M1</sub>* byl prokázán u 8 izolátů z roku 2008. Následným šetřením byl zjištěn původ z jedné farmy, kde byla zaznamenána vysoká spotřeba cefalosporinů 3. a 4. generace. Tato DP dokazuje, že prasata chovaná v ČR mohou být zdrojem *E. coli* rezistentní k ceftiofuru a chinolonům. Z výsledků vyplývá nutnost monitoringu výskytu epidemiologicky významných typů rezistence u izolátů *E. coli* z potravinových zvířat a taková aktivní surveillance může přispět k ochraně zdraví člověka.

## 8. Literatura

AOUF, A., MESSAI, Y., SALAMA, M. S., ABOUSHADY, H. M., EL-ANANY, M. G., ALOUACHE, S., BAKOUR, R. Resistance to  $\beta$ -lactams of human and veterinary *Salmonella* isolates in Egypt and Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, vol. 5, no. 7, p. 802-808.

BRADFORD, P. A. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, vol. 14, no. 4, p. 933-951.

BYSTROŇOVÁ, J. *Rezistence izolátů Escherichia coli porcinního původu k antibakteriálním látkám: diplomová práce*. Brno : Veterinární a farmaceutická univerzita, Farmaceutická fakulta, 2009, 71s., Vedoucí diplomové práce Pavel Suchý.

CAVACO, L. M., FRIMODT-MØLLER, N., HASMAN, H., GUARDABASSI, L., NIELSEN, L., AARESTRUP, F. M. Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and swine in Denmark. *Microbial Drug Resistance*, 1 June 2008, vol. 14, no. 2, p. 163-169.

CAVACO, L. M., HASMAN, H., XIA, S. & AARESTRUP, F.M. *QnrD*, a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, vol. 53, p. 603-608.

COQUE, T. M., BAQUERO, F., CANTON, R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Eurosurveillance*, 2008, vol. 13, no. 47, article 4.

ČECHOVÁ, M., MIKULE, V., TVRDOŇ, Z. *Chov prasat*. 1.vyd. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003, s. 90, ISBN : 80-7157-720-0

DOLEJSKÁ, M., ČÍŽEK, A., LITERÁK, I. High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from Black-headed Gulls in the Czech Republic. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, vol. 103, no. 1, p. 11-19.

DRAWZ, S. M. AND BONOMO, R. A. Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, vol. 23, no. 1, p. 160-201.

EFSA Panel on Biological Hazards. Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal* 2011;9(8):2322. [95 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2011.2322. Available online: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2322.htm#> (23.3.2012)

EWERS, CH., GROBBEL, M., BETHE, A., WIELER, L. H., GUENTHER, S. Extended-spectrum beta-lactamases producing Gram-negative bacteria in companion animals: action is clearly

- warranted! *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 124, 2011, Heft ¾, Seiten 94-101.
- FRASSON, I., CAVALLARO, A., BERGO, C., RICHTER, S.N. & PALÙ, G. Prevalence of *aac(6')*-*Ib-cr* plasmid-mediated and chromosome-encoded fluoroquinolone resistance in *Enterobacteriaceae* in Italy. *Gut pathogens*, 2011, vol. 3, no. 12, p. 1-5.
- GALAS, M., DECOUSSER, J-W., BRETON, N., GODARD, T., ALLOUCH, P. Y., PINA, P. Nationwide Study of the Prevalence, Characteristics, and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in France. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, vol. 52, no. 2, p.786-789.
- GOSLING, R. J., CLOUTING, C. S., RANDALL, L. P., HORTON, R. A., DAVIES, R. H. Ciprofloxacin resistance in *E. coli* isolated from turkeys in Great Britain. *Avian Pathology*, 2012, vol. 41, no. 1, p. 83-89.
- GUARDABASSI, L., JENSEN, L. B., KRUSE, H. *Guide to Antimicrobial Use in Animals*. Oxford : Blackwell Publishing, 2008, 222 p. ISBN : 978-1-4051-5079-8
- GUENTHER, S., GROBBEL, M. ET AL. First insights into antimicrobial resistance among faecal *Escherichia coli* isolates from small wild mammals in rural areas. *Science of The Total Environment*, 2010, vol. 408, no. 17, p. 3519-3522.
- HAN, J. E., KIM, J. H., CHERESCA, C. H., SHIN, S. P., JUN, J. W., CHAI, J. Y., HAN, S. Y., PARK, S. C. First description of the *qnrS*-like (*qnrS5*) gene and analysis of quinolone resistance-determining regions in motile *Aeromonas spp.* from diseased fish and water. *Research in Microbiology*, 2012, vol. 163, no. 1, p. 73-79.
- HANSEN, L. H., SØRENSEN, S. J., JØRGENSEN, H. S., JENSEN, L. B. The prevalence of the OqxAB multidrug efflux pump amongst olaquinox-resistant *Escherichia coli* in pigs. *Microb. Drug Resist.*, 2005, vol. 11, no. 4, p. 378–382.
- HERA A., KOUTECKÁ L., DORN D., POKLUDOVÁ L. *Spotřeba antibiotik a antiparazitik ve veterinární medicíně v ČR v letech 2003 – 2010* [online]. c2011, datum poslední revize 14. listopadu 2011 [cit. 22. března 2012]. Dostupný na: [http://www.uskvbl.cz/ attachments/433\\_ATB%20spotreba-vestnik-2009-finaloprav..doc](http://www.uskvbl.cz/attachments/433_ATB%20spotreba-vestnik-2009-finaloprav..doc)
- HERNÁNDEZ, A., SÁNCHEZ, M. B. & MARTÍNEZ, J. L. Quinolone Resistance: Much More than Predicted. *Frontiers in microbiology*, 2011, vol. 2, no. 22, p. 1-6.
- CHANDER, Y., OLIVEIRA, S., GOYAL, S. M. Characterisation of ceftiofur resistance in swine bacterial pathogens. *The Veterinary Journal*, 2011, vol. 187, no. 1, p. 139-141.
- CHEN, J., SU, Z. ET AL. Identification and characterization of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Zhenjiang, China. *International Journal of Infectious Diseases*, 2009, vol. 13, no. 6, p. 717-721.

JACOBY, G. A. Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 2005, vol. 41, no. 2, p. 120-S126.

JACOBY, G. A., WALSH, K. E., MILLS, D. M., WALKER, V. J., OH, H., ROBICSEK, A., ET AL. *QnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2006, vol. 50, no. 4, p. 1178–1182.

KANAMORI, H., NAVARRO, R. B., YANO, H., SOMBRERO, L. T., CAPEPING, M. R. Z., LUPISAN, S. P., OLVEDA, R. M., ARAI, K., KUNISHIMA, H., HIRAKATA, Y., KAKU, M. Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from the Philippines. *Acta Tropica*, 2011, vol. 120, no. 1-2, p. 140-145.

KANG, H. Y., TAMANG, M. D., ET AL. Dissemination of Plasmid-mediated *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* Genes Among 16S rRNA Methylase Producing *Enterobacteriaceae* in Korea. *J Bacteriol Virol*, 2009, vol. 39, no. 3, p. 173-182.

KEHRENBERG, C., FRIEDERICHS, S., DE JONG, A., MICHAEL, G. B. & SCHWARZ, S. Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2006, vol. 58, no. 1, p. 18-22.

KIM, H. B., WANG, M., PARK, C. H., KIM, E. C., JACOBY, G. A., HOOPER, D. C. *OqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2009, vol. 53, p. 3582-3584.

KIRCHNER, M., WEARING, H. ET AL. Plasmid-mediated quinolone resistance gene detected in *Escherichia coli* from cattle. *Veterinary Microbiology*, 2011, vol. 148, no. 2-4, p. 434-435.

KOHOUTOVÁ L., DOLEJSKÁ M., SMOLA J., ČÍŽEK A. Rezistence k ceftiofuru a produkce širokospektré betalaktamázy CTX-M1 u izolátů *Escherichia coli* z prasat. In : Program a abstrakty, 25. Kongres Československé společnosti mikrobiologické s mezinárodní účastí „Mikroorganismy a kvalita života“. Stará Lesná, Vysoké Tatry: Československá společnost mikrobiologická, Bratislava – Praha, 2010.

LAINE, T., YLIAHO, M., MYLLYS, V., POHJANVIRTA, T., FOSSI, M., ANTILA, M. The effect of antimicrobial growth promoter withdrawal on the health of weaned pigs in Finland. *Preventive Veterinary Medicine*, 2004, vol. 66, no. 1–4, p. 163-174.

LAZDUNSKI, C. J. Pore-forming colicins: synthesis, extracellular release, mode of action, immunity. *Biochimie* 1988, vol. 70, no. 9, p. 1291-1296.

LINCOVÁ, D., FARGHALI, H. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. doplněné a přeprac. vyd. Praha : Galén, 2007, s. 473-503, ISBN : 978-80-7262-373-0

LIVERMORE, D. M. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 1995, vol. 8, no. 4, p. 557-584.

MA, J. ET AL, High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from



companion and food-producing animals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2009, vol. 53, p. 519–524.

MOODLEY, A., GUARDABASSI, L. Transmission of IncN Plasmids Carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> between Commensal *Escherichia coli* in Pigs and Farm Workers." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009, vol. 53, no. 4, p. 1709-1711.

MOON, D. C., SEOL, S. Y. ET AL. Emergence of a new mutation and its accumulation in the topoisomerase IV gene confers high levels of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates." *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2010, vol. 35, no. 1, p. 76-79.

ORAM, M., KURODA, R. ET AL. *Escherichia coli* DNA gyrase: Genetic analysis of *gyr A* and *gyr B* mutations responsible for thermosensitive enzyme activity. *FEBS Letters*, 1992, vol. 312, no. 1, p. 61-65.

POIREL, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. M., MAMMERI, H., LIARD, A., NORDMANN, P. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *QnrA*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, vol. 49, p. 3523–3525.

RAMPHAL, R., AMBROSE, P. G. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases and Clinical Outcomes: Current Data. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, vol. 42, no. 4, p. 164-S172.

SCHWARZ, S. T., CLOECKAERT, A., ROBERTS, M. C. Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. Washington D.C. : ASM Press, 2006, Chapter 6, p. 73-98

SPÍŽEK, J. Rezistence na antibiotika. *Vesmír*, 1/ 1999, roč.78, s. 27-32

SZMOLKA, A., FORTINI, D., VILLA, L., CARATTOLI, A., ANJUM, M. F., NAGY, B. First report on IncN plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrS1* in porcine *Escherichia coli* in Europe." *Microb. Drug Resist.*, 2011, vol. 17, no. 4, p. 567–573.

ŠIMŮNEK, J., SMOLA, J. *Antimikrobiální léčiva ve veterinární medicíně*. 1.vyd. Hradec Králové: Prion, 2007, s. 20-187, ISBN : 80-903188-8-6.

ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J. *Metody molekulární biologie*. Brno : Vydavatelství MU, 2005, s. 73-75, ISBN : 80-210-3841-1.

TAN, J., PITOUT, J. D. D., GUTTMAN, D. S. New and Sensitive Assay for determining *Pseudomonas aeruginosa* Metallo-Beta-Lactamase Resistance to imipenem . *J. Clin. Microbiol.*, 2008, vol. 46, no. 5, p. 1870–1872.

VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2.přeprac. vyd. Brno : Neptun, 2005, s. 76-251, ISBN : 80-86850-00-5

VOTAVA, M. A KOL. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1.vydání Brno : Neptun, 2003, s. 64-66, ISBN : 80-902896-6-5

WANG, M., ET AL. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, vol. 53, p. 1892-1897.

YAMANE, K., WACHINO, J. I., SUZUKI, S., KIMURA, K., SHIBATA, N., KATO, H., SHIBAYAMA, K., KONDA, T., ARAKAWA, Y. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, vol. 51, p. 3354–3360.

YANG, H., CHEN, H., YANG, Q., CHEN, M., WANG, H. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from nine teaching hospitals in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, vol. 52, no. 12, p. 4268–4273.

YUE, L., JIANG, H.-X. ET AL. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 2008, vol. 132, no. 3–4, p. 414–420.

ZHAO, J., CHEN, Z., CHEN, S., DENG, Y., LIU, Y., TIAN, W., HUANG, X., WU, C., SUN, Y., ZENG, Z., LIU, J. H. Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, vol. 54, p. 4219–4224.

<http://www.bezpecna-krmiva.cz/index.php?id=32> (28.2.2011)

[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document\\_listing/document\\_listing\\_000302.jsp&mid=WC0b01ac0580153a00&jsenabled=true](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document_listing/document_listing_000302.jsp&mid=WC0b01ac0580153a00&jsenabled=true) (23.3.2012)

<http://www.lahey.org/studies/temtable.asp> (3.3.12)

[http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0115&org=124&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0115&org=124&c=UK&lang=EN) (1.3.2012)

[http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0331&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0331&c=UK&lang=EN) (1.3.2012)

[http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0337&cat=&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0337&cat=&c=UK&lang=EN) (1.3.2012)

[http://www.vetweb.cz/Antibioticka-politika-ve-veterinarni-medicine\\_\\_s1497x49636.html](http://www.vetweb.cz/Antibioticka-politika-ve-veterinarni-medicine__s1497x49636.html) (28.2.2012)

## 9. Použité zkratky

<b>ATB</b>	<b>antibiotikum</b>
<b>ATCC</b>	<b>American Type Culture Collection</b>
<b>bp</b>	<b>pár bází</b>
<b>CEF</b>	<b>ceftiofur</b>
<b>cAMP</b>	<b>cyklický adenosin monofosfát</b>
<b>cGMP</b>	<b>cyklický guanosin monofosfát</b>
<b>CIP</b>	<b>ciprofloxacin</b>
<b>č. izolátu</b>	<b>číslo izolátu</b>
<b>ČR</b>	<b>Česká republika</b>
<b>DAEC</b>	<b>difúzně adherentní <i>Escherichia coli</i></b>
<b>DMSO</b>	<b>dimethylsulfoxid</b>
<b>DNA</b>	<b>deoxyribonukleová kyselina</b>
<b>dNTP</b>	<b>deoxyribonukletid trifosfát</b>
<b>DP</b>	<b>diplomová práce</b>
<b>dsDNA</b>	<b>dvouřetězcová DNA</b>
<b>EaggEC</b>	<b>enteroagregativní <i>Escherichia coli</i></b>
<b><i>E.coli</i></b>	<b><i>Escherichia coli</i></b>
<b>EDTA</b>	<b>kyselina ethylendiaminotetraoctová</b>
<b>EFSA</b>	<b>Evropský úřad pro bezpečnost potravin</b>
<b>EIEC</b>	<b>enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i></b>
<b>EMA</b>	<b>European Medicines Agency</b>
<b>ENRO</b>	<b>enrofloxacin</b>
<b>EPEC</b>	<b>enteropatogenní <i>Escherichia coli</i></b>
<b>ESBL</b>	<b>širokospektrá betalaktamáza</b>
<b>ESVAC</b>	<b>European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption</b>

<b>ETEC</b>	<b>enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i></b>
<b>EU</b>	<b>Evropská unie</b>
<b>F<sup>+</sup></b>	<b>donor plazmidu</b>
<b>F<sup>-</sup></b>	<b>recipient plazmidu</b>
<b>FAO</b>	<b>Organizace pro výživu a zemědělství</b>
<b>GIT</b>	<b>gastrointestinální trakt</b>
<b>G<sup>+</sup> - koky</b>	<b>grampozitivní koky</b>
<b>G<sup>-</sup></b>	<b>gramnegativní</b>
<b>i.m.</b>	<b>intramuskulární</b>
<b>MBL</b>	<b>metalo-beta-laktamázy</b>
<b>MCA</b>	<b>Mc Conkey agar</b>
<b>MHA</b>	<b>Mueller-Hinton agar</b>
<b>MIC</b>	<b>minimální inhibiční koncentrace</b>
<b>MPA</b>	<b>masopeptonový agar</b>
<b>NAL</b>	<b>kyselina nalidixová</b>
<b>OIE</b>	<b>Světová organizace pro zdraví zvířat</b>
<b>OQX</b>	<b>olachindox</b>
<b>PCR</b>	<b>polymerázová řetězová reakce</b>
<b>p.e.</b>	<b>parenterální</b>
<b>PFGE</b>	<b>pulzní gelová elektroforéza</b>
<b>PGE</b>	<b>gelová elektroforéza</b>
<b>PMQR</b>	<b>plazmidově vázané geny rezistence k chinolonům</b>
<b>p.o.</b>	<b>perorální</b>
<b>STEC</b>	<b>shiga-like toxigenní <i>Escherichia coli</i></b>
<b>SVS</b>	<b>Státní veterinární správa</b>
<b>Ta</b>	<b>annealingová teplota</b>

<b>UPEC</b>	<b>uropatogenní <i>Escherichia coli</i></b>
<b>ÚSKVBL</b>	<b>Ústav pro státní kontrolu biopreparátů a léčiv</b>
<b>UV</b>	<b>ultrafialové</b>
<b>WHO</b>	<b>Světová zdravotnická organizace</b>

## 10. Přílohy

Příloha č. 1: Výsledky agarové diluční metody u ceftiofuru u *E.coli* z let 2005-2006

2005			2006		
č.izolátu	1.MIC	2.MIC	č.izolátu	1.MIC	2.MIC
44445	1	0,5	53330	0,5	0,25
45118	0,5	0,5	53621	0,5	0,25
46198	0,03	0,03	53622	0,5	0,25
46200	0,03	0,015	53893	0,5	0,25
46949	0,5	0,25	53899	0,5	0,5
47009	0,25	0,25	53991	0,125	0,125
47161	0,25	0,25	54047	0,25	0,5
47163	0,25	0,25	54166	0,5	0,25
47168	0,06	0,25	54167	0,5	0,25
47170	0,25	0,25	54356	0,5	0,125
47842	0,25	0,25	54359	0,5	0,25
47930	0,25	0,25	54490	0,25	0,25
77939	0,25	0,5	54553	0,5	4
48355	0,25	0,5	54554	0,125	0,125
48432	0,5	1	54557	1	1
48354	0,25	0,25	54570	0,25	0,25
48758	0,25	0,25	54571	0,25	0,25
48933	0,25	0,25	54760	0,25	0,5
48936	0,5	0,5	54766	0,25	0,25
48977	0,5	0,5	54781	0,25	0,25
49119	0,125	0,25	54800	0,5	0,25
49120	0,25	0,25	54802	0,25	0,25
49122	1	1	54606	0,5	0,5
42999	0,25	0,25	54611	0,5	0,5
43000	0,125	0,25	54804	0,25	0,125
43004	0,25	0,5	54847	0,25	0,5
43103	0,5	0,5	54852	0,5	0,5
43195	0,5	0,5	55264	0,25	0,25
43206	0,25	0,25	55265	0,25	0,25

**Příloha č. 1: Výsledky agarové diluční metody u ceftiofuru u *E.coli* z let 2005-2006  
(pokračování)**

2005			2006		
č.izolátu	1.MIC	2.MIC	č.izolátu	1.MIC	2.MIC
43207	0,5	0,5	55462 a	1	1
43209	0,5	0,5	55462 b	2	1
43481	0,25	0,25	55465	0,5	0,5
43497	0,5	1	55498	0,25	0,125
43521	0,25	0,25	55500	≤ 0,125	0,5
43939	0,5	0,5	55509	≤ 0,125	0,5
			55653	0,125	0,5
			55744	≤ 0,125	0,5
			55675	32	32
			55749	0,25	0,5
			55677	16	32
			55789	0,25	0,5
			55172	16	16
			55187	0,5	0,25

**Příloha č. 2: Výsledky agarové diluční metody u ceftiofuru u *E. coli* z let 2007-2008**

2007			2008		
č.izolátu	1.MIC	2.MIC	č.izolátu	1.MIC	2.MIC
55804	0,5	0,5	61555	16	8
55838	0,125	0,5	61557	0,5	0,5
55841	0,125	0,25	61652	0,5	0,5
56052	0,5	0,5	61681	0,5	0,5
56055	0,5	0,5	61682	0,5	0,5
56062	0,125	0,5	61688	0,5	0,5
56095	0,25	0,5	61843	0,5	0,25
56097	0,5	0,25	61882	0,5	0,25
56165	0,5	0,25	62013	0,5	0,5
56166	2	1	62014	0,25	0,5
56234	0,5	0,25	62318	0,25	0,5
56235	0,25	0,5	62337	0,25	0,5
56246	0,125	0,5	62375	0,25	0,25
56353	0,5	0,5	62445	0,5	0,5
56354	0,5	0,5	62471	0,5	0,25
56361	1	0,5	62480	0,125	0,125
56453	1	0,5	62501	0,5	0,25
56454	0,5	0,5	62513	0,25	0,25
56467	0,5	0,5	62623	0,25	0,5
56473	0,125	0,25	63590	2	2
56475	0,5	0,25	63615	2	4
56636	0,5	0,5	63951	4	2
56690	0,5	0,5	64049	0,25	1
56803	0,25	0,125	64550	0,25	0,25
56824	0,25	0,5	64795	0,25	0,25
57072	0,25	0,5	65327	0,25	0,25
57065	0,25	0,5	65398	0,5	0,125
57073	0,125	0,063	65377	0,25	0,25
57803	0,5	0,25	65410	0,25	0,25
57804	0,25	0,5	65416	0,25	0,5
57925	0,5	0,5	65463	0,5	0,5
57122	1	0,5	65483	0,5	0,5
58370	0,125	0,063	65495	0,25	0,5
58461	0,5	0,25	65650	0,25	0,5
58842	0,5	0,5	65796	1	2



**Příloha č. 2: Výsledky agarové diluční metody u ceftiofuru u *E. coli* z let 2007 – 2008 (pokračování)**

2007			2008		
č.izolátu	1.MIC	2.MIC	č.izolátu	1.MIC	2.MIC
59253	0,25	0,5	61650	1	1
59491	0,25	0,25	63297	≤ 0,125	0,25
59768	0,25	0,5	63954	1	0,125
60259	1	0,5	64551	> 64	64
60482	0,5	0,5	65800	2	1
60947	0,5	0,5	66162	1	1
61043	0,25	0,25	65040	1	0,5
61056	0,25	0,25	66004	2	2
61136	0,25	0,5	66005	2	2
61137	0,5	0,5			
61168	0,25	0,25			
59526	≤ 0,125	≤ 0,125			
59569	0,5	0,5			
58824	≤ 0,125	≤ 0,125			
58831	0,25	0,5			

**Příloha č. 3: Výsledky agarové diluční metody k ceftiofuru u 30 izolatů z roku 2008**

číslo izolátu	průměrná MIC [mg/l]	číslo izolátu	průměrná MIC [mg/l]
63454	≤ 2	63469	≥ 64
63455	≤ 2	63470	≥ 64
63456	≤ 2	63471	≥ 64
63457	64	63472	≥ 64
63458	64	63474	≥ 64
63459	≤ 2	63475	32
63460	≤ 2	63476	≥ 64
63461	≤ 2	63477	≤ 2
63462	64	63478	≥ 64
63463	64	63479	≥ 64
63464	≥ 64	63480	≥ 64
63465	≥ 64	63482	≤ 2
63466	≥ 64	66606	≥ 64
63467	≥ 64	66608	≥ 64
63468	≥ 64	66609	≥ 64

**Příloha č. 4: Výsledky agarové diluční metody u ceftiofuru u *E. coli* z let 2009 – 2010**

2009			2010		
č.izolátu	1.MIC	2.MIC	č.izolátu	1.MIC	2.MIC
68904	0,5	0,5	71107	16	16
69014	0,25	0,25	71106	16	16
69015	0,25	0,25	112A	16	16
69222	0,5	0,5	71105	16	16
69228	0,5	0,5	70794	0,25	0,125
69339	0,5	0,5	70792	0,25	0,125
69517	0,5	0,5	70804	0,25	0,25
69533	0,5	0,25	71040	1	1
69535	0,5	0,5	71244	0,5	0,25
69611	0,5	0,5	71558	0,5	0,25
69616	0,5	0,5	71646	0,25	0,25
69630	0,5	0,25	72070	2	1
69699?	0,5	0,125	73624	1	1
69730?	0,5	0,25	73566	2	1
70206	1	1	73569	1	1
70213	0,5	0,5	73570	1	1
70303	0,5	0,5	73573	1	0,25
70475	0,5	0,5	73575	0,5	0,125
70561	0,25	0,125	73578	0,25	0,25
			73859	1	1
			74050	1	2
			74305	0,25	0,125
			74341	1	1
			74464	0,25	0,125
			74520	1	1
			74523	0,25	0,125

**Příloha č. 5: Výsledky agarové diluční metody u CIP, NAL, ENRO – rok 2005**

č. izolátu	2005					
	ciprofloxacin		nalidixová kyselina		enrofloxacin	
	1.MIC	2.MIC	1.MIC	2.MIC	1.MIC	2.MIC
44445	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
45118	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
46198	≤ 0,125	≤ 0,125	32	128	≤ 0,125	≤ 0,125
46200	≤ 0,125	≤ 0,125	32	128	≤ 0,125	≤ 0,125
46949	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
47009	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
47161	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
47163	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	16	≤ 0,125	≤ 0,125
47168	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
47170	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
47842	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
47930	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
77939	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
48355	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
48432	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
48354	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
48758	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
48933	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
48936	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
48977	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
49119	0,125	0,25	256	128	0,125	1
49120	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
49122	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
42999	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
43000	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
43004	≤ 0,125	≤ 0,125	128	64	≤ 0,125	0,25
43206	0,25	0,25	256	256	0,125	1
43207	0,25	0,25	> 256	> 256	0,25	1
43209	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
43481	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
43497	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	8	≤ 0,125	≤ 0,125
43521	≤ 0,125	0,25	≤ 4	8	≤ 0,125	≤ 0,125
43939	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	8	≤ 0,125	≤ 0,125
43008	0,125	≤ 0,125	256	128	0,125	≤ 0,125
43007	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
43177	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	4	≤ 0,125	≤ 0,125
43180	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	8	≤ 0,125	≤ 0,125
43418	≤ 0,125	≤ 0,125	4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
43476	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125

**Příloha č. 6: Výsledky agarové diluční metody u CIP, NAL, ENRO – rok 2006**

číslo izolátu	2006					
	ciprofloxacin		nalidixová kyselina		enrofloxacin	
	1.MIC	2.MIC	1.MIC	2.MIC	1.MIC	2.MIC
53621	≤ 0,125	≤ 0,125	32	32	≤ 0,125	≤ 0,125
53622	≤ 0,125	≤ 0,125	32	32	≤ 0,125	≤ 0,125
53893	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
53899	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
53991	≤ 0,125	≤ 0,125	64	128	≤ 0,125	0,25
54047	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
54166	≤ 0,125	≤ 0,125	64	64	≤ 0,125	≤ 0,125
54167	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
54356	16	16	256	256	32	32
54359	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
54490	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
54553	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
54554	≤ 0,125	≤ 0,125	64	64	≤ 0,125	0,250
54557	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
54570	≤ 0,125	≤ 0,125	32	32	≤ 0,125	≤ 0,125
54571	≤ 0,125	≤ 0,125	64	32	≤ 0,125	≤ 0,125
54760	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
54766	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
54781	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
54800	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
54802	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
54606	≤ 0,125	≤ 0,125	128	128	0,25	0,5
54611	0,25	0,125	256	128	0,25	0,25
54804	0,25	0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
54847	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
54852	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
55264	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
55265	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
55462a	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
55462b	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
55465	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
55498	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
55509	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
55653	0,25	≤ 0,125	256	256	0,5	0,25
55744	0,25	0,5	> 256	> 256	0,5	0,5
55675	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
55749	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
55677	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
55789	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
55172	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
55187	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125

**Příloha č. 7: Výsledky agarové diluční metody u CIP, NAL, ENRO-rok 2007**

2007						
číslo izolátu	ciprofloxacin		nalidixová kyselina		enrofloxacin	
	1.MIC	2.MIC	1.MIC	2.MIC	1.MIC	2.MIC
55804	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
56097	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
56165	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
56166	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
56234	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
56235	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
56246	32	8	> 256	> 256	16	8
56353	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
56354	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
56361	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
56475	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
56636	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
56690	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
56803	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
56824	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
57072	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
57065	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
57073	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
57803	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
57804	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
57122	8	8	> 256	> 256	16	8
58370	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
58461	0,5	1	> 256	> 256	1	1
58842	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
59253	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
59491	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
59768	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
60482	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
60947	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
61056	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
61136	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
61137	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
61168	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
59526	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
59569	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
58824	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
58831	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125

**Příloha č. 8: Výsledky agarové diluční metody u CIP, NAL, ENRO – rok 2008**

2008						
číslo izolátu	ciprofloxacin		nalidixová kyselina		enrofloxacin	
	1.MIC	2.MIC	1.MIC	2.MIC	1.MIC	2.MIC
61557	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
61652	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
61681	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	8	≤ 0,125	≤ 0,125
61682	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
61688	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	8	≤ 0,125	≤ 0,125
61843	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	8	≤ 0,125	≤ 0,125
61882	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
62013	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
62014	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
62318	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
62337	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
62375	0,25	0,25	256	128	≤ 0,125	0,25
62445	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
62471	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
62480	0,25	0,5	> 256	> 256	0,5	0,5
62501	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
62513	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
62623	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63590	0,25	0,5	8	16	0,5	0,5
63615	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	8	≤ 0,125	≤ 0,125
63951	4	4	> 256	> 256	4	4
64049	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
64550	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
64795	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
65327	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
65398	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
65410	≤ 0,125	≤ 0,125	64	64	≤ 0,125	≤ 0,125
65463	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
65483	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
65495	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
65796	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63454	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63455	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125

**Příloha č. 8: Výsledky agarové diluční metody u CIP, NAL, ENRO-rok 2008 (pokračování)**

2008						
číslo izolátu	ciprofloxacin		nalidixová kyselina		enrofloxacin	
	1.MIC	2.MIC	1.MIC	2.MIC	1.MIC	2.MIC
63456	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63457	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63458	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63459	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63460	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63461	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63462	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63463	16	16	> 256	> 256	32	64
63464	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63465	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63466	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63467	≤ 0,125	≤ 0,125	8	8	≤ 0,125	≤ 0,125
63468	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63469	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63470	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63471	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63472	≤ 0,125	≤ 0,125	8	8	≤ 0,125	≤ 0,125
63474	≤ 0,125	≤ 0,125	8	8	≤ 0,125	≤ 0,125
63475	≤ 0,125	≤ 0,125	8	8	≤ 0,125	≤ 0,125
63476	≤ 0,125	≤ 0,125	8	8	≤ 0,125	≤ 0,125
63477	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63478	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63479	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63480	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63482	≤ 0,125	≤ 0,125	8	8	≤ 0,125	≤ 0,125
66606	≤ 0,125	≤ 0,125	8	8	≤ 0,125	≤ 0,125
66608	0,5	0,5	> 256	256	0,5	0,5
66609	0,5	0,5	> 256	256	0,5	0,5
61650	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63297	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
63954	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
64551	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
65800	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
66162	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
65040	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
66004	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
66005	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125

**Příloha č. 9: Výsledky agarové diluční metody u CIP, NAL, ENRO-rok 2009**

2009						
číslo izolátu	ciprofloxacin		nalidixová kyselina		enrofloxacin	
	1.MIC	2.MIC	1.MIC	2.MIC	1.MIC	2.MIC
68904	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
69014	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
69015	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
69222	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
69228	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
69339	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
69517	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
69533	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
69535	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	4	≤ 0,125	≤ 0,125
69611	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
69616	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
69630	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
69699	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
69730	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
70206	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
70213	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
70303	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
70475	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	4	≤ 0,125	≤ 0,125
70561	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
67149	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
67819	≤ 0,125	≤ 0,125	64	32	≤ 0,125	≤ 0,125



**Příloha č. 10: Výsledky agarové diluční metody u CIP, NAL, ENRO-rok 2010**

číslo izolátu	2010					
	ciprofloxacin		nalidixová kyselina		enrofloxacin	
	1.MIC	2.MIC	1.MIC	2.MIC	1.MIC	2.MIC
71107	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
71106	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
112A	0,5	0,5	> 256	> 256	2	2
71105	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
70794	≤ 0,125	≤ 0,125	4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
70792	≤ 0,125	≤ 0,125	4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
70804	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
71040	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
71244	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
71558	4	4	> 256	> 256	16	8
71646	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
72070	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
73624	0,25	≤ 0,125	256	128	0,25	≤ 0,125
73566	0,25	0,125	> 256	256	0,25	0,25
73569	0,25	0,125	> 256	256	0,25	0,25
73570	≤ 0,125	0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
73573	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
73575	≤ 0,125	0,25	256	256	≤ 0,125	≤ 0,125
73578	0,25	≤ 0,125	4	≤ 4	≤ 0,125	0,25
73859	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
74050	≤ 0,125	≤ 0,125	4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
74305	≤ 0,125	≤ 0,125	4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
74341	≤ 0,125	≤ 0,125	8	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
74464	0,25	0,25	256	128	0,5	0,25
74520	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125
74523	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 4	≤ 4	≤ 0,125	≤ 0,125

**Příloha č. 11: Výsledek agarové diluční metody u olachindoxu u izolátů *E. coli* s MIC<sub>CFP</sub> ≥ 0,25 mg/l, vybraných pro testování metodou PCR pro *qnr* geny a následně *oqxAB***

rok	identifikační číslo izolátu	1.MIC [mg/l]	2.MIC [mg/l]
2005	49119	8	8
2005	43521	8	8
2005	43206	16	16
2005	43207	16	8
2006	54804	8	8
2006	54611	8	8
2006	55744	16	8
2006	54356	16	8
2006	55653	8	8
2007	57122	16	16
2007	56246	8	8
2007	58461	8	8
2008	62480	16	8
2008	63463	16	8
2008	63951	16	16
2008	63590	32	16
2008	62375	16	16
2008	66608	8	8
2008	66609	8	8
2010	71558	8	≤ 4
2010	73569	16	8
2010	73566	16	8
2010	73624	16	8
2010	73574	16	8
2010	112A	8	8
2010	73578	16	8
2010	74464	8	≤ 4
	kontrolní <i>E. coli</i>	8	≤ 4