

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Bc. Michaela Nováková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vliv vybraných antibiotik na růst mikroorganismů izolovaných z vod

Bc. Michaela Nováková

Diplomová práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Nováková**
Osobní číslo: **C17447**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Vliv vybraných antibiotik na růst mikroorganismů izolovaných z vod**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

Teoretická část:

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na výskyt chemických látek a léčiv ve vodách. Vypracujte přehled metod použitých k testování antimikrobiálního účinku vyjmenovaných látek.
2. Dále se v rešerši u vybraných mikroorganismů zaměřte na možnosti získání rezistence vůči vybraným chemickým látkám a léčivům.

Experimentální část:

1. Stanovte citlivost mikroorganismů vyizolovaných ze vzorků vod k vybraným antibiotikům.
2. Výsledky práce kriticky zhodnoťte, vyvoďte závěry a získané výsledky porovnejte s publikovanými pracemi.
3. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 ve znění dodatku č. 1 „Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu“.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Petra Mořková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Ing. Nikola Roulová**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **30. listopadu 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice. Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 2. 5. 2019

.....

Michaela Nováková

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala mé vedoucí diplomové práce Ing. Petře Mořkové, Ph.D. za její rady a čas, který mi věnovala při řešení dané problematiky. Mé poděkování patří též konzultantce Ing. Nikole Roulové za rady a výpomoc při dourčení nejistých izolátů před samotným testováním.

ANOTACE:

Diplomová práce pojednává o vlivu vybraných chemických látek a léčiv ve vodách na mikroorganismy. Začátek práce popisuje znečištění pitných a odpadních vod se zaměřením na výskyt antibiotik a ostatních léčiv, vyskytujících se ve vodách po nedostatečném odstraňování a degradaci. Další kapitoly jsou věnovány vzniku rezistence na antibiotika a na výčet metod používaných pro stanovení citlivosti bakterií vůči antibiotikům. V experimentální části byla u vybraných bakteriálních kmenů izolovaných z odpadních vod testována jejich citlivost na antibiotika diskovou difúzní metodou s následným testováním minimální inhibiční koncentrace.

KLÍČOVÁ SLOVA:

antibiotika, rezistence, ampicilin, citlivost, léčiva, minimální inhibiční koncentrace

TITLE:

Effect of selected antibiotics on growth of microorganisms isolated from water

ANNOTATION:

Diploma thesis deals with the influence of selected chemical substances and drugs in waters to microorganisms. The beginning of the thesis describes the contamination of drinking water and wastewater with a focus on the occurrence of antibiotics and other drugs found in the waters after insufficient removal and degradation. The following chapters are devoted of emergence of antibiotic resistance and to the methods used to determine the antibiotic susceptibility of bacteria. In the experimental part, selected bacterial strains isolated from wastewater were tested for their sensitivity to antibiotics by disk diffusion test followed by minimum inhibitory concentration testing.

KEYWORDS:

antibiotics, resistance, ampicillin, sensitivity, drugs, minimal inhibitory concentrations

OBSAH

Úvod	16
1 TEORETICKÁ ČÁST	17
1.1 Dělení chemických látek a léčiv dle Světové zdravotnické organizace	17
1.2 Znečištění vod.....	18
1.2.1 Cesty a zdroje znečištěné vody	18
1.2.2 Odstraňování a degradace léčiv	19
1.3 Vybrané kontaminanty vod.....	20
1.3.1 Antibiotika	20
1.3.1.1 Dělení antibiotik dle původu	20
1.3.1.2 Dělení antibiotik do skupin	21
1.3.1.3 Dělení antibiotik dle intenzity účinku	23
1.3.1.4 Dělení antibiotik dle mechanismu účinku	23
1.3.2 Ostatní vybraná farmaka	23
1.4 Výskyt vybraných léčiv ve vodách na území České republiky	24
1.4.1 První systematický screening léčiv v pitných vodách na území České republiky..	25
1.4.2 Testování přírodních minerálních vod a přírodních léčivých zdrojů.....	26
1.5 Světový výskyt vybraných léčiv ve vodách.....	27
1.5.1 Evropa.....	27
1.5.1.1 Španělsko.....	27
1.5.1.2 Baltské moře	27
1.5.1.3 Nizozemsko	28
1.5.2 Asie	28
1.5.2.1 Čína.....	28
1.5.2.2 Jižní Korea.....	29

1.5.2.3	Irák.....	29
1.5.3	Afrika.....	29
1.5.3.1	Nigérie.....	29
1.5.3.2	Ghana.....	30
1.5.4	Austrálie a Oceánie.....	30
1.5.4.1	Austrálie.....	30
1.6	Bakteriální rezistence.....	31
1.6.1	Genetická podstata rezistence.....	32
1.6.1.1	Chromozomální mutace v genech.....	32
1.6.1.2	Vnější genetické determinanty.....	32
1.7	Možnosti získání rezistence vůči vybraným antibiotikům.....	33
1.7.1	Aminoglykosidy.....	33
1.7.1.1	Působení vnějších genetických determinant spojené s enzymy modifikujícími aminoglykosidy.....	33
1.7.1.2	Transportéry AcrD.....	34
1.7.2	Beta – laktamová antibiotika.....	35
1.7.2.1	Působení vnějších genetických determinant spojené s produkcí beta – laktamáz.....	35
1.7.2.2	Chromozomální mutace v genech spojené s karbapenemy.....	37
1.7.3	Fluorochinolony.....	37
1.7.3.1	Chromozomální mutace v genech spojené s fluorochinolony.....	37
1.7.3.2	Působení vnějších genetických determinant u flourochinolonů.....	38
1.7.4	Tetracykliny.....	39
1.7.4.1	Působení vnějších genetických determinant u tetracyklinů.....	39
1.7.5	Oxazolidinony.....	39
1.7.5.1	Chromozomální mutace v genech spojené s linezolidem.....	39
1.8	Přehled metod testování citlivosti bakterií vůči antibiotikům.....	39
1.8.1	Kvalitativní metody.....	40

1.8.1.1	Diskový difúzní test.....	40
1.8.1.2	Minoritně užívané difúzní testy.....	41
1.8.2	Kvantitativní metody	42
1.8.2.1	Bujónové diluční metody	42
1.8.2.2	Agarová diluční metoda	43
1.8.2.3	E-test.....	44
2	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	45
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
3.1	Přístroje a laboratorní pomůcky.....	46
3.2	Materiál.....	47
3.2.1	Kultivační půdy a bujóny.....	47
3.2.2	Pracovní roztoky, reagentie a chemické látky.....	48
3.2.3	Bakteriální kmeny.....	50
3.2.4	Antimikrobiální látky.....	51
3.3	Pracovní postup.....	53
3.3.1	Testování citlivosti bakterií na antibiotika diskovou difúzní metodou.....	53
3.3.2	Stanovení minimální inhibiční koncentrace dle ČSN EN ISO 20776-1.....	53
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	55
4.1	Testování citlivosti bakterií na antibiotika.....	55
4.1.1	Stanovení citlivosti na antibiotika u čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	57
4.1.1.1	Stanovení citlivosti na antibiotika u vybraných izolátů <i>Escherichia coli</i> ...	58
4.1.1.2	Stanovení citlivosti na antibiotika u vybraných izolátů <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	60
4.1.1.3	Stanovení citlivosti na antibiotika u vybraných izolátů <i>Yersinia enterocolitica</i> a <i>Yersinia intermedia</i>	62
4.1.1.4	Stanovení citlivosti na antibiotika u vybraného izolátu <i>Serratia marcescens</i>	63

4.1.1.5	Stanovení citlivosti na antibiotika u vybraných izolátů <i>Klebsiella a Raoultella</i>	64
4.1.2	Stanovení citlivosti na antibiotika u čeledi <i>Pseudomonadaceae</i>	67
4.1.2.1	Stanovení citlivosti na antibiotika u vybraných izolátů <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
4.1.3	Stanovení citlivosti na antibiotika u čeledi <i>Enterococcaceae</i>	70
4.1.3.1	Stanovení citlivosti na antibiotika u vybraných izolátů <i>Enterococcus faecalis</i>	71
4.1.4	Vyhodnocení multirezistentních izolátů	72
4.1.5	Závěrečné vyhodnocení testovaných bakterií na antibiotickou citlivost pomocí diskové difúzní metody.....	73
4.2	Stanovení minimální inhibiční koncentrace dle ČSN EN ISO 20776-1.....	73
4.2.1	Stanovení minimální inhibiční koncentrace u vybraných izolátů.....	76
4.2.1.1	Závěrečné vyhodnocení testovaných bakterií pomocí bujónové mikrodiluční metody.....	79
5	ZÁVĚR.....	80
6	POUŽITÁ LITERATURA.....	82

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A SCHÉMAT

OBRÁZKY

Obrázek 1 Současná produkce ESBL, AmpC, MBL. Kmen <i>Serratia marcescens</i> rezistentní ke všem beta-laktamovým ATB	36
Obrázek 2 Výsledek testování metodou diskového difúzního testu	41
Obrázek 3 Mikrotitrační destička využitá při mikrodiluční metodě	43
Obrázek 4 Vyhodnocení agarové diluční metody	43
Obrázek 5 Testování meropenemu u <i>Klebsiella pneumoniae</i> metodou E-test	44
Obrázek 6 Testování citlivosti <i>Escherichia coli</i> na vybraná antibiotika	60
Obrázek 7 Testování citlivosti <i>Yersinia enterocolitica</i> na vybraná antibiotika	62
Obrázek 8 Testování citlivosti <i>Serratia marcescens</i> na vybraná antibiotika	64
Obrázek 9 Testování citlivosti rodu <i>Klebsiella</i> na vybraná antibiotika	65
Obrázek 10 Testování citlivosti <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na vybraná antibiotika	69
Obrázek 11 Testování citlivosti <i>Enterococcus faecalis</i> na vybraná antibiotika	72
Obrázek 12 Využití plastové mikrotitrační destičky při testování minimální inhibiční koncentrace	75
Obrázek 13 Přeskok jamek u testování minimální inhibiční koncentrace	75

TABULKY

Tabulka 1 Producenti přirozených antibiotik	20
Tabulka 2 Dělení antibiotik do skupin	22
Tabulka 3 Přehled vybraných ostatních farmak ve vodách	24
Tabulka 4 McFarlandova zákalová stupnice	50
Tabulka 5 Seznam testovaných kmenů	51
Tabulka 6 Testovaná antibiotika	52
Tabulka 7 Příprava pracovních roztoků antimikrobiálních činidel k použití pro bujónové ředění při zkouškách citlivosti	54
Tabulka 8 Rozmezí inhibičních zón dle EUCASTu pro dané antibiotikum u referenčních kmenů	56
Tabulka 9 Breakpointy průměrů inhibičních zón u čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	58

Tabulka 10 Výsledky testování citlivosti na antibiotika pro <i>Escherichia coli</i>	59
Tabulka 11 Výsledky testování citlivosti na antibiotika pro <i>Salmonella Enteritidis</i>	61
Tabulka 12 Výsledky testování citlivosti na antibiotika pro <i>Serratia marcescens</i>	63
Tabulka 13 Výsledky testování citlivosti na antibiotika pro rod <i>Klebsiella a Raoultella</i>	66
Tabulka 14 Breakpointy průměrů inhibičních zón u čeledi <i>Pseudomonadaceae</i>	67
Tabulka 15 Výsledky testování citlivosti na antibiotika pro rod <i>Pseudomonas</i>	68
Tabulka 16 Breakpointy průměrů inhibičních zón u čeledi <i>Enterococcaceae</i>	70
Tabulka 17 Výsledky testování citlivosti na antibiotika pro <i>Enterococcus faecalis</i>	71
Tabulka 18 Výsledky testování minimální inhibiční koncentrace u vybraných izolátů.....	76

SCHÉMATA

Schéma 1 Systém ATC skupin a řazení ibuprofenu	17
Schéma 2 Cesty chemických látek a léčiv do vod	18
Schéma 3 Přehled enzymů inaktivující působení aminoglykosidů	34

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AAC – (6′) – Ib – cr	bifunkční fluorochinolon aktivní varianta aminoglykosidu 6′ – N – acetyltransferáza typu Ib
AAC – (6′) – Ib	aminoglykosid 6′ – N – acetyltransferáza typu Ib
AAC	acetyltransferáza
AmpC	beta-laktamázy typu AmpC
ANT	adenyltransferáza
APH	fosfotransferázy
ATB	antibiotikum
ATC	anatomicko – terapeuticko – chemické skupiny
β-NAD	beta – nikotinamidadenindinukleotid (β – NAD)
CLSI	Klinický a laboratorní standardizační ústav (Clinical and Laboratory Standards Institute)
ČOV	čistírna odpadních vod
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>En.</i>	<i>Enterococcus</i>
ESBL	širokospektré beta – laktamázy
EUCAST	Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing)
FLD	fluorometrický detektor
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HPLC – MS/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<i>Kl.</i>	<i>Klebsiella</i>
LB	Luria – Bertani bujón
LC – MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí

MBL	metalo – beta – laktamázy
MH	Mueller – Hinton agar
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MPA	masopeptonový agar
MTBSTFA	N – methyl – N – [tert – butyldimethyl – silyl] trifluoroacetimid
MZ	Ministerstvo zdravotnictví
PBP	penicilin vázající protein
<i>Ps.</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
SPE	extrakce na pevné fázi
spp.	blíže neurčené druhy příslušného rodu (species)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
SZÚ	Státní zdravotní ústav
UHPLC – MS/MS	ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
UV	spektrofotometrický detektor
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
<i>Y.</i>	<i>Yersinia</i>

ÚVOD

Téma bakteriální rezistence je globální, stále narůstající problém z hlediska náročnosti objevování nových antibiotik. Globální rezistence je ovlivněna několika faktory. Mezi hlavní faktory ovlivňující vznik rezistence patří přelidnění, zvýšené užívání antibiotik, selekční tlak a špatný systém likvidace antibiotických léčiv, které se poté nedostatečným čištěním vod mohou dostat až do vody pitné.

Nedostatečným čištěním ve vodách zůstávají také hojně využívaná farmaceutická léčiva. Diplomová práce řeší situaci kontaminace vod léčivy v České republice a ve světě formou jednotlivých případů.

Cílem této diplomové práce bylo stanovit citlivosti na antibiotika u vybraných bakteriálních kmenů, izolovaných především z odpadních vod, z čeledi *Enterobacteriaceae*, rodu *Enterococcus* a rodu *Pseudomonas*. Stanovení citlivosti na antibiotika bylo testováno diskovou difúzní metodou a následně byla u vybraných bakterií stanovena minimální inhibiční koncentrace ampicilinu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Dělení chemických látek a léčiv dle Světové zdravotnické organizace

Léčiva jsou chemické látky sloužící k léčení, zmírnění projevů chorob či ochraně před chorobami samotnými (Halešová *et al.*, 2016).

Účinná látka léčiva je klasifikována podle Světové zdravotnické organizace (WHO) do systému anatomicko – terapeuticko – chemických skupin (ATC) na základě orgánu nebo systému, na něž působí. Systém celkem zahrnuje 5 úrovní. První úroveň klasifikuje účinné látky do 14 hlavních skupin, které se dále dělí na druhý stupeň zahrnující farmakologické a terapeutické podskupiny. Třetí a čtvrtá úroveň je rozřazena na základě terapeutických, farmakologických a chemických vlastností látek. Poslední úroveň zahrnuje konkrétní chemickou látku, splňující dané vlastnosti. Příklad zařazení účinné látky ibuprofenu dle ATC řazení WHO uvádí schéma 1 (Terron Cuadrado, 2018).

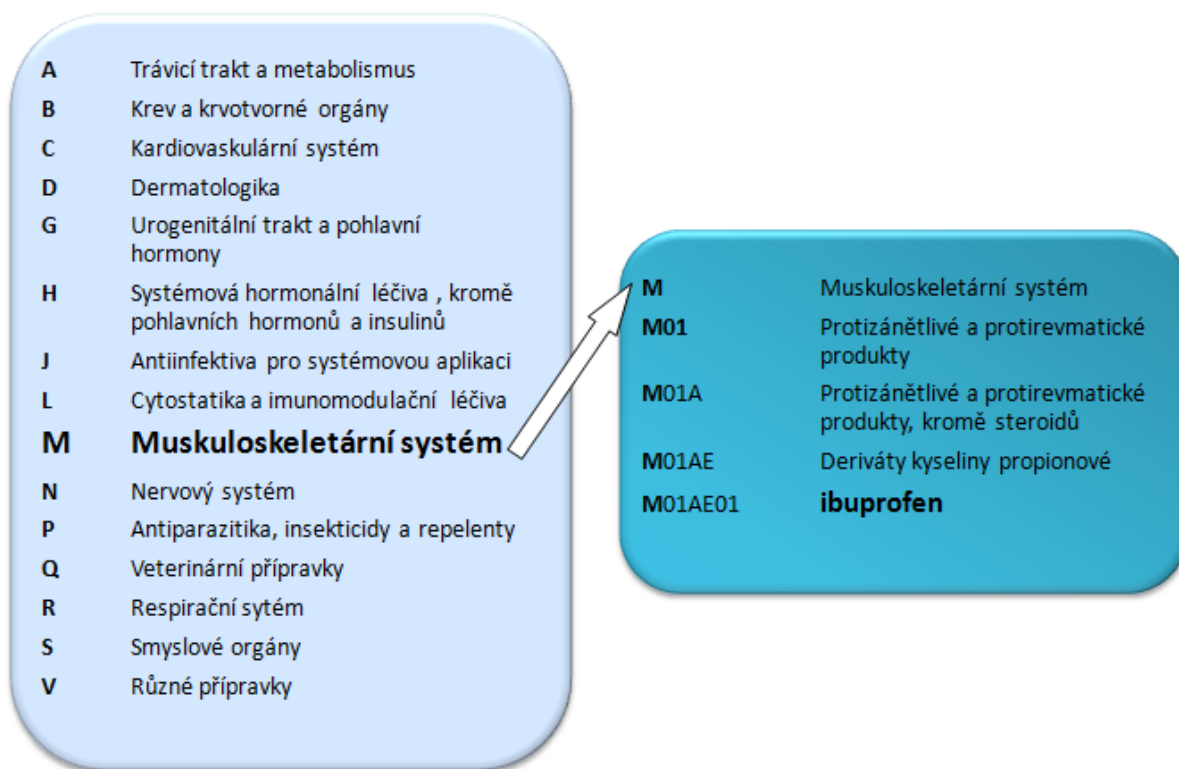


Schéma 1 Systém ATC skupin a řazení ibuprofenu (upraveno podle Terron Cuadrado, 2018, [cit. 2019-02-01])

1.2 Znečištění vod

Vlivem současného trhu s farmaceutickými látkami dochází k rozsáhlému užívání, často i nadužívání léčivých přípravků, což se projevuje jejich výskytem v životním prostředí. Chemické látky mohou mít karcinogenní, genotoxické, mutagenní nebo teratogenní účinky. Tyto látky mohou ohrožovat zdraví člověka a iniciovat narušení vodního ekosystému (Halešová *et al.*, 2016).

1.2.1 Cesty a zdroje znečištěné vody

Nejvíce analyzovaným recipientem znečištěné vody je voda odpadní. Odpadní voda může být definována jako vyčerpaný použitý tok vody z různých zdrojů, jako jsou komunální, průmyslové a zemědělské podniky, mezi nimiž je farmaceutický průmysl hlavním problémem kvůli vylučování fyziologicky a toxikologicky účinných sloučenin. Zatímco nově testované sloučeniny slouží jako budoucí léčebné prostředky zdravotních problémům, jejich neznámé účinky na zdraví, metabolický osud a akumulace představují znepokojení v posouzení dopadů na lidské zdraví (Nassiri Koopaei and Abdollahi, 2017).

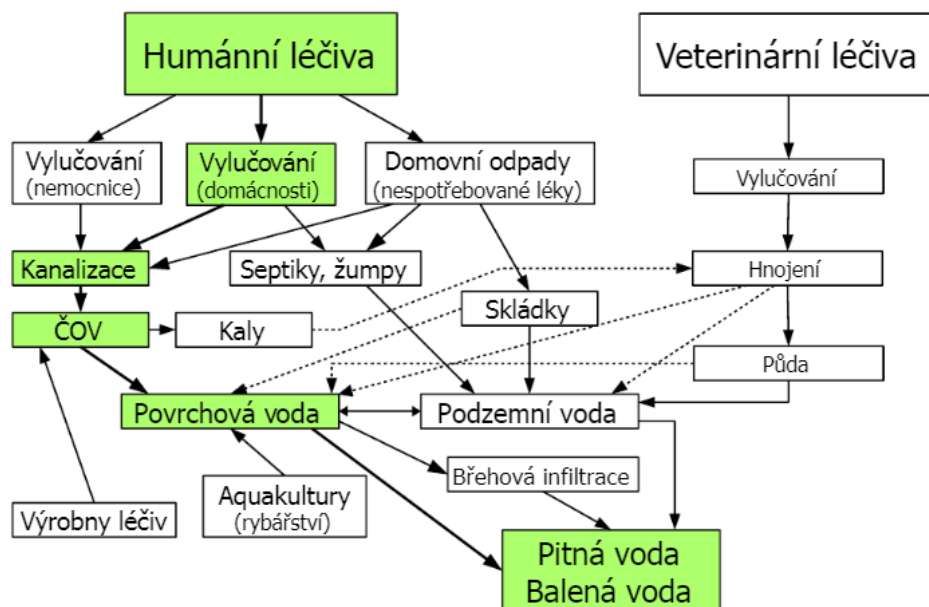


Schéma 2 Cesty chemických látek a léčiv do vod (Kožíšek and Pumann, 2013, [cit. 2019-02-28])

Humánní léčiva jsou likvidována v podobě nespoteřovaných forem spláchnutím do toalety či vylučována v nemetabolizované podobě močí a odpadní vodou se přes čistírnu odpadních vod (ČOV) může jejich část dostat do povrchových vod. Pokud je voda z takového recipientu níže po proudu využívána jako zdroj surové vody pro výrobu pitné vody a úpravná voda nemá dokonalou technologii úpravy, mohou se stopy některých léčiv dostávat do vody pitné. Problematice se nevyhýbají ani léčiva veterinární nebo hnojení organickými látkami. Cesty a zdroje znečištěné vody znázorňuje schéma 2 (Kožišek and Pumann, 2013).

1.2.2 Odstraňování a degradace léčiv

Klasickou cestou degradace a odstraňování chemických látek je odbourávání látek na bázi biodegradace. Dochází při ní k rozkladu působením biologických činitelů. Bakterie umožňují rozklad kontaminantu až na oxid uhličitý, vodu a v neposlední řadě pro sebe prospěšný uhlík (Singh *et al.*, 2016). Pokud jsou bakterie přítomny v dostatečné koncentraci, dokáže být biodegradace úspěšným procesem. Naopak některé látky jsou vůči biologické degradaci odolné. Mezi látky, které jsou nedostatečně odstraňovány dosavadním způsobem čištění odpadních vod, patří karbamazepin, diklofenak, iopromid, metoprolol a sotalol. Kvalitnějšími metodami čištění jsou membránové filtrace nebo oxidační procesy jako je chlorace, ozonizace či ultrafialové záření (Ying *et al.*, 2015).

Filtrací odpadních vod se rozumí odstranění suspendovaných pevných látek a přetrvávajícího zákalu po předchozím vyčištění za pomoci membrán. Membrány lze rozdělit do čtyř tříd podle rozdílu molekulové hmotnosti a to na membrány pro mikrofiltraci, ultrafiltraci, nanofiltraci a reverzní osmózu. Vysokou efektivitu pro zachycení nechtěných chemických látek ve vodních zdrojích má odstranění za pomoci nanofiltrace (Shahmansouri and Bellona, 2015; Ying *et al.*, 2015).

Ozon je silný oxidant schopný rozkládat se na hydroxylové radikály, které jsou silnějšími oxidačními činidly než samotný ozon. Způsob čištění nežádoucích složek z vod je založen na nepřímé oxidaci, která poskytuje hydroxylové radikály. Na rozdíl od ozonu jsou hydroxylové radikály schopné degradovat širší rozsah chemických látek. U rezistentních látek vůči ozonizaci lze použít pokročilou oxidaci přidávkou peroxidu vodíku. Ozonizaci lze využívat v systémech na úpravu pitné vody jako alternativu méně účinné chlorace (Ying *et al.*, 2015).

1.3 Vybrané kontaminanty vod

Vlivem nedostatečného způsobu odstranění chemických látek nalézáme ve vodách velké množství různých chemikálií. Vedle pesticidů a dalších sloučenin na bázi výrobků osobní hygieny jsou mezi časté analyzované kontaminanty vod řazena antibiotika (ATB) a účinné látky dalších využívaných farmak (Gašo-Sokač *et al.*, 2017).

1.3.1 Antibiotika

ATB jsou definována jako antimikrobiální látky, které svým působením usmrcují některé mikroorganismy nebo brání jejich růstu (Grenni *et al.*, 2017). Jednotlivá antibiotická léčiva lze dělit dle různých kritérií.

1.3.1.1 Dělení antibiotik dle původu

Dle původu dělíme antibiotika na přirozená, syntetická a polosyntetická. Syntetická, uměle vyrobená antibiotika jsou opakem antibiotik přírodních, která jsou produkována různými zdroji, mezi něž patří bakterie, plísňe a řasy. V pozadí nejsou ani přírodní antibiotika izolována ze živočichů (Grenni *et al.*, 2017). Producenti přirozených antibiotik jsou uvedeni v tabulce 1. Odhadovaný počet produkováných antibiotik dosahuje rozmezí mezi 66 až 71 000 (Spížek, 2016).

Tabulka 1 Producenti přirozených antibiotik (upraveno podle Spížek, 2016, [cit. 2019-03-20])

PRODUKČNÍ ORGANISMUS		POČET PRODUKOVANÝCH ANTIBIOTIK
Aktinobakterie	<i>Streptomyces</i> spp.	11 000
	další aktinobakterie	3 400
Eubakterie	myxobakterie	450
	cyanobakterie	400
	další bakterie	800
Houby	mikroskopické houby (<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>)	9000
	basidiomycety	2900
	jiné houby včetně kvasinek a slizovek	110
Vyšší organismy	vyšší rostliny	15 000 – 16 000
	nižší rostliny včetně řas a mechů	1500 – 2000
	mořské produkty (rostliny a živočichové)	6000 – 8000
	produkty suchozemských živočichů	1000 – 2000

Třetím typem jsou polosystemická antibiotika, získaná jako přírodní antibiotika chemicky změněná vložím aditiva v rámci formulace léčiva, což zlepšuje jejich stabilitu a tyto látky jsou tím pádem méně biologicky rozložitelné (Grenni *et al.*, 2017).

První nemocniční užívání léku, které lze dnes definovat jako antibiotikum, bylo použití přípravku Pyocyanáza připraveného Emmerichem a Löwem v roce 1899 z bakterie *Pseudomonas (Ps.) aeruginosa*, dříve nazývané jako *Bacillus pycyaneus*. Emmerich a Löw si všimli, že bakterie i připravené extrakty jsou účinné proti řadě patogenních bakterií, a proto se pokusili použít extrakt k léčbě různých onemocnění. Vzhledem k tomu, že výsledky nebyly konzistentní a samotný přípravek byl pro člověka toxický, bylo od léčby tímto přípravkem upuštěno.

Zásadní průlom ve zkoumání antibiotik provedl v roce 1929 Alexander Fleming s objevem penicilinu, který je produkován plísní rodu *Penicillium*. Alexander Fleming byl také jedním z prvních, kteří varovali před potenciální rezistencí na penicilin (Aminov, 2010).

1.3.1.2 Dělení antibiotik do skupin

Antibiotika jsou tříděna dle Evropského výboru pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST) do jednotlivých skupin zahrnující peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktamy, flurochinolony, aminoglykosidy, glykopeptidy a lipoglykoproteiny, skupinu makrolidů, linkosamidů a streptograminů, dále tetracykliny a oxazolidinony. Kechagia and Samanidou (2017) uvádějí dále samostatnou skupinu sulfonamidů.

Poslední skupina zahrnuje další antibiotika nezařazena ani do jedné ze zmíněných skupin. Jedná se o chloramfenikol, kolistin, daptomycin, fosfomycin, fusidovou kyselinu, metronidazol, nitrofurantoin, nitroxolin, rifampicin, spektinomycin, trimetoprim, sulfamethoxazol a trimetoprim – sulfametoxazol (EUCAST, 2018a). Nejvíce využívaná antibiotika zařazená do skupin uvádí tabulka 2.

Tabulka 2 Dělení antibiotik do skupin (upraveno podle Kechagia and Samanidou, 2017, [cit. 2019-02-06]; EUCAST, 2018a, [cit. 2019-02-15])

SKUPINA ANTIBIOTIK	ANTIBIOTIKA DANÉSKUPINY	BETA-LAKTAMOVÁ ANTIBIOTIKA
Peniciliny	Ampicilin	
	Ampicilin – sulbaktam	
	Amoxicilin	
	Amoxicilin – klavulanová kyselina	
	Piperacilin	
	Piperacilin – tazobaktam	
	Tikarcilin	
Cefalosporiny	Cefadroxil	
	Cefalexin	
	Cefazolin	
	Cefepim	
	Cefixim	
	Cefotaxim	
	Cefoxitin	
	Ceftazidim	
	Cefuroxim	
	Karbapenemy	
Imipenem		
Meropenem		
Monobaktamy	Aztreonam	
Fluorochinolony	Ciprofloxacin	
	Levofloxacin	
	Ofloxacin	
Aminoglykosidy	Amikacin	
	Gentamicin	
	Netilmicin	
	Tobramycin	
Glykopeptidy a lipoglykoproteiny	Teikoplanin	
	Vankomycin	
Linkosamidy	Klindamycin	
Makrolidy	Erytromycin	
	Azitromycin	
Streptograminy	Quinupristin – dalfopristin	
Tetracykliny	Doxycyklin	
	Tetracyklin	
	Tigecyklin	
Oxazolidinony	Linezolid	
Sulfonamidy	Sulfapyridin	
	Sulfadiazin	
	Sulfamonomethoxin	
	Sulfaquinoxalin	

1.3.1.3 Dělení antibiotik dle intenzity účinku

Podle intenzity účinku daných antibiotik na bakterie můžeme rozlišit dvě velké skupiny. První skupinou jsou bakteriostatická antibiotika, která svým působením inhibují bakteriální růst a množení. Druhou skupinou jsou antibiotika baktericidní, která bakterie přímo usmrcují (Grenni *et al.*, 2017). Jako bakteriostatická antibiotika jsou uváděny zástupci skupin makrolidů, tetracyklinů, oxazolichinonů, linkosamidů, straptograminů, sulfonamidů a chloramfenikol. Mezi baktericidní antibiotika řadíme aminoglykosidy, fluorochinolony, glykopeptidy, lipoglykoproteiny a skupinu beta – laktamových antibiotik, do které spadají peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy (Nemeth *et al.*, 2015; Bernatová *et al.*, 2013).

Intenzitu účinku antibiotika ovlivňuje několik faktorů, mezi které patří koncentrace antibiotika, doba expozice, fyziologický stav příjemce a v neposlední řadě společné působení jiných antibiotik (Grenni *et al.*, 2017).

1.3.1.4 Dělení antibiotik dle mechanismu účinku

Antimikrobiální látky jsou často kategorizovány podle mechanismus účinku. Mezi mechanismy účinku ATB na bakteriální buňku patří poškození syntézy buněčné stěny (beta – laktamy a glykopeptidová činidla), inhibice syntézy proteinů (makrolidy, tetracykliny, aminoglykosidy, chloramfenikol, oxazolidinony, linkosamidy a streptograminy), poškození syntézy nukleových kyselin u fluorochinolových antibiotik a inhibice metabolismu u trimetoprim – sulfamethoxazolu a sulfonamidů. Mezi poslední mechanismus patří narušení struktury bakteriální cytoplazmatické membrány, kde je uváděn jako příklad antibiotikum daptomycin (Etabu and Arikekpar, 2016).

1.3.2 Ostatní vybraná farmaka

Vedle ATB jsou často ve vzorcích vod analyzovány účinné látky jako karbamazepim, diklofenak, naproxen a ibuprofen. Mezi minoritně zastoupené látky patří estrogenní látky. Přehled účinných látek, příkladů léčiv a jejich využití shrnuje tabulka 3.

Tabulka 3 Přehled vybraných ostatních farmak ve vodách (upraveno podle Horák, 2015, [cit. 2019-02-04];

ECO trend Research centre s.r.o., 2015 [cit. 2019-02-04])

ÚČINNÁ LÁTKA	LÉČIVO	VYUŽITÍ
Karbamazepin	Carbamazepine, Biston,	antiepileptika, léčba některých forem roztroušené sklerózy
Diklofenak	Almiral, Diclofenac, Olfen, Veral, Voltaren	nesteroidní protizánětlivá farmaka (protibolestivý, protizánětlivý a protihorečnatý účinek)
Naproxen	Naprosyn Nalgesin S (sodné soli)	
Ibuprofen	Apo – ibuprofen, Brufen, Dolgit, Ibalgin, Ibuprofen, Nurofen	
17 – β – estradiol 17– α – ethinylestradiol	kombinované hormonální kontraceptiva	estrogenní účinky

1.4 Výskyt vybraných léčiv ve vodách na území České republiky

Přestože je Česká republika zásobována z poloviny pitnou vodou z podzemních zdrojů a druhou polovinou z chráněných vodárenských nádrží na horních tocích řek, kde je zatížení odpadními vodami nulové či minimální, objevují se v posledních letech v českých médiích zprávy o výskytu zbytků léčiv v pitných vodách. Tyto informace jsou mnohdy převzaté na základě informací ze zahraničí, ne vždy jsou ale tato tvrzení podložena analýzou. Tyto interpretace budí u části veřejnosti obavy (Kožíšek and Jelígová, 2012). Podnětem k obavám jsou alarmující čísla uváděna Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL), podle kterého se každoroční spotřeba léčivých přípravků pohybuje kolem 50 000. Tento počet obsahuje přibližně tisíc druhů různých účinných látek.

Základním právním nástrojem v Evropské unii řešícím problematiku čištění odpadních vod je směrnice Rady 91/271/EEC o čištění městských odpadních vod, v České republice potom jako směrnice Rady 91/271/EHS o čištění městských odpadních vod. Směrnice má za cíl zajistit ochranu povrchových vod před znečištěním způsobeným vypouštěním komunálních odpadních vod a biologicky odbouratelných průmyslových odpadních vod. Bohužel stanovením reziduí se legislativa v oblasti odpadních vod ani kalů doposud nezabývá. Neexistuje legislativní předpis, kterým by se stanovily limitní koncentrace pro léčiva a jejich metabolity (Halešová *et al.*, 2016). Proto jsou v České republice analýzy chemických reziduí léčiv a jejich metabolitů prováděny sporadicky.

1.4.1 První systematický screening léčiv v pitných vodách na území České republiky

V letech 2009 až 2011 proběhl první systematický screening léčiv v pitných vodách na území České republiky v rámci výzkumného projektu „Výskyt a zdravotní rizika zbytků humánních léčiv v pitných vodách“, který prováděl Státní zdravotní ústav (SZÚ) Praha. Cílem této práce bylo provést studii výskytu zbytků léčiv v pitných vodách v České republice, zhodnotit expozici populace konzumující tuto vodu a z ní plynoucí míru zdravotního rizika, a o výsledcích informovat odbornou i laickou veřejnost, popřípadě též doporučit další opatření Ministerstvu zdravotnictví (MZ) a výrobcům vody (Kožíšek and Pummann, 2013).

V první etapě testování byl vzorkovací plán vytvořen tak, aby byly zastoupeny všechny kraje České republiky. Vzhledem ke specifické cestě kontaminace byl výběr vzorků v přibližně 90 % zaměřen na vodovody využívající jako zdroj surové vody povrchovou vodu, zbývající počet zahrnoval vzorky pitné vody z podzemních zdrojů. Odběry vzorků pitné vody započaly na podzim roku 2010. Následně bylo odebráno 65 vzorků pitných vod využívajících jako zdroj surové vody povrchovou vodu nebo vodu smíšenou s vodou podzemní, dále pak 27 vzorků pitné vody z podzemních zdrojů (Pomykačová *et al.*, 2012).

Pro screening bylo vybráno pět látek. Jednalo se o protizánětlivé a antirevmatické přípravky naproxen, ibuprofen, diklofenak a antiepileptikum karbamazepin, které byly testovány na základě nálezů ze zahraničí a výše spotřeby léčiv v ČR. Pátým testovaným analytem je 17 α – ethinylestradiol, který má dosud nízký záchyt v pitných vodách, ale je diskutován v rámci přítomnosti v široce používaných antikoncepčních léčivech (Kožíšek and Jelíková, 2012). Stanovení sledovaných látek probíhalo na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí (GC/MS). Před samotným stanovením proběhlo zakoncentrování látek metodou extrakce na pevné fázi (SPE) a derivatizace silylačním činidlem N – methyl – N – [tert – butyldimethyl – silyl] trifluoroacetimid (MTBSTFA). V žádném vzorku nebyl vyhodnocen pozitivní záchyt sledovaných látek. Všechny nálezy byly pod mezí stanovitelnosti, která byla 0,5 ng/l .

Ve druhé etapě byl odběr vzorků upravené pitné vody zaměřen na 20 lokalit úpravené vody, které využívají jako surovou vodu povrchovou vodu z dolních toků řek, zatížených odpadními vodami a 3 lokality úpravny, které v těchto místech neodebírají vodu přímo z toku, ale využívají břehovou infiltraci. Z celkového počtu 23 lokalit byly čtyři lokality vyhodnoceny pod mezí stanovitelnosti. U ostatních případů se jednalo o nálezy

jedné až tří látek nad mezí stanovitelnosti. Nejvíce záchytů bylo u ibuprofenu a to 12 v koncentračním rozmezí 0,7 až 20,7 ng/l, následoval karbamazepinem s 8 záchyty v rozmezí 2,2 až 18,5 ng/l, naproxen s 5 záchyty v rozmezí 0,5 až 3,0 ng/l a 2 záchyty diklofenaku na úrovni 0,6 a 3,9 ng/l (Pomykačová *et al.*, 2012).

Poslední třetí etapa vzorkování byla zaměřena na porovnání a potvrzení vyšších koncentrací látek nalezených ve druhé etapě. Vzorky byly odebírány jak na výstupu z úpravny, tak dále v distribuční síti. V této etapě bylo odebráno 15 vzorků vody z 8 různých vodovodů. V naprosté většině případů byly nálezy nižší než v předchozí druhé etapě.

Výsledným závěrem celého projektu bylo hodnocení, že z koncentrací sledovaných léčiv v pitných vodách nevyplývá pro spotřebitele žádné známé zdravotní nebezpečí (Kožíšek and Jelígová, 2012).

1.4.2 Testování přírodních minerálních vod a přírodních léčivých zdrojů

Analýza zbytků humánních léčiv byla provedena i u minerálních vod a přírodních léčivých zdrojů. K testování bylo odebráno čtrnáct vzorků minerální vody. Do analýzy bylo začleněno 9 přírodních minerálních vod obchodních názvů Poděbradka, II Sano, Magnesia, Mattoni, Dobrá voda, Krondorf, Korunní, Hanácká a Ondrášovka. Mezi pěti přírodními léčivými zdroji zabalenými do spotřebitelských obalů byly Rudolfův pramen, Zaječická, Bílinka, Šaratica a Vincentka. Analýza probíhala za využití kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC – MS/MS).

Odběry z vrtů na vstupu do stáčíren byly analyzovány na přítomnost farmak s rozpětím detekce 10 až 50 ng/l. V rozmezí < 10 ng/l byly zastoupeny známé látky jako karbamazepin, erythromycin, sulfamethoxazol, penicillin G, trimetoprim, azithromycin. V rozmezí < 20 ng/l byly nalezeny látky ibuprofen, diklofenak, chloramfenikol a naproxen – O – desmethyl. V rozmezí méně jak 50 ng/l byly přítomny látky furosemid, hydrochlorothiazid, iohexol, iopamidol, iopromid asulfanilamid.

Výsledky potvrdily, že ochrana zdrojů přírodních minerálních vod a přírodních léčivých zdrojů je v České republice účinná (Ježková, 2019; Hrkal *et al.*, interní zdroje Svazu minerálních vod zaslané e-mailem).

1.5 Světový výskyt vybraných léčiv ve vodách

Výskyt chemických látek a léčiv ve vodách je celosvětovým problémem. Cílem kapitoly je poukázat na výskyt chemických látek a léčiv ve vodách na základě jednotlivých případů rozřazených do kontinentů.

1.5.1 Evropa

1.5.1.1 Španělsko

V severozápadním Španělsku byla provedena studie výskytu léčiv u 549 vzorků vod, které byly odebrány během let 2010 až 2012. Pro odběr vzorků bylo vybráno 6 bodů umístěných ve venkovských oblastech a 8 míst v různých částech podél řeky Miño. Metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC –MS/MS) bylo zjištěno 13 analytů. Mezi zjištěná rezidua patřily antimikrobiální činidla sulfamethoxazol trimetoprim, difloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin, kyselina molinová a sarafloxacin. Dále bylo nalezeno léčivo Diclofenac, antihypertenzivum Propranolol, glukokortikosteroid Tamoxifen a protinádorové léčivo Triamcinolon. Vzorky dále obsahovaly trifenylmethanová barviva brilantní zeleň a malachitovou zeleň. Celkem 18 % z odebraných vzorků vykazovalo pozitivní výsledky pro přítomnost alespoň jednoho sledovaného rezidua. Všechny analyty byly detekovány v rozmezí koncentrací 2,8 až 171,4 ng/l (Iglesias *et al.*, 2014).

1.5.1.2 Baltské moře

Analýza reziduí za pomoci kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC – MS/MS) probíhala v oblasti Baltského moře a Skagerraku. Studie se zabývala výskytem karbamazepinu v pobřežních a mořských vodách. Tato látka byla přítomna v 37 ze 43 hodnocených vzorků. Vzorky odebrané v Botnickém zálivu a Skagerraku neobsahovaly žádný kvantifikovaný karbamazepim, naopak vzorky odebrané ze Stockholmského souostroví byly na toto antiepileptikum pozitivní. Medián činil 2,6 ng/l (Björlenius *et al.*, 2018).

1.5.1.3 Nizozemsko

Od února 2016 do ledna 2017 byly odebrány vzorky před vstupem a po výstupu z čistírny odpadních vod Hapert. Vzorky vody byly analyzovány pro 18 různých sulfonamidů, 6 zástupců tetracyklinů, 12 chinolonů, 15 makrolidů a trimetoprim. Analýzy byly provedeny v jediném měření metodou LC – MS/MS po předchozím zakoncentrování pomocí SPE. Z celkového počtu zahrnujícího 52 vybraných antibiotik byly detekovány pouze sulfamethoxazol, sulfapyridin a trimetoprim v rozmezí 1 až 150 ng/l. Na horním toku ČOV se zjištěné sulfonamidy vyskytovaly při nižších koncentracích než ve vzorcích po proudu. Koncentrace sulfonamidů byly nejvyšší v odtoku mokřadů a zůstaly relativně stabilní. V období v říjnu a listopadu se hodnoty pomalu snižovaly (Sabri *et al.*, 2018).

1.5.2 Asie

1.5.2.1 Čína

V jižní provincii Jiangxi a severní provincii Guangdong v Číně byly odebrány vzorky podle tří typických hydrologických období červenec 2015 (přechodná sezóna), listopad 2015 (suchá sezóna) a březen 2016 (mokrý sezóna). Celkové koncentrace antibiotik se ve vzorcích vody pohybovaly v rozmezí od 193,6 ng/l do 863,3 ng/l a ve vzorcích sedimentu od 115,1 µg/kg do 278,2 µg/kg. Vzorky byly analyzovány ultra vysoce účinnou kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní detekcí (UHPLC – MS/MS) s předchozím využitím SPE.

Doxycyklin, linkomycin a zástupci antibiotické skupiny sulfonamidů sulfadiazin, sulfamonomethoxin a sulfaquinoxalin byly nalezeny ve všech testovacích vzorcích. Norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, cefalexin, penicilin G, penicilin V, oxytetracyklin a tetracyklin vykazovaly druhé nejvyšší detekční frekvence a byly nalezeny v 80 % testovaných vzorků vod. Fluorochinolony byly dominantními sloučeninami ve vzorcích vody z řek. Maximální koncentrace ciprofloxacinu byla naměřena v suché sezoně a hodnota činila 442,1 ng/l (Chen *et al.*, 2018).

1.5.2.2 Jižní Korea

Studie prezentovala výskyt reziduí v povrchových vodách z řeky Mankyung v Jižní Koreji. Vzorky byly shromážděné z pěti míst podél řeky Mankyung. Ve vzorcích vody byl analyzován ibuprofen dosahující hodnoty koncentrace za využití metody LC – MS/MS až 414 ng/l.

Karbamazepin byl nalezen v koncentraci až 595 ng/l. Z řad antibiotik byl nalezen erytromycin, který dosahoval hodnoty až 335 ng/l. Koncentrace byly nejvyšší u vzorků povrchových vod odebraných po výstupu z čistírny odpadních vod, což naznačuje možnou nedostatečnou účinnost odstraňování polutantů (Kim *et al.*, 2009).

1.5.2.3 Irák

Tato studie analyzuje přítomnost antibiotik v pitné vodě založené na analýze vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s fluorometrickým (FLD) a spektrofotometrickým (UV) detektorem ze vzorků odebraných ze dvou čistíren v Bagdádu. Celkem bylo analyzováno 36 vzorků získaných od května do června roku 2017, které zahrnovaly 18 vzorků surové vody a 18 vzorků upravené pitné vody. V úpravně vod Al Wihda byla nejvyšší koncentrace ciprofloxacinu v surové vodě určena na 1,270 µg/l, zatímco nejvyšší koncentrace levofloxacinu byla 0,177 µg/l. Ciprofloxacin jak v surové vodě, tak ve zpracované vodě ČOV Al-Rasheed byl nalezen v nejvyšší koncentraci 1,344 µg/l a 1,312 µg/l. Množství levofloxacinu v surové vodě bylo až 0,414 µg/l. Amoxicilin dosáhl v úpravně vod Al-Rasheed hodnotu 1,50 µg/l (Mahmood *et al.*, 2019).

1.5.3 Afrika

1.5.3.1 Nigérie

Studie byla zaměřena na stanovení výskytu a kvantifikaci diklofenaku, paracetamolu, ibuprofenu a ciprofloxacinu. Analýza byla prováděna v nemocničním prostředí ve státě Ogun v Nigérii. Vzorky vody byly shromažďovány z vodovodů, studniční vody a řeky kolem Olabisi Onabanjo Fakultní nemocnice, Sagamu. Vzorky byly extrahovány za použití extrakční techniky na pevné fázi a dále analyzovány za použití HPLC s UV detekcí. Vzorky obsahovaly látky uváděné v maximálních koncentracích. Maximální koncentrace paracetamolu byla

0,306 ng/ml, ibuprofenu 3,738 ng/ml, diklofenaku 0,138 ng/ml a ciprofloxacinu 0,44ng/ml. Vzorke studniční vody obsahovaly paracetamol (0,152 ng/ml) a ibuprofen (5,078 ng/ml), zatímco vzorky říční vody obsahovaly paracetamol v koncentraci 0,192 ng/ml a ibuprofen v koncentraci 3,042 ng/ml (James *et al.*, 2017).

1.5.3.2 Ghana

Studie byla provedena v Kumasi, která se nachází v centrální části Ghany s populací asi 2 miliony obyvatel. Celkem bylo v roce 2014 odebráno 81 vzorků. Nemocniční odpadní vody zahrnovaly 6 vzorků, stabilizační nádrže 18 vzorků, voda z řeky 39 vzorků a zavlažovací voda 18 vzorků. Ve vzorcích odpadních nemocničních vod bylo metodou SPE a HPLC – MS/MS zaznamenáno vysoké množství ciprofloxacinu v rozmezí koncentrací 11,4 ng/l až 15,7 ng/l. Erythromycin dosahoval maximální koncentrace 10,6 ng/l. V přítoku stabilizační nádrže byla zjištěna vysoká hodnota sulfamethoxazolu 7194 ng/l. S nejvyšší koncentrací v analyzovaných vzorcích řek se vyskytoval sulfametoxazol 2861 ng/l. Vzorke vody používané pro zavlažování zeleniny byly kontaminovány ciprofloxacinem s maximální koncentrací 146 ng/l (Azanu *et al.*, 2018).

1.5.4 Austrálie a Oceánie

1.5.4.1 Austrálie

V povodí řeky Murray-Darling byla vyhodnocena porucha endokrinního účinku u dospělých samců domorodých australských duhových ryb *Melanotaenia fluviatilis* vystavených odtoku z ČOV aktivovaného kalu a vody z řeky Murray. Výsledky hodnot v odpadních vodách z čistíren odpadních vod a říční vody vykazovaly přítomnost 17 β – estradiolu v koncentracích do 25 ng/l. Antiestrogenicita vzorků byla během experimentu detekována *in vitro* za použití biologických testů kvasinkového estrogenového screeningu. Histologické hodnocení varlat ukázalo významné potlačení spermatogeneze ryb po 28 dnech expozice (Vajda *et al.*, 2015).

1.6 Bakteriální rezistence

Rezistenci vůči antibiotikům lze definovat jako odolávání mikroorganismů vůči dané koncentraci příslušného antibiotika. Mezi dva typy rezistencí vůči ATB řadíme primární (přirozenou) rezistenci danou vlastnostmi bakteriální buňky a sekundární (získanou), kterou je schopna sama bakterie získat v průběhu jejího vývoje genetickým působením (Stiborová *et al.*, 2018). Sekundární rezistence je mnohem závažnější problém, protože jej nelze v plném rozsahu předem předpokládat (Kolář *et al.*, 2013).

Mechanismy rezistence u bakterií jsou podmíněny několika faktory, mezi které patří nepřítomnost cílové struktury, inaktivace antibiotika enzymem, narušení transportního systému či zabránění vstupu antibiotika do bakteriální buňky přes nepropustnou stěnu.

Mezi příklady rezistence založené na postrádání transportu jsou uváděny anaerobní bakterie vnitřně rezistentní vůči aminoglykosidům. *Mykoplasma* naopak zcela postrádá buněčnou stěnu jako cíl pro antibiotikum, a proto jsou přirozeně odolné proti působení beta – laktamových antibiotik. Bakterie *Serratia marcescens* přirozeně produkuje enzym kódovaný chromozomálním genem schopným inaktivovat tobramycin, netilmicin a amikacin.

V případě gramnegativních bakterií se jedná o peptidoglykanovou vrstvu pokrytou vnější membránou, která hraje roli v propustnosti. Vzhledem k tomu, že glykopeptidové molekuly antibiotik jsou příliš velké, nemohou proniknout skrz póry do vnější membrány stěny gramnegativních bakterií (Coculescu, 2009).

Nejrozšířenější skupinou gramnegativních bakterií je čeleď *Enterobacteriaceae*, která je rozšířena celosvětově v různých ekologických zdrojích, jako je půda, voda a vegetace. Některé druhy čeledi *Enterobacteriaceae* jsou součástí přirozené mikroflóry zvířat a lidí. Z pohledu růstu se řadí mezi nenáročné bakterie. Optimum jejich růstu je 37 ° C při aerobních podmínkách. Mezi známé druhy této čeledi se řadí *Citrobacter* spp., *Yersinia* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Morganella morganii* a *Providencia* spp. Dále se jedná o zástupce *Escherichia (E.) coli*, *Salmonella (S.) enterica* a *Shigella*, které jsou u lidí často spojovány s průjmovým onemocněním. *Escherichia coli* vedle průjmového onemocnění způsobuje infekční onemocnění močových cest (Jenkins *et al.*, 2017).

1.6.1 Genetická podstata rezistence

Vývoj rezistence může být výsledkem zapříčinění mutací v chromozomálních genech či důsledkem získání vnějších genetických determinant rezistence.

1.6.1.1 Chromozomální mutace v genech

Fenotyp rezistence vůči antibiotikům může být způsoben mutací v různých bakteriálních místech. Důležitou roli pro přeměnu hraje struktura genu. Pokud mají všechny pozice rovnocenné možnosti mutace, dlouhé geny mohou být více náchylné k mutaci než krátké. Nicméně velikost genu není hlavním faktorem, který je relevantní pro jeho přeměnu, protože ne každá mutace v genu, který kóduje antibiotický cíl, vede k rezistenci. Například u *E. coli* byly pozorovány změny v nejméně sedmi pozicích v genu *gyrA*, které vedly k fenotypu rezistence na chinolin. Dokonce i poloha genu v bakteriálním chromozómu ovlivňuje rychlost mutace, jelikož geny vzdálenější od počátku replikace chromozomu u *Enterobacteriaceae* mohou mít mutaci přibližně dvojnásobnou než u genů podobného původu (Martinez and Baquero, 2000).

1.6.1.2 Vnější genetické determinanty

Dalším významným typem je získání cizí deoxyribonukleové kyseliny (DNA) kódující determinanty pomocí horizontálního přenosu genu. Většina antimikrobiálních látek používaných v klinické praxi je nebo pochází z produktů, které se přirozeně vyskytují v životním prostředí. Bakterie sdílející prostředí s těmito molekulami nesou vnitřní genetické determinanty rezistence. Tato genetická výměna se navíc podílí na šíření rezistence u často používaných antibiotik. Bakterie získávají cizí DNA třemi hlavními způsoby, mezi které patří transformace začleněním DNA, přenos neboli transdukce fragmentu chromozomu z donorové bakteriální buňky do buňky příjemce za pomoci fágu a konjugace neboli výměny genetické informace mezi dvěma buňkami, které jsou za tímto účelem dočasně spojené. Konjugace využívá pro sdílení genetických informací mobilní genetické prvky plazmidy, transpozony a integrony, které hrají zásadní roli při vývoji a šíření antimikrobiální rezistence mezi klinicky relevantními organismy (Munita and Arias, 2016).

1.7 Možnosti získání rezistence vůči vybraným antibiotikům

Následující podkapitoly popisují možnosti získání rezistence chromozomální mutací v genech či extrachromozomálním působením vnějších genetických determinant u zvolených skupin antibiotik využitých v praktické části diplomové práce.

1.7.1 Aminoglykosidy

Bakteriální buněčná stěna slouží jako přírodní bariéra proti malým molekulám aminoglykosidů. Může být ale dále posilována prostřednictvím získaných mutací. Efluxové pumpy pracují na vylučování aminoglykosidů z bakteriálních buněk, kde mohou modifikace způsobit další odolnost vůči aminoglykosidům. Mutace v ribozomálním cíli aminoglykosidů, i když vzácně, také přispívají k rezistenci (Garneau-Tsodikova and Labby, 2016).

1.7.1.1 Působení vnějších genetických determinant spojené s enzymy modifikujícími aminoglykosidy

Zdánlivě nejrozšířenějším mechanismem rezistence vůči aminoglykosidům je inaktivace těchto antibiotik pomocí enzymů (Garneau-Tsodikova and Labby, 2016). Geny kódující tyto enzymy mohou být mezi bakteriemi přenášeny transpozony a plazmidy a mohou tvořit součást integronů. Tyto proteiny jsou rozděleny do tří hlavních tříd podle typu modifikace ve schématu 3, mezi které patří acetyltransferázy (AAC), nukleotidyltransferázy společně s adenyltransferázami (ANT) a fosfotransferázy (APH).

Tyto enzymy katalyzují tři typy reakcí, mezi které patří fosforylace, adenylace a acetylace a jsou dány prostými vlastnostmi bakterie. V rámci těchto tříd může být provedeno další rozdělení na základě enzymů různé regionální specifity. Uváděn je také bifunkční enzym AAC (6') – APH (2''), který může postupně acetylovat a fosforylovat substráty (Van Hoek *et al.*, 2011).

Příkladem vzniku rezistence je enzym aminoglykosid 6' – N – acetyltransferáza typu Ib (AAC (6') – Ib), která se vyskytuje v mnoha variantách, z nichž většina se liší na N konci. Konkrétně enzym AAC (6') – Ib₁₁ uděluje rezistenci ke komplexu gentamycinu. První identifikovaný gen *aac (6') – Ib* byl nalezen v plazmidech bakterie *Serratia marcescens* a *Klebsiella (Kl.) pneumoniae*. Studie plazmidu *Kl. pneumoniae* nazvaného pJHCMW1 vedla

k identifikaci transpozonu *Tn1331*, který obsahoval rezistenční gen *aac (6') - Ib* (Ramirez and Tolmasky, 2017).

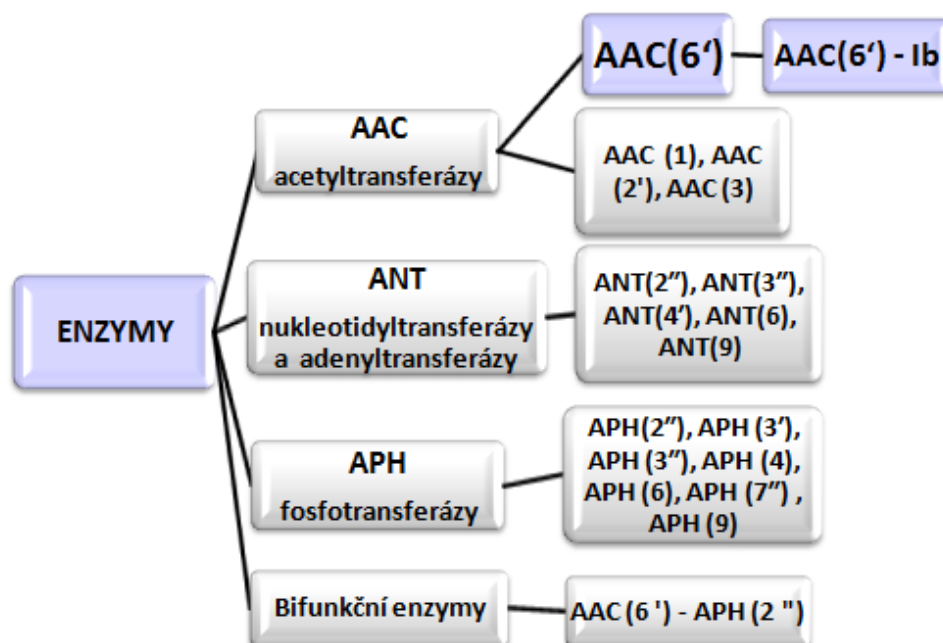


Schéma 3 Přehled enzymů inaktivujících působení aminoglykosidů (upraveno podle Shmara *et al.*, 2001 [cit. 2019-02-19]; Van Hoek *et al.*, 2011, [cit. 2019-02-19])

Acetyltransferázy (AAC), adenyltransferázy (ANT), fosfotranferázy (APH)

Klinickým příkladem přenosu konjugačního plazmidu, spojeného s rezistencí na aminoglykosidy, je případ fatální neonatální septikémie zprostředkované bakterií *Kl. pneumoniae* EK105, která nese mobilní plazmid kódující rezistenci na amikacin, ampicilin, chloramfenikol, kanamycin, streptomycin, tobramycin, netilmicin, oxacilin, gentamicin a mezlocilin (Magalhães and Blanchard, 2009).

1.7.1.2 Transportéry AcrD

Odlíšným případem je genom *E. coli*, který obsahuje několik genů kódujících transportéry. Příkladem je transportér značený AcrD, který se podílí na aktivním efluxu aminoglykosidových molekul. Studie ukázaly, že transportér AcrD zachytává nejen

aminoglykosidové molekuly z cytoplazmy, ale také z periplazmatického prostoru, který je následován aktivním efluxem léku ven z buňky (Magalhães and Blanchard, 2009).

1.7.2 Beta – laktamová antibiotika

1.7.2.1 Působení vnějších genetických determinant spojené s produkcí beta – laktamáz

Beta – laktamová antibiotika jsou širokou skupinou antibiotik obsahující v molekulární struktuře beta – laktamový kruh. Patří sem deriváty penicilinů, cefalosporinů, monobaktamů a karbapenemů.

Existují tři nezávislé faktory určující bakteriální citlivost na beta – laktamová antibiotika, mezi které patří produkce beta – laktamázy, snížená penetrace vnějších buněčných membrán pro přístup k enzymům buněčné stěny a rezistence cílové vazby penicilin vazacího proteinu (PBP) k vazbě beta – laktamovými činidly. Hlavním mechanismem rezistence vůči beta – laktamovým antimikrobiálním činidlům u gramnegativních bakterií je produkce hydrolytických enzymů beta – laktamáz, které narušují amidovou vazbu charakteristického čtyřčlenného beta – laktamového kruhu. Enzymy jsou chromozomálně nebo plazmidy kódované a často spojené s mobilními genetickými prvky, jako jsou transpozony a integrony. Některé beta – laktamázy jsou specifické pro peniciliny (penicilinázy), některé jsou specifické pro cefalosporiny (cefalosporinázy) a jiné mají afinitu pro obě skupiny (Dowling *et al.*, 2017).

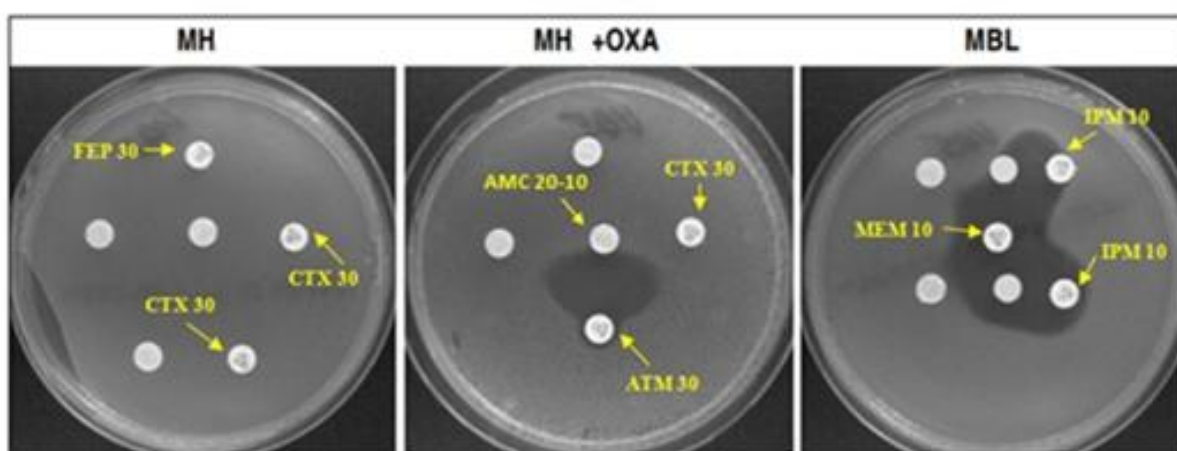
Široce uváděným příkladem je čeleď *Enterobacteriaceae* produkující širokospektré beta – laktamázy (ESBL). Proteiny ESBL jsou kódovány geny umístěnými na chromozomech nebo mobilních genetických prvcích, které nesou geny rezistence. Multirezistentní kmeny produkujících ESBL jsou hlavní příčinou selhání léčby u pacientů (Almeida *et al.*, 2017).

Dalšími uváděnými jsou beta – laktamázy označované jako AmpC, které z funkčního hlediska hydrolyzují penicilinová antibiotika, monobaktamy a většinu cefalosporinů. Tyto enzymy nehydrolyzují karbapenemy a nejsou inhibovány inhibitory beta – laktamáz.

Substrátová specifita metalo – beta – laktamáz (MBL) zahrnuje peniciliny, cefalosporiny a karbapenemy. Monobaktamové antibiotikum aztreonam není MBL hydrolyzováno. MBL nejsou inhibovány kyselinou klavulanovou, tazobaktamem nebo sulbaktamem, čili inhibitory beta – laktamáz s beta – laktamovým kruhem. Donorem molekuly vody při hydrolýze amidové vazby beta – laktamu je kovový iont

(obvykle zinek) vázaný v aktivním místě enzymu (Hrabák *et al.*, 2009). MBL jsou často spojovány s bakterií *P. aeruginosa*. Existuje několik typů karbapenemáz a to AIM, SME, GIM, IMP, NDM, SPM a VIM a jejich příslušných *bla* genů kódujících rezistenci (Khorvash *et al.*, 2017).

Heterogenní beta – laktamázy skupiny OXA hydrolyzují oxacilin a nejsou inhibovány inhibitory beta – laktamáz. Substrátová specifita enzymů OXA je značně různorodá a to od penicilinů až po karbapenemy (Hrabák *et al.*, 2009).



Obrázek 1 Současná produkce ESBL, AmpC, MBL. Kmen *Serratia marcescens* rezistentní ke všem beta-laktamovým ATB (upraveno podle Hrabák *et al.*, 2009, [cit. 2019-02-28])

Mueller – Hinton agar, 24 hodin (37°C, aerobně). Mueller-Hinton agar (MH), OXA beta – laktamázy (OXA), Metalo – beta – laktamázy (MBL), cefepim 30 µg (FEP 30), cefotaxim 30 µg (CTX 30), aztreonam 30 µg (ATM 30), meropenem 10 µg (MEM 10) imipenem 10 µg (IPM 10), amoxicilin – klavulanová kyselina 20–10 µg (AMC 20-10)

Obrázek 1 znázorňuje současnou produkce ESBL, AmpC a MBL u kmene *Serratia marcescens*, který je rezistentní ke všem beta – laktamům. Interpretace poukazuje na produkci ESBL rozšířenou zónou mezi diskem amoxicilin – klavulanové kyseliny (AMC) a aztreonamu (ATM) na druhé Petriho misce. Dále je kmen producentem inducibilní AmpC vyznačující se zónou ve tvaru „D“ mezi diskem AMC a ATM. Současně je kmen také producentem MBL, kterou lze hodnotit rozšířenou zónou mezi inhibitory a diskem s meropenemem a imipenemem. MBL obvykle nehydrolyzují aztreonam a proto z toho důvodu je produkce ESBL a AmpC patrná pouze u disku ATM. Cefalosporiny CTX, CAZ, FEP jsou MBL hydrolyzovány.

Další uváděnou je beta – laktamáza K1. Jedná se o základní inherentní beta – laktamázu druhu *Kl. oxytoca*. Základním charakteristickým znakem je hydrolýza aztreonamu.

Karbapenemázy spadající do funkční skupiny 2f , která je součástí skupiny AmpA a jsou velmi slabě inhibovány kyselinou klavulanovou. Stejně jako v případě AmpC, jsou tyto enzymy inhibovány kyselinou boritou (Hrabák *et al.*, 2009).

1.7.2.2 Chromozomální mutace v genech spojené s karbapenemy

Dalším odlišným příkladem vzniku rezistence je oprD mutace v souvislosti s rezistencí na imipenem z řad karbapenemů u *Ps. aeruginosa*, kde je uváděná změna exprese vnějších membránových porinů (OprD). Známé jsou též mechanismy uvolnění karbapenemázy z patogenní bakterie a nadměrná exprese efluxní pumpy

Ps. aeruginosa se sníženou expresí OprD proteinu vykazuje mírnou rezistenci na imipenem, zatímco nadměrná exprese efluxní pumpy kombinovaná se ztrátou OprD dává *Ps. aeruginosa* vysokou rezistenci nejen na imipenem, ale také na meropenem a doripenem. Nedostatečná exprese OprD obvykle vede k bazální úrovni rezistence vůči antibiotikům u *Ps. aeruginosa* odolného vůči více léčivům. Většina kmenů *Ps. aeruginosa* rezistentních na karbapenem je defektní při expresi OprD (Li *et al.*, 2012).

1.7.3 Fluorochinolony

1.7.3.1 Chromozomální mutace v genech spojené s fluorochinolony

Izoláty rezistentní na fluorochinolony obvykle obsahují jednu nebo více mutací v malém úseku genů *gyrA*, *gyrB*, *parC* či *parE*, kódující DNA gyrázu a topoizomerázu IV. Hlavním úkolem DNA gyrázy je pomoc při vzniku vysoce kondenzované trojrozměrné struktury DNA. Obecná funkce topoizomerázy je méně srozumitelná, nicméně je známo, že enzym hraje zásadní roli při dělení DNA dceřiných řetězců po chromozomální duplicitě.

Druhým způsobem podporující rezistenci může být chromozomálně zprostředkovaná nadměrná exprese efluxové pumpy, která zvyšuje vylučování chinolonů z buňky.

Mutace, které zvyšují eflux, se vyskytují jako primární krok, který umožňuje bakteriím přežít (Dowling *et al.*, 2017).

1.7.3.2 Působení vnějších genetických determinant u flourochinolonů

Od konce 90. let jsou popisovány tři mechanismy zodpovědné za plazmidově zprostředkovaný typ rezistence zahrnující *gnr* geny, bifunkční fluorochinolon aktivní variantu aminoglykosidové 6' – N – acetyltransferázy (AAC (6') – Ib – cr) a v poslední řadě geny efluxní pumpy *qepA1* a *qepA2* (Kolář *et al.*, 2015).

Plazmidovou rezistenci na chinolony ovlivňují geny *qnr* kódujícími Qnr proteiny. Hlavní skupiny *qnr* genů jsou *qnrA*, *qnrB* a *qnrS*. Potvrzením je studie prevalence odolnosti vůči ciprofloxacinu u *E. coli* izolovaná z moči, která dosáhla 59,4 % . Tato studie ukázala vysoký výskyt plazmidem zprostředkované rezistence na chinolon *qnrS* (Ranjbar *et al.*, 2018).

Druhou možností plazmidově sprostředkované rezistence vůči fluorochinolonům je chinolon modifikující enzym AAC (6') – Ib – cr. Jedná se o bifunkční variantu schopnou acetylovat chinolony s piperazinylovým substituentem, která obsahuje ciprofloxacin a norfloxacin. Chinolon levofloxacin bez této substituce není tímto enzymem ovlivněn. Gen *aac (6') – Ib – cr* kódující enzym AAC (6') – Ib – cr se obvykle nachází v kazetě jako součást integronů v multirezistentních plasmidech, které mohou obsahovat navíc ještě jiné plazmidově zprostředkované geny rezistence (Machuca *et al.*, 2016).

Posledním způsobem rezistence spojené s plasmidem se týká genů *qepA* a *oqxAB* efluxové pumpy, které poskytují sníženou náchylnost k chinolonům .Gen *qepA1* byl nejprve testován v roce 2007 dvěma skupinami z Japonska a Belgie. V roce 2008 byl posléze objeven gen *qepA2* (Wang *et al.*, 2015). Na souvislost s problematikou zprostředkované rezistence pomocí plasmidů poukazuje i vyhodnocení prevalence genů *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac (6') – Ib – cr*, *qepA* a *oqxAB*. Celkově byla plazmidově zprostředkovaná chinolinová rezistence detekována u 72 (60 %) izolátů. Jednalo se o 20 izolátů *E. coli*, 32 izolátů *Kl. pneumoniae* a posledních 20 izolátů patřilo bakterii *Enterobacter cloacae*. Výsledky ukázaly *qnr* geny v 25,8 %, *oqxAB* geny u 21,6 % a gen *aac (6') – Ib – cr* v 19,2 % případů. *Gnr* geny byly detekovány hlavně u *E. cloacae* (50 %) a geny *aac (6') – Ib – cr* u *E. coli* (47,5 %). Geny *oqxAB* byly spojeny s *Kl. pneumoniae* v 65 % (Ferjani *et al.*, 2015).

1.7.4 Tetracykliny

1.7.4.1 Působení vnějších genetických determinant u tetracyklinů

Testováním rezistentních kmenů bakterií vůči tetracyklinům bylo zjištěno, že rezistenci na tetracyklinová antibiotika v bakteriální buňce zajišťují bílkovinné produkty jednoho nebo více genů tetracyklinové rezistence. Geny odolné proti tetracyklinům (*tet*) jsou tříděny na *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetH*, *tetI*, *tetJ*, *tetK*, *tetL*, *tetP*, *tetV*, *tetY*, *tetZ*, *tet30*, *tet31*, *tet33*, *tet34* a *tet35*. Naopak *otrB* gen souvisí s rezistencí k oxytetracyklinům. Mezi geny kódující proteiny chránící ribozomy proti tetracyklinům jsou zahrnovány *tetM*, *tetO*, *tetP*, *tetQ*, *tetS*, *tetT*, *tetW*, *otrA*, *tet32* a *tet 36*. Třetí skupina zahrnuje geny kódující enzymy, které následně modifikují modifikující tetracyklin *tetX* a *tet37*. Řada těchto genů kóduje efluxní pumpy. Jako příklad je uváděn gen *tcr3* (Mařka and Popowska, 2016).

1.7.5 Oxazolidinony

1.7.5.1 Chromozomální mutace v genech spojené s linezolidem

Rezistence k linezolidu je spojena s bodovými mutacemi genu kódujícího 23S rRNA. Léčivo se váže na doménu 23S ribozomální ribonukleové kyseliny (rRNA) podjednotky 50S bakteriálních ribozomů, čímž inhibuje syntézu proteinů. Vzhledem k tomu, že linezolid je zcela syntetický léčivý přípravek, nelze předpokládat, že by přirozený rezervoár genů rezistence upřednostňoval vznik klinické rezistence. Ve skutečnosti první výsledky bakterií rezistentních na linezolid ukázaly přítomnost bodových mutací na cílovém místě léčby (Morales *et al.*, 2010).

1.8 Přehled metod testování citlivosti bakterií vůči antibiotikům

Tématu antibiotik a testování jejich citlivosti je v dnešní době věnována velká pozornost (Grenni *et al.*, 2017). Citlivost bakterií vůči antibiotikům lze testovat řadou metod, které obecně dělíme na metody kvalitativní a kvantitativní.

1.8.1 Kvalitativní metody

Hodnocení u kvalitativních metod probíhá v rámci breakpointů, tedy předem známých hraničních hodnot. Účinek antibiotika na testovaný mikroorganismus je vyhodnocen jako citlivý, středně citlivý nebo rezistentní. Pokud je bakteriální kmen k testovanému antibiotiku citlivý, je spojován s velkou pravděpodobností terapeutického účinku. Středně citlivý kmen je spojován s nejistým terapeutickým účinkem a rezistentní s vysokou pravděpodobností terapeutického selhání (Schofield, 2012).

Mezi nejvíce využívanou kvalitativní metodu patří diskový difúzní test. V menším měřítku jsou využívány způsoby testování jamkovou, komínkovou a kapkovou metodou.

1.8.1.1 Diskový difúzní test

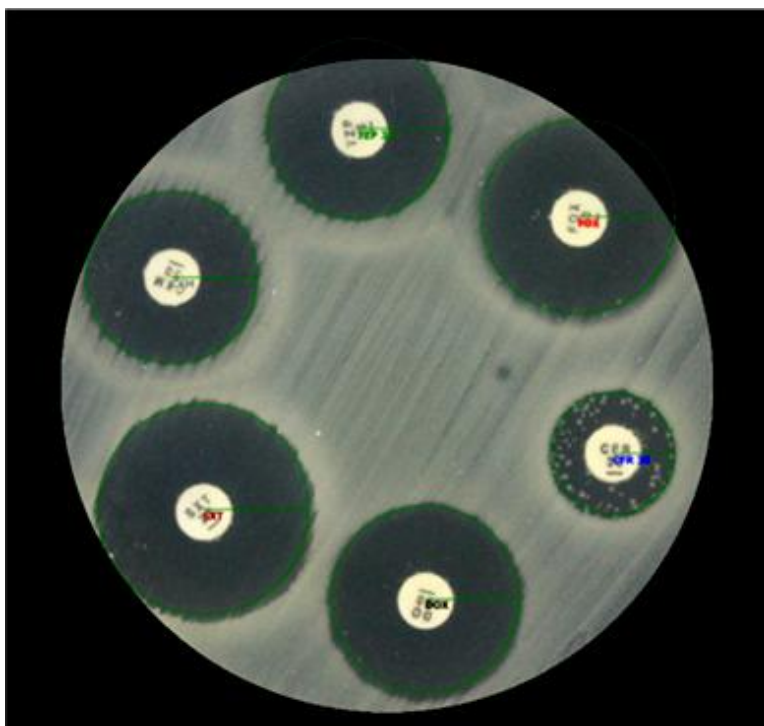
Tato oficiální metoda používaná v řadě klinických mikrobiologických laboratoří pro rutinní testování antimikrobiální citlivosti byla vyvinutá v roce 1940 (Balouiri *et al.*, 2016). Stejně jako u všech standardizovaných metod musí být dodržována technika modifikace za účelem dosažení spolehlivých výsledků. Pro použití metody jsou přesně definovaná pravidla, která souvisí s přípravou a skladováním médií, přípravou inokula, inokulací agarových misek, použitím antimikrobiálních disků, inkubací misek, vyšetřením misek po inkubaci, měřením zón a interpretací náchylnosti a v neposlední řadě kontrolou kvality.

Při diskové difúzní metodě je využívána suspenze mikroorganismů ve fyziologickém roztoku o zákalu McFarlandovy stupnice 0,5. K přípravě dané suspenze je nutno použít 24hodinové kultury, které byly kultivované na neselektivním médiu. Po povrchu agaru MH, který je pro náročné mikroorganismy doplněn o 5% koňské krve a 20 mg/l beta – nikotinamidadenin dinukleotid (β – NAD), se rovnoměrně rozetře inokulum a následně jsou aplikovány papírové disky napuštěné antibiotiky. Antimikrobiální látky napuštěné v discích difundují ze zdroje do média a následně ovlivňují růst mikroorganismů (EUCAST, 2015). Každé využití antibiotikum difunduje jinou rychlostí a dosahuje různých koncentrací v okolním agaru na základě jeho udaných molekulárních a chemických vlastností (Pierce-Hendry and Dennis, 2010).

Naměřené průměry inhibičních zón po inkubaci se interpretují v kategoriích citlivosti. Výsledky je možné považovat za validní až po provedení testování kontroly standardních

bakteriálních kmenů, které musí splňovat meze určených breakpointů (EUCAST, 2015). Příklad výsledků testování znázorňuje obrázek 2.

Mezi instituce zaměřující se na tuto metodiku patří Klinický a laboratorní standardizační ústav (CLSI) a dále Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST). Provedení diskové difúzní metody dle EUCASTu a CLSI se liší v době inkubace agarové plotny s disky. Podle EUCAST metody by doba inkubace měla být v rozmezí 16 až 20 hodin, naopak u CLSI je určená standardní doba inkubace 16 až 18 hodin. Pro několik druhů izolátů EUCAST doporučuje nižší koncentraci antibiotika než CLSI (Balouiri *et al.*, 2016; Matuschek *et al.*, 2014).



Obrázek 2 Výsledek testování metodou diskového difúzního testu (foto autor)

Vyhodnocené pomocí systému BACMED. Kmen *Escherichia coli*. Mueller – Hinton agar, 16-20 hodin (35 ± 1 °C, aerobně). Citlivost na všechna testovaná antibiotika. Cefadroxil 30 µg (CFR 30), doxycyklin 30 µg (DOX 30), sulfamethoxazol – trimetoprim 25 µg (SXT 25), cefuroxim 30 µg (CXM 30), piperacilin – tazobaktam 30–6 µg (TZP 30–6), cefoxitin 30 µg (FOX 30)

1.8.1.2 Minoritně užívané difúzní testy

Vedle diskové difúzní metody jsou dle způsobu nanášení testované látky uváděné další metody testování citlivosti. U těchto testů dochází analogicky po následném přidání činidla k jeho rozptýlu a tvorbě inhibičních zón.

Jamková difúzní metoda využívá připravených vyhloubených jamek korkovrtem o průměru 5 mm (Choyam *et al.*, 2015).

Při komínkové difúzní metodě se vlačují komínky z nerezavějící oceli do agarové vrstvy média. Na misku s příslušným živným médiem lze umístit až šest nerezových komínek o velikosti $8 \times 6 \times 10$ mm. Do takto připravených komínek se pipetují jednotlivé roztoky antimikrobiálních látek. Na agar se nanese vrstva testované bakterie. Po inkubaci se sledují vlivem difúze vzniklé inhibiční zóny (Cazedey and Salgado, 2011).

Posledním typem je kapková difúzní metoda, u které se testovaná látka kape přímo na povrch tuhého média (Kopecká and Rotková, 2016).

1.8.2 Kvantitativní metody

Mezi kvantitativní metody patří diluční bujónové metody, agarová mikrodiluční metoda a E – test. Kvantitativní metody jsou hodnoceny na základě minimální inhibiční koncentrace (MIC), což je nejnižší koncentrace, která za definovaných podmínek zamezí viditelnému růstu bakterií (Schofield, 2012).

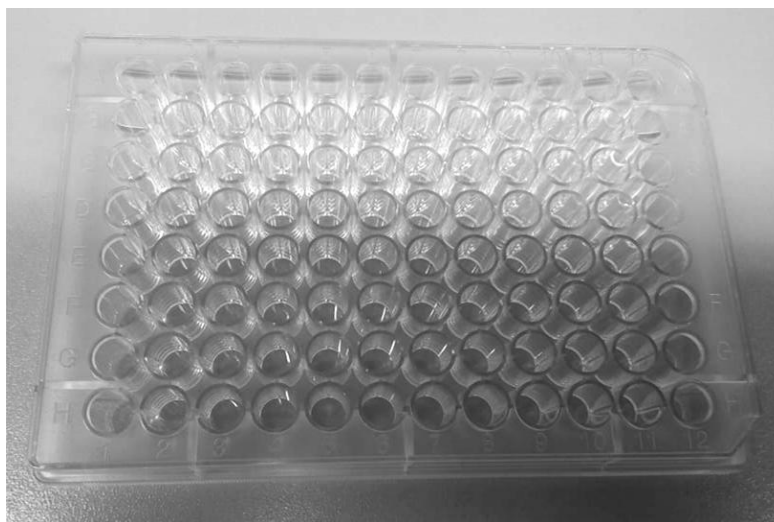
1.8.2.1 Bujónové diluční metody

Bujónovou diluční metodu dělíme na makrodiluční a mikrodiluční provedení. Oba typy provedení využívají dvojnásobného sériového ředění antibiotických látek v kapalném růstovém médiu, kterým je MH bujón. Následně je do každého roztoku aplikováno známé množství suspendovaných bakterií. Po manuálním nebo automatickém přidání malého množství bakterií dochází k inkubaci, která vede k pozorovatelné změně spolu s růstem bakterií a následnému vyhodnocení MIC.

Pokud použijeme v mikrodilučním provedení 96 jamkovou destičku, můžeme docílit až 12 různých dílčích koncentrací v jedné mikrotitrační destičce (obr. 3).

Mikrotitrační destička je tedy vhodná pro analyzování až 6 izolátů v dupletu. Plastové mikrotitrační destičky s jamkami mohou být zakoupeny s různými koncentracemi suchého činidla předem připravenými v každé jamce, což zvyšuje standardizaci a usnadňuje použití. Hlavní nevýhodou však je, že výběr léčiv je omezen na komerčně dostupné panely. Největším přínosem je snížení množství činidel oproti zkumavkové diluční metodě a při využití

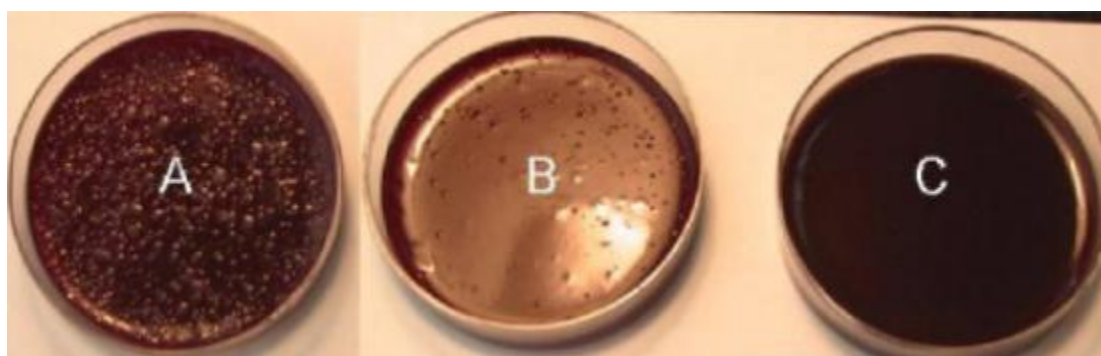
automatizace je výhodou též rychlost, která přináší snadnější aplikovatelnost v klinických podmínkách pro detekci nově vznikající antimikrobiální odolnosti (Farrell *et al.*, 2014; Schumacher *et al.*, 2018).



Obrázek 3 Mikrotitrační destička využitá při mikrodiluční metodě (foto autor)

1.8.2.2 Agarová diluční metoda

Principem této metody je začlenění různých koncentrací daného antibiotika během přípravy přímo do agaru. Po utužení agarové plotny se na její povrch nanese testované inokulum a miska se nechá inkubovat. Příkladem je obrázek 4, kde miska A a B vykazuje nárůst bakterie, naopak miska C obsahovala koncentraci antibiotika v hodnotě MIC, proto nebyl růst pozorován (Mohammadzadeh *et al.*, 2012).



Obrázek 4 Vyhodnocení agarové diluční metody (Mohammadzadeh *et al.*, 2012 [cit. 2018-02-14])

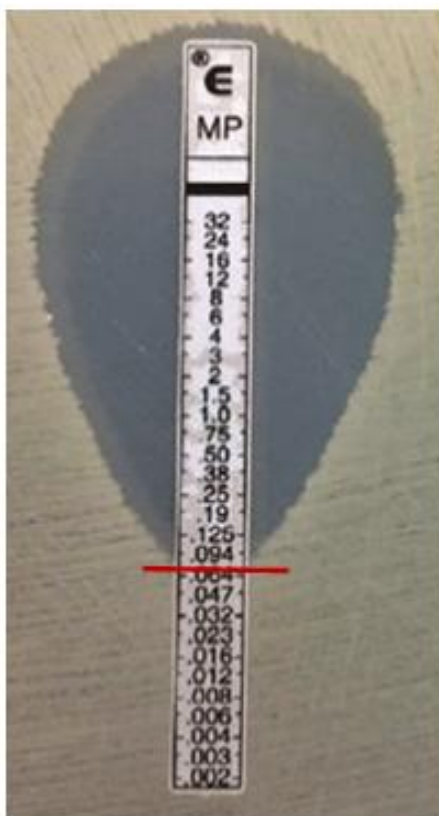
Leishmania major, krevní agar, 3-5 dnů (25 °C, aerobně)

1.8.2.3 E-test

E-test využívá principu antimikrobiálního gradientu. Antimikrobiální gradient je definován jako difúze antibiotického léčiva napuštěného v kalibrovaném plastovém proužku na plochu agarové půdy.

Příprava bakteriálního zákalu a jeho nanesení na plochu agaru je totožné jako u diskového difúzního testu. Plastového proužky napuštěné rostoucími koncentracemi antibiotika opatřené stupnicí s měřítkem MIC jsou umístěny za pomoci pinzety na plochu agarového média s předem rozprostřeným inokulem. Nutností je úplný kontakt s povrchem agaru pro potlačení nežádoucích výsledků.

Po inkubaci se vytváří eliptická zóna inhibice, která přetíná proužek s antibiotikem v místě udávajícím hodnotu MIC (obr. 5). Výsledek poskytuje informaci o vhodné koncentraci ATB, která je proti testovanému kmenu účinná (Grace, 2013).



Obrázek 5 Testování meropenemu u *Klebsiella pneumoniae* metodou E-test (upraveno podle Shields *et al.*, 2017, [cit. 2019-01-28])

Mueller – Hinton agar, 24 hodin (37 °C, aerobně). Červená hranice značí MIC testovaného antibiotika.

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo provést testování citlivosti k vybraným antimikrobiálním látkám za pomoci diskové difúzní metody dle EUCASTu u jednotlivých zástupců izolovaných z vod se zaměřením na výběr izolátů z rodů *Yersinia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Raoultella* a *Serratia*.

Následným krokem, po zjištění citlivosti za pomoci diskové difúzní metody u jednotlivých vzorků, bylo stanovení minimální inhibiční koncentrace dle normy ČSN EN ISO 20776-1 u vzorků rezistentních na příslušné antibiotikum.

Finálním krokem bylo kritické zhodnocení získaných výsledků v porovnání s již publikovanými pracemi.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a laboratorní pomůcky

Přístroje:

Analytické váhy KERN 440 – 4 (KERN, Německo)

Denzitometr DEN – 1 (Biosan, Litva)

Vortex V1 (Biosan, USA)

Autokláv PS 20A (BMT Medical Technology s.r.o., Česká republika)

Chladnička (Liebherr, Německo)

Sterimat 5104.2 (BMT Medical Technology s.r.o., Česká republika)

Termostat Lovibond (TINTOMETER – LOVIBOND, Česká republika)

BACMED (ASPIAG s.r.o., Česká republika)

Spektrofotometr TECAN Infine M 200 (Tecan Trading AG, Švýcarsko)

Horkovzdušný sterilizátor Sterimat 5104 (BMT Medical Technology s.r.o., Česká republika)

Laboratorní pomůcky:

Erlenmayerova baňky 250 ml, 500 ml (Fischer Scientific, spol. s.r.o., Česká republika)

Skleněné lahve se šroubovacím uzávěrem 250 ml (Fischer Scientific, spol. s.r.o., Česká republika)

Skleněné lahve se šroubovacím uzávěrem 500 ml (Fischer Scientific, spol. s.r.o., Česká republika)

Plastové zkumavky 15 ml (MEUS, Itálie)

Skleněné zkumavky, kovová víčka, stojany na zkumavky, Petriho misky (plastové, skleněné), jednokanálové mikropipety 10–100 μ l, 20–200 μ l, 100–1000 μ l, 500–5000 μ l, plastové

špičky, L – hokejky (skleněné, plastové), pinzety, kahan, očkovací kličky, sterilní vatové tamponky, raznice na antibiotika, černá podložka, jednorázové sterilní inokulační kličky, plastové mikrotitrační destičky.

3.2 Materiál

3.2.1 Kultivační půdy a bujóny

- **Masopeptonový agar č. 2 (MPA), HiMedia**

<i>Složení:</i>	masový pepton	10 g
	hovězí extrakt	10 g
	chlorid sodný	5 g
	agar	15 g

Příprava: Dle pokynů výrobce bylo naváženo 40,0 g dehydratovaného média do 1000 ml destilované vody. Následně byla směs sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Výsledné pH při 25 °C bylo $7,2 \pm 0,2$.

- **Mueller Hinton agar (MH), HiMedia**

<i>Složení:</i>	hovězí masová infuse (sušina)	2 g
	kyselý hydrolyzát kaseinu	17,5 g
	škrob	1,5 g
	agar	17 g

Příprava: Dle pokynů výrobce bylo naváženo 38,0 g dehydratovaného média do 1000 ml destilované vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Výsledné pH při 25 °C bylo $7,3 \pm 0,1$.

- **Mueller Hinton bujón, HiMedia**

<i>Složení:</i>	hovězí masová infuze (sušina)	2 g
	kyselý hydrolyzát kaseinu	17,5 g
	škrob	1,5 g

Příprava: Dle pokynů výrobce bylo naváženo 21 g dehydratovaného bujónu do 1000 ml destilované vody a zahříváno do úplného rozpuštění. Sterilizace v autoklávu proběhla při 121 °C po dobu 15 minut. Výsledné pH při 25 °C bylo $7,4 \pm 0,2$.

- **Luria – Bertani bujón, HiMedia**

<i>Složení:</i>	enzymový hydrolyzát kaseinu	10 g
	kvasničný extrakt	5 g
	chlorid sodný	10 g

Příprava: Dle pokynů výrobce bylo naváženo 25 g dehydratovaného bujónu do 1000 ml destilované vody a zahříváno do úplného rozpuštění. Sterilizace v autoklávu proběhla při 121 °C po dobu 15 minut. Výsledné pH při 25 °C bylo $7,5 \pm 0,2$.

3.2.2 Pracovní roztoky, reagentie a chemické látky

- **Fyziologický roztok**

<i>Složení:</i>	chlorid sodný	8,5 g
	destilovaná voda	1000 ml

Příprava: Chlorid sodný byl rozpuštěn v 1000 ml destilované vody a poté byl sterilizován při teplotě 121 °C po dobu 15 min.

- **Ampicilin** A 9393-25g, Sigma – Aldrich (Steinheim, Německo), $M=349,40$ g/mol

- **Sterilní destilovaná voda**

Tabulka 4 McFarlandova zákalová stupnice (upraveno podle Dalynn biologicals, 2014, [cit. 2019-04-22])

1x10⁸ CFU/mL	1%BaCl₂	1%H₂SO₄ (ml)	Výsledný stupeň zákalu
1,5	0,05	9,95	0,5
3	0,1	9,9	1
6	0,2	9,8	2
9	0,3	9,7	3
12	0,4	9,6	4
15	0,5	9,5	5

3.2.3 Bakteriální kmeny

Pro stanovení citlivosti na antibiotika byly použity kmeny izolované především ze vzorků odpadních vod. Jednalo se o vzorky nátoků a odtoků do ČOV. Kmen *Yersinia (Y.) intermedia* byl získán z povrchové vody odebrané z Labe. Všechny vzorky byly odebírány v období let 2016 až 2018.

Uchování kmenů bylo provedeno zaočkováním do bujónu Luria-Bertani (LB) a po následné inkubaci 48 hodin při 37 °C (příp. 30 °C) byly kmeny zmrazeny kapalným dusíkem a uchovány při teplotě –80°C.

Pro analýzu testování citlivostí na antibiotika byly zamražené vzorky vyočkovány na masopeptonový agar (MPA) a inkubovány 24 hodin při optimální teplotě. Seznam testovaných kmenů je uveden v tabulce 5.

Tabulka 5 Seznam testovaných kmenů

MIKROORGANISMUS	POČET TESTOVANÝCH KMENŮ ZÍSKANÝCH Z VOD
<i>Escherichia coli</i>	17
<i>Salmonella</i> Enteritidis	8
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4
<i>Yersinia intermedia</i>	1
<i>Serratia marcescens</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
<i>Enterococcus faecalis</i>	9

Pro validaci metod byly použity sbírkové kmeny *Escherichia coli* ATCC 25922 (dostupný v České sbírce mikroorganismů pod označením *Escherichia coli* CCM 3954), pro *Pseudomonas* kmen *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955) a pro zástupce *Enterococcus*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (*Enterococcus faecalis* CCM 4224). Pro analýzu byly vzorky vyočkovány na půdu MPA a inkubovány 24 hodin při optimální teplotě. Kmeny byly uchovávány při chladničkové teplotě 2 – 8°C.

3.2.4 Antimikrobiální látky

K testování citlivosti bakterií diskovou difúzní metodou bylo použito celkem 28 různých antibiotických disků firmy OXOID CZ, s. r. o., které jsou uvedeny v souhrnné tabulce 6.

Používané disky se uchovávají v temnu při teplotě 4 až 8 °C. Aby při aplikaci nedocházelo ke kondenzaci vody, je doporučeno disky před aplikací ponechat při pokojové teplotě. Pro správnou účinnost antibiotických disků je nutné dodržet daná pravidla. Očkování inokula se provádí do 15 minut od přípravy. Disky se kladou do 15 minut po inokulaci ploten. Do 15 minut po aplikaci disků je třeba plotny začít inkubovat (EUCAST, 2015).

Tabulka 6 Testovaná antibiotika

ANTIBIOTIKUM	OBSAH DISKU (µg)	ZKRATKA	EXPIRACE	ŠARŽE
Amikacin	30	AMK 30	2021/06/20	2354812
Amoxicilin – klavulanová kyselina	20–10	AMC 20–10	2021/06/11	2351604
			2020/01/24	1996605
Ampicilin	2	AMP 2	2020/02	1995667
Ampicilin	10	AMP 10	2021/05/21	2341239
			2019/12/28	1984004
Aztreonam	30	ATM30	2021/07/30	2375546
Cefadroxil	30	CFR 30	2021/05	2325033
Cefepim	30	FEP 30	2021/06/26	2358427
			2020/01/19	1992829
Cefotaxim	5	CTX 5	2020/07	2358439
Cefoxitin	30	FOX 30	2021/07/01	2369778
			2020/01/03	1984557
Ceftazidim	10	CAZ 10	2019/02	2105243
Cefuroxim	30	CXM 30	2021/06/25	2358425
Ciprofloxacin	5	CIP 5	2021/07/16	2369724
			2020/01/16	1992429
Doripenem	10	DOR 10	2019/06	2351749
Doxycyclin	30	DOX 30	2021/06/27	2359179
			2019/12/15	1977868
Gentamicin	10	GEN 10	2021/06/21	2360912
Chloramfenikol	30	CHL 30	2021/07/05	2361510
Imipenem	10	IPM 10	2021/08	2353259
			2019/06/04	2353259
Levofloxacin	5	LEV 5	2021/07/31	2375557
Linezolid	10	LZD 10	2018/12	1972376
Meropenem	10	MEM 10	2019/07/17	2371941
Netilmicin	10	NET 10	2021/08	2371854
Nitrofurantoin	100	FUR 100	2020/02	2108267
Ofloxacin	5	OFX 5	2021/05/08	2332590
Piperacilin	30	PRL 30	2019/12	1958983
Piperacilin – tazobaktam	30–6	TZP 30–6	2021/07	2361502
			2020/02	107472
Sulfamethoxazol – trimetoprim	25	SXT 25	2019/12/15	1977868
			2021/06/27	2359179
Tigecyclin	15	TGC 15	2019/06/05	2348532
Tobramycin	10	TOB 10	2021/06/13	2351615

3.3 Pracovní postup

3.3.1 Testování citlivosti bakterií na antibiotika diskovou difúzní metodou

Testování citlivosti bakterií na antibiotika bylo provedeno dle pokynů EUCASTu. Z vybraných testovaných kmenů byl z 24 hodinové kultury připraven zákal inokula ve fyziologickém roztoku odpovídající hodnotě 0,5 McFarlandovy stupnice. Pro měření hodnoty zákalu byl použit denzitometr či vytvořená McFarlandova zákalová stupnice. Suspenze byla promíchána na vortexu a poté byl ponořen sterilní bavlněný tampon a dle metodiky EUCASTu přebytek tohoto fyziologického roztoku s inokulem oťřen o stěnu zkumavky. Sterilním bavlněným tamponem byl vzorek nanesen rovnoměrně na předem připravenou Petriho misku s MH agarem o tloušťce $4 \pm 0,5$ mm ve třech směrech tak, aby byla pokryta celá plocha Petriho misky. V daném intervalu byly nanесeny zvolené antibiotické disky za pomoci antibiotické raznice. Převrácené Petriho misky byly inkubovány po dobu 16 až 20 hodin při teplotě 35 ± 1 °C. Antibiotické disky, MH agar a fyziologický roztok byly před použitím vytemperovány na laboratorní teplotu, aby nedošlo k ovlivnění výsledků testování. Po inkubaci byly inhibiční zóny odečteny za pomoci pravítka a tmavého pozadí či s využitím systému BACMED a zaznamenány do tabulek.

Testování bylo nutné provést u každého vzorku v sérii opakování a to vždy 3x v dupletu, aby byl výsledek vzorku potvrzen a následně mohl být interpretován a porovnán s klinickými breakpointy. Nutností bylo provedení stejné metodiky u kontrolních sbírkových kmenů *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 pro validaci metody.

3.3.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace dle ČSN EN ISO 20776-1

Při stanovení minimální inhibiční koncentrace se vycházelo z normy ČSN EN ISO 20776-1. Pro tuto metodu byl připraven základní roztok ampicilinu o minimální koncentraci 1000 mg/l navážením vhodného množství ampicilinu a doplněním 0,1M fosfátového pufru o pH 8, který sloužil jako rozpouštědlo. Dané koncentrace zásobního roztoku antimikrobiálního činidla byly připraveny ředěním daného množství základního roztoku antibiotika roztokem 0,1M fosfátového pufru o pH 6. Takto připravené koncentrace byly smíchány s určitým objemem bujónu (tab. 7). Získaná koncentrace antimikrobiálního činidla v mg/l byla pipetována po 100 µl do připravených mikrotitračních destiček. Do každé

jamky bylo posléze pipetováno 50 µl bakteriální suspenze o zákalu 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice, která byla předem ředěna v poměru 0,1 ml zákalu a 9,9 ml bujónu. Pro každý zkoušený kmen je nutné provést kontrolu růstu ponecháním jedné jamky obsahující 100 µl média MH bujónu bez antimikrobiálního činidla. Rovněž pro každý kmen by měla být zařazena jedna jamka se 100 µl média bez antimikrobiálního činidla jako nenaočkovaná negativní kontrola. V dalším kroku byly změřeny hodnoty absorbance jamek pomocí přístroje TECAN. Po inkubaci 18 ± 2 h v běžné atmosféře při teplotě 34°C až 37°C byly opětovně hodnoty proměřeny pro potvrzení vzniklých zákalů a jednotlivé jamky byly vyočkovány na MH agar. Celé testování bylo nutné provést u každého vzorku v sérii opakování a to vždy 3x v dupletu aby byl výsledek vzorku potvrzen a následně mohl být interpretován a porovnán s klinickými hodnotami. Nutností bylo provedení stejné metodiky u kontrolních sbírkových kmenů *Escherichia coli* ATCC 25922 a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 pro validaci metody.

Aby bylo potvrzeno, že zkušební jamky obsahují přibližně 5×10^5 CFU/ml, bylo nutno provést počítání životaschopných buněk odebráním 10 µl z jamky určené pro kontrolu růstu bezprostředně po její inokulaci a zředěním v 10 ml bujónu nebo fyziologického roztoku. 100 µl bylo aplikováno na povrch agarové plotny MH a 24 hodin inkubováno. Norma určuje výsledek 20 až 80 kolonií.

Tabulka 7 Příprava pracovních roztoků antimikrobiálních činidel k použití pro bujónové ředění při zkouškách citlivosti (upraveno podle ČSN EN ISO 20776-1, 2007)

Koncentrace zásobního roztoku antimikrobiálního činidla (mg/l)	Objem zásobního roztoku (ml)	Objem bujónu (ml)	Získaná koncentrace antimikrobiálního činidla (mg/l)
512	1	1	256
512	1	3	128
512	1	7	64
64	1	1	32
64	1	3	16
64	1	7	8
8	1	1	4
8	1	3	2
8	1	7	1
1	1	1	0,5

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Testování citlivosti bakterií na antibiotika

První část diplomové práce spočívala v provedení testování citlivosti vybraných bakterií na antimikrobiální látky. K analýze citlivosti bylo vybráno dohromady 57 bakteriálních kmenů izolovaných z vod se zaměřením na výběr patogenních a podmíněně patogenních bakterií, které mohou způsobit onemocnění postihující převážně gastrointestinální trakt.

Velkou testovanou skupinou izolátů byla čeleď *Enterobacteriaceae*. Zahrnuto bylo 8 kmenů *S. Enteritidis*, 4 kmeny *Y. enterocolitica*, kmen *Y. intermedia* a kmen *Serratia marcescens*. Dále se jednalo o rod *Klebsiella*, kde byly testovány 3 izoláty identifikované jako *Kl. oxytoca* a v dalších 3 případech se jednalo o zástupce *Kl. pneumoniae*. *Raoultella*, velice blízká při identifikaci s rodem *Klebsiella*, byla testována ve 3 případech. Nejpočetněji zastoupeným kmenem s celkovým počtem 17 testovaných vzorků byla bakterie *E. coli*.

Čeleď *Pseudomonadaceae* zahrnovala celkem 8 kmenů *Ps. aeruginosa*. Analyzováno bylo celkem 7 kmenů získaných z odpaních vod a 1 vzorek z lidské chronické rány, který se jevil jako zajímavý izolát z pohledu rezistence.

Testování citlivosti k vybraným antimikrobiálním látkám proběhlo též u 9 vzorků kmene *Enterococcus (En.) faecalis* patřící do rodu *Enterococcus*.

K testování bylo vybráno dohromady 28 antimikrobiálních látek, které byly zvoleny na základě poznatků o antibiotických řadách sestavených dle nemocnice Litomyšl, informací z odborných zahraničních článků či na základě doporučení EUCASTu.

Přístroj Bacmed nebyl z časové náročnosti využit k měření inhibičních zón skrz velké množství Petriho misek a nutného manuálního nastavení velikosti překrývajících se zón, které systém nerozpozná. Proto byla zvolena metodika za pomoci měření pravítkem, jejíž výhodou je ušetřený čas oproti měření za pomoci přístroje Bacmed. Nevýhodou je, že výsledky mohou být zatížené chybou, která by ale po provedené analýze 3x v dupletu měla být minimální.

Tabulka 8 Rozmezí inhibičních zón dle EUCASTu pro dané antibiotikum u referenčních kmenů (EUCAST, 2018c, [cit. 2019- 02-15])

	KONTROLNÍ KMEN	ANTIBIOTIKUM	ROZMEZÍ DLE EUCASTu (mm)
	ENTEROBACTERIACEAE	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 citlivý, divoký typ	Gentamicin 10
Amikacin 30			19 – 26
Aztreonam 30			28 – 36
Imipenem 10			26 – 32
Ceftazidim 10			23 – 29
Piperacilin 30			21 – 27
Amoxicilin – klavulanová kyselina 20–10			18 – 24
Ampicilin 10			15 – 22
Ciprofloxacin 5			29 – 37
Chloramfenikol 30			21 – 27
Cefotaxim 5			25 – 31
Cefepim 30			31 – 37
Cefuroxim 30			20 – 26
Sulfamethoxazol – trimetoprim 25			23 – 29
Doxycyclin 30			/
Cefadroxil 30			14 – 20
Cefoxitin 30			23 – 29
Piperacilin – tazobaktam 30–6			21 – 27
Tobramycin 10			18 – 26
Ofloxacin 5	29 – 33		
Netilmicin 10	18 – 24		
PSEUDOMONAS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 citlivý, divoký typ	Gentamicin 10	17 – 23
		Amikacin 30	18 – 26
		Aztreonam 30	23 – 29
		Imipenem 10	20 – 28
		Ceftazidim 10	21 – 27
		Piperacilin 30	/
		Meropenem 10	27 – 33
		Ciprofloxacin 5	25 – 33
		Tobramycin 10	20 – 26
		Netilmicin 10	15 – 21
		Levofloxacin 5	19 – 26
		Doripenem 10	28 – 35
		ENTEROCOCCUS	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 citlivý, divoký typ
Nitrofurantoin 100	18 – 24		
Linezolid 10	19 – 25		
Tigecyclin 15	20 – 26		
Ciprofloxacin 5	19 – 25		
Imipenem 10	24 – 30		
Ampicilin 2	15 – 21		

Vysvětlivky: / hodnota není uvedena

Nutné pro ověření správnosti testování je využití kontrolních referenčních kmenů. Pro kontrolu kvality byly použity 3 bakteriální kontrolní kmeny dané EUCASTem, které byly zvoleny tak, aby postihovaly vybrané testované bakterie. Pro *Enterobacteriaceae* byl zvolen testovací kmen *Escherichia coli* ATCC 25922 (dostupný v České sbírce mikroorganismů pod označením *Escherichia coli* CCM 3954), pro *Pseudomonas* kmen *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955) a pro zástupce *Enterococcus*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (*Enterococcus faecalis* CCM 4224).

Vybraná testovaná antibiotika u referenčních kmenů byla shodná s antibiotiky pro testované izoláty. Antibiotika pro testované izoláty byla zvolena tak, aby bylo postihnuto co nejširší spektrum antimikrobiálních skupin.

Hodnota inhibiční zóny pro dané antibiotikum u referenčního kmene se musí shodovat s rozmezím daným EUCASTem uvedené v tabulce 8. Pokud by například inhibiční zóna testovaného kmene *Escherichia coli* ATCC 25922 pro gentamicin (10 µg) odpovídala hodnotě více jak 26 mm nebo naopak méně jak 19 mm, nemohly by být výsledky testovaných kmenů pro gentamicin (10 µg) hodnoceny jako validní. V našem případě se všechny změřené inhibiční zóny po provedení testování kontrol vyskytovaly v daných mezích určených EUCASTem. Z tohoto výsledku lze vyvodit spolehlivost výsledků testování citlivosti daných antibiotik u vybraných vzorků.

4.1.1 Stanovení citlivosti na antibiotika u čeledi *Enterobacteriaceae*

U čeledi *Enterobacteriaceae* bylo pro testování použito 21 antibiotických disků. Jednalo se o gentamycin (10 µg), amikacin (30 µg), aztreonam (30 µg), imipenem (10 µg), ceftazidim (10 µg), piperacilin (30 µg), amoxicilin – klavulanovou kyselinu (20–10 µg), ampicilin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), chloramfenikol (30 µg), cefotaxim (5 µg), cefepim (30 µg), cefuroxim (30 µg), sulfamethoxazol – trimetoprim (25 µg), doxycyclin (30 µg), cefadroxil (30 µg), cefoxitin (30 µg), piperacilin – tazobaktam (30–6 µg), tobramycin (10 µg), ofloxacin (5 µg) a netilmycin (10 µg). Breakpointy průměrů inhibičních zón jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9 Breakpointy průměrů inhibičních zón u čeledi *Enterobacteriaceae* (EUCAST, 2018a, [cit. 2019- 02-15])

ENTEROBACTERIACEAE		
ANTIBIOTIKUM (μg)	Breakpointy průměru inhibičních zón (mm)	
	C ≥	R <
Gentamicin 10	17	14
Amikacin 30	18	15
Aztreonam 30	26	21
Imipenem 10	22	16
Ceftazidim 10	22	19
Piperacilin 30	20	17
Amoxicilin – klavulanová kyselina 20–10	19	19
Ampicilin 10	14	14
Ciprofloxacin 5	26	24
Chloramfenikol 30	17	17
Cefotaxim 5	20	17
Cefepim 30	27	21
Cefuroxim 30	19	19
Sulfamethoxazol – trimetoprim 25	14	11
Doxycyclin 30	14	10
Cefadroxil 30	19	19
Cefoxitin 30	19	19
Piperacilin – tazobaktam 30–6	20	17
Tobramycin 10	17	14
Ofloxacin 5	24	22
Netilmicin 10	15	12

Vysvětlivky: C Citlivý
R Rezistentní

4.1.1.1 Stanovení citlivosti na antibiotika u vybraných izolátů *Escherichia coli*

Tabulka 10 shrnuje výsledky testování citlivosti na vybraná antibiotika pro *Escherichia coli*. U testovaných kmenů bakterie *E. coli* byly ve velké míře nalezeny rezistence na cefadroxil. Rezistence se vyskytovala u 15 z celkového počtu 17 izolovaných kmenů. Pouze u jednoho kmene byla potvrzena citlivost, u zbývajících kmenů intermediální rezistence.

Rezistenci na cefadroxil potvrzuje i studie 128 vzorků *E. coli* izolovaných z odpadních vod shromážděných z mlékárenských a hospodářských farem. Na cefadroxil bylo dle výsledků rezistentních 39,0 % testovaných izolátů (Goud *et al.*, 2017).

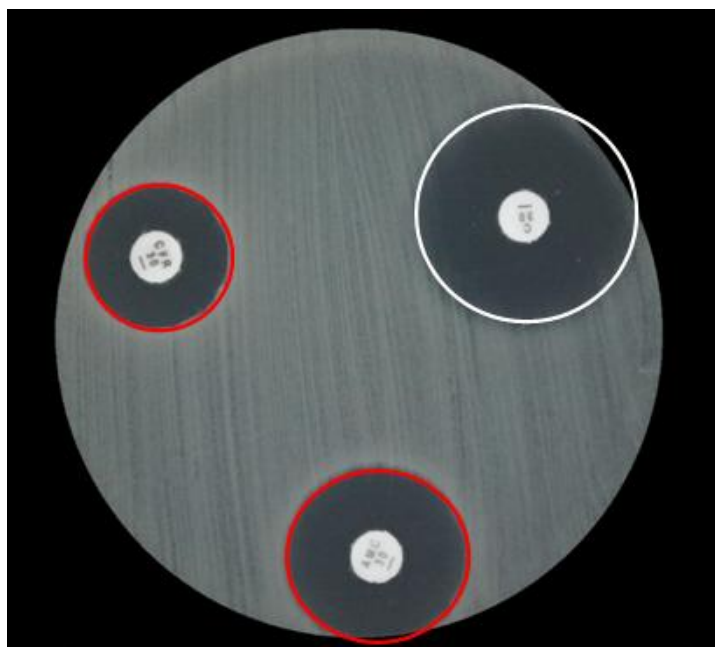
Tabulka 10 Výsledky testování citlivosti na antibiotika pro *Escherichia coli*

ANTIBIOTIKUM (μg)	ENTEROBACTERACEAE																
	<i>Escherichia coli</i>																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Gentamicin 10	C	C	C	C/I	I	C	C/I	C	C/I	C	R	C	C	C	C	C	C/I
Amikacin 30	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C/I	C	C	C	C	C
Aztreonam 30	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C
Imipenem 10	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Ceftazidim 10	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Piperacilin 30	C	C	C	C	C	C	C/I	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Amoxicilin – klavulanová kyselina 20–10	C	C	R	C/I	C	C	R	R	R	C	C	C/I	C	C	C	C	C
Ampicilin 10	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	C	R	C	C	C
Ciprofloxacin 5	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Chloramfenikol 30	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Cefotaxim 5	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Cefepim 30	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Cefuroxim 30	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Sulfamethoxazol – trimetoprim 25	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C
Doxycyclin 30	C	R	C	C	C	C	C	I	C	C	R	C	C	C	C	C	C
Cefadroxil 30	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefoxitin 30	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Piperacilin – tazobaktam 30–6	C	C	C	C	C	C	C	I	C	C	C	C	C	C	C	C	C

Vysvětlivky: C Citlivý
R Rezistentní (červené označení)
I Intermediálně rezistentní (žluté označení)
C / I Hraniční hodnota mezi citlivým a intermediálně rezistentním (modré označení)

Escherichia coli (1–17) označení různých izolátů získaných z odpadních vod

Kumar *et al.* (2013) uvádí rezistenci na cefadroxil a to dokonce u 88,9 % případů, což odpovídá 64 izolátům z celkového počtu 72 testovaných izolátů pocházejících z rekreačních zdrojů a zdrojů pitné vody. Al-Aali (2016) stanovil u 12 vzorků izolovaných z pacientů u 100 % případů citlivost na imipenem a cefepim, což se shoduje i s našimi výsledky. Goud *et al.* (2017) u více jak poloviny testovaných kmenů (57,81 %) našel rezistenci na chloramfenikol. Naopak všechny kmeny *E. coli* v rámci naší práce byly vůči chloramfenikolu citlivé. Citlivost na chloramfenikol (bílé označení) a rezistenci na cefadroxil (červené označení) znázorňuje obrázek 6. Dále byla u tohoto izolátu kmene *E. coli* zjištěna rezistence na amoxicilin – klavulanovou kyselinu.



Obrázek 6 Testování citlivosti *Escherichia coli* na vybraná antibiotika (foto autor).

Mueller – Hinton agar, 16-20hodin (35 ± 1 °C, aerobně). Rezistence (červené označení) na amoxicilin – klavulanovou kyselinu 30 μ g (AMC 30) a cefadroxil 30 μ g (CFR 30), citlivost (bílé označení) na chloramfenikol 30 μ g (CHL 30)

4.1.1.2 Stanovení citlivosti na antibiotika u vybraných izolátů *Salmonella Enteritidis*

Z celkem 8 testovaných kmenů *Salmonella enterica* serovar Enteritidis vykazovaly některé kmeny vůči gentamycinu a tobramycinu intermediální rezistence a hraniční hodnoty mezi citlivostí a intermediální rezistencí vyznačené v tabulce 11. Naopak dle studie Soomro *et al.* (2010) bylo všech 16 testovaných izolátů citlivých vůči těmto dvěma antibiotikům.

Kovačič *et al.* (2017) poukazuje na situaci, kdy byl během září roku 2014 uzavřen systém zásobování vodou v okrese Šibenik. Mikrobiologická analýza vzorků stolice potvrdila *S. Enteritidis* u všech 68 infikovaných lidí. Kontaminace byla zároveň potvrzena i ve vzorcích vody. Všechny izoláty byly citlivé na ampicilin – klavulanovou kyselinu (Kovačič *et al.*, 2017). Tato citlivost je shodná s testovanými kmeny v naší práci.

Zhou *et al.* (2018) uvádí, že z celkového počtu 146 izolátů *S. Enteritidis* získaných z kuřecích výrobků vykazovalo 50,7 % rezistenci na ampicilin. Námí získané izoláty z odpadních vod tento výsledek naopak nepotvrzují.

Tabulka 11 Výsledky testování citlivosti na antibiotika pro *Salmonella* Enteritidis

ANTIBIOTIKUM (μg)	ENTEROBACTERIACEAE							
	<i>Salmonella</i> Enteritidis							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Gentamicin 10		I	C	C	C	I	C/I	
Amikacin 30	C	C	C	C	C	C	C	C
Aztreonam 30	C	C	C	C	C	C	C	C
Imipenem 10	C	C	C	C	C	C	C	C
Tobramycin 10	C/I	C	C	C	C	I	C/I	C/I
Ofloxacin 5	C	C	C	C	C	C	C	C
Amoxicilin – klavulanová kyselina 20–10	C	C	C	C	C	C	C	C
Ampicilin 10	C	C	C	C	C	C	C	C
Ciprofloxacin 5	C	C	C	C	C	C	C	C
Netilmicin 10	C	C	C	C	C	C	C	C
Cefotaxim 5	C	C	C	C	C	C	C	C
Cefepim 30	C	C	C	C	C	C	C	C
Cefuroxim 30	C	C	C	C	C	C	C	C
Sulfamethoxazo – trimetoprim 25	C	C	C	C	C	C	C	C
Doxycyclin 30	C	C	C	C	C	C	C	C
Cefadroxil 30	C	C	C	C	C	C	C	C
Cefoxitin 30	C	C	C	C	C	C	C	C
Piperacilin – tazobaktam 30–6	C	C	C	C	C	C	C	C

Vysvětlivky:

C Citlivý

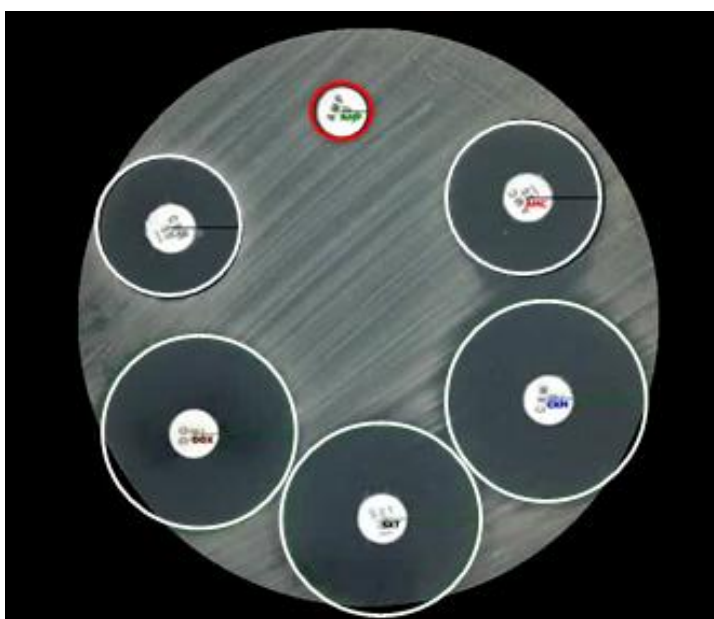
I Intermediálně rezistentní (žluté označení)

C / I Hraniční hodnota mezi citlivým a intermediálně rezistentním (modré označení)

Salmonella Enteritidis (1–8) označení různých izolátů z odpadních vod

4.1.1.3 Stanovení citlivosti na antibiotika u vybraných izolátů *Yersinia enterocolitica* a *Yersinia intermedia*

Kmeny *Yersinia* byly testovány na citlivost s využitím analogických antibiotických disků jako izoláty *Salmonella* serovar Enteritidis. Testováním byly pouze u dvou izolátů *Y. enterocolitica* zjištěny rezistence. Jednalo se o případy disků napuštěných ampicilinem. Výsledky jednoho z testovaných izolátů *Yersinia enterocolitica* rezistentních na ampicilin (červené označení) znázorňuje obrázek 7. Na ostatní testovaná antibiotika byl izolát citlivý. Testovaný kmen *Yersinia intermedia* vykazoval vůči všem testovaným antibiotikům citlivost.



Obrázek 7 Testování citlivosti *Yersinia enterocolitica* na vybraná antibiotika (foto autor)

Vyhodnocené pomocí systému BACMED. Mueller – Hinton agar, 16-20hodin (35 ± 1 °C, aerobně). Rezistence (červené označení) na ampicilin 10 µg (AMP 10), citlivost (bílé označení) na amoxicilin – klavulanovou kyselinu 20–10 µg (AMC 20–10), cefuroxim 30 µg (CXM 30), sulfamethoxazol – trimetoprim 25 µg (SXT 25), doxycyklin 30 µg (DOX 30), cefadroxil 30 (CFR µg)

Rezistence na ampicilin je shodná s izolátem *Y. enterocolitica* ze studie autorů Anju *et al.* (2014), která kromě ampicilinu potvrzuje rezistenci k tetracyklinu. Citlivost u gentamicinu analyzovaná studií byla totožná s naší analýzou.

4.1.1.4 Stanovení citlivosti na antibiotika u vybraného izolátu *Serratia marcescens*

Zajímavým izolátem z pohledu rezistence byla *Serratia marcescens*, u které byla prokázána odolnost hned u 5 testovaných antibiotik. Jednalo se o amoxicilin – klavulanovou kyselinu, ampicilin, cefuroxim, doxycyclin a cefadroxil (tab. 12).

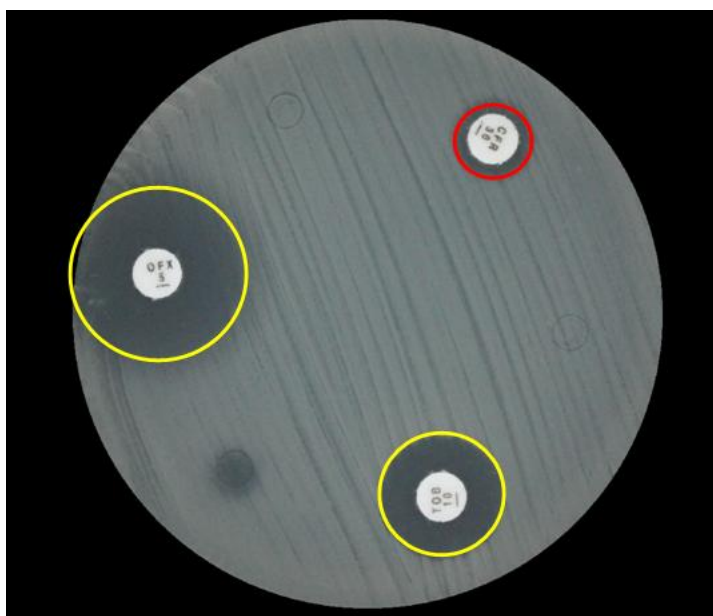
Tabulka 12 Výsledky testování citlivosti na antibiotika pro *Serratia marcescens*

ANTIBIOTIKUM (μg)	ENTEROBACTERIACEAE
	<i>Serratia marcescens</i>
Gentamicin 10	C
Amikacin 30	C
Aztreonam 30	C
Imipenem 10	C
Tobramycin 10	I
Ofloxacin 5	I
Amoxicilin – klavulanová kyselina 20–10	R
Ampicilin 10	R
Ciprofloxacin 5	C
Netilmicin 10	C
Cefotaxim 5	C / I
Cefepim 30	C
Cefuroxim 30	R
Sulfamethoxazol – trimetoprim 25	C
Doxycyclin 30	R
Cefadroxil 30	R
Cefoxitin 30	C
Piperacilin – tazobaktam 30–6	C / I

Vysvětlivky:	C	Citlivý
	I	Intermediálně rezistentní (žluté označení)
	R	Rezistentní (červené označení)
	C / I	Hraniční hodnota mezi citlivým a intermediálně rezistentním (modré označení)

Jednou z důležitých vlastností patogenních zástupců rodu je jejich vnitřní a získaná odolnost vůči řadě antibiotických skupin. Jedná se o antibiotika z řad beta – laktamas (Sandner -Miranda *et al.*, 2018). Námi získané výsledky byly v souladu s tímto tvrzením, jelikož stanovovaný izolát byl rezistentní na amoxicilin – klavulanovou kyselinu a ampicilin.

Dále u kmene izolovaného z vody byla nalezena intermediální rezistence na tobramycin a ofloxacin, která je společně s rezistencí na cefadroxil vyznačena na obrázku 8.



Obrázek 8 Testování citlivosti *Serratia marcescens* na vybraná antibiotika (foto autor)

Mueller – Hinton agar, 16-20hodin (35 ± 1 °C, aerobně). Rezistence (červené označení) na cefadroxil 30 µg (CFR 30), intermediální rezistence (žluté označení) na tobramycin 10 µg (TOB 10) a ofloxacin 5 µg (OFX 5)

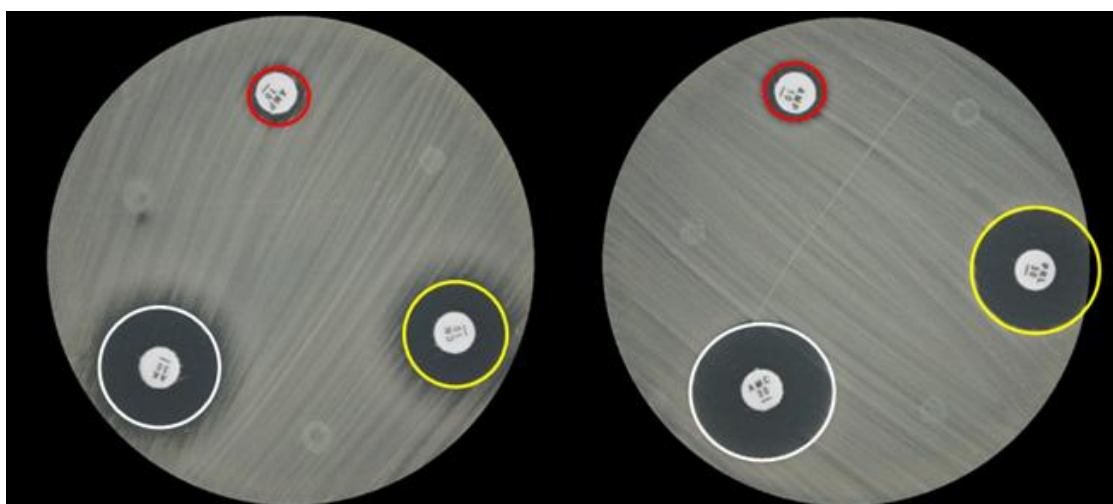
Faidah *et al.* (2015) ve studii uvedl, že u 81 testovaných kmenů se vyskytla odolnost na ampicilin s vysokou mírou a to u 97,5 % izolátů. Al-Aali (2016) uvádí citlivost u 6 izolátů od pacientů z nemocnice na imipenem a cefepim. Námi testovaný kmen vykazoval též citlivost vůči zmíněným antibiotikům cefepimu a imipenemu.

4.1.1.5 Stanovení citlivosti na antibiotika u vybraných izolátů *Klebsiella a Raoultella*

Testování kmenů *Kl. pneumoniae* vykazovalo rezistenci na gentamycin. Dalším zajímavým výsledkem byla intermediální rezistence u antibiotického disku ciprofloxacin.

Intermediální rezistenci vůči ciprofloxacinu a rezistenci vůči gentamycinu dokládá též studie Badamchi *et al.* (2018), kteří otestovali celkem 93 izolátů. Velká většina izolátů byla vůči gentamycinu rezistentní a to celkem 62, naopak pouze 3 izoláty byly hodnoceny jako citlivé. Ciprofloxacin byl vyhodnocen ve 40 případech jako citlivý, 50 izolátů jeví odolnost a pouze 3 izoláty byly dle průměru inhibiční zóny interrezistentní (Badamchi *et al.*, 2018).

Námi prokázanou rezistenci vůči ampicilinu, vyhodnocenou u dvou různých izolátů pocházejících z vod na obrázku 9 (červené označení), potvrzuje i Abbas (2017), který při testování citlivosti antibiotik izolátů *Kl. pneumoniae* odhalil, že penicilinové antibiotikum vykazovalo vyšší míru odolnosti, a to dokonce 57,14 %.



Obrázek 9 Testování citlivosti rodu *Klebsiella* na vybraná antibiotika (foto autor).

Klebsiella pneumoniae (vlevo) a *Klebsiella oxytoca* (vpravo), Mueller – Hinton agar, 16-20 hodin, (35 ± 1 °C, aerobně). Rezistentní (červené označení) na ampicilin 10 µg (AMP 10), intermediálně rezistentní (žluté označení) na ciprofloxacin 5 µg (CIP 5) a gentamicin 10 µg (GEN 10), citlivý (bílé označení) na amikacin 30 µg (AMK 30) a amoxicilin – klavulanovou kyselinu 20–10 µg (AMC 20–10)

Ve výzkumu spojeného s identifikací druhové distribuce rodu *Klebsiella* vyskytující se ve vodním prostředí bylo analyzováno 33 izolátů *Kl. pneumoniae* a 7 izolátů *Kl. oxytoca*. Testováním citlivosti kmenů rodu *Klebsiella* izolovaných z mořské a sladkovodní vody v Jižní Kalifornii bylo zjištěno, že kmen *Kl. pneumoniae* je odolnější než *Kl. oxytoca*. *Kl. pneumoniae* vykazovala u všech 33 izolátů rezistenci na ampicillin, 82 % izolátů bylo odolných vůči nitrofurantoinu, 91 % bylo rezistentních vůči piperacilinu, 20 % odpovídalo rezistenci na sulfametoxazol – trimetoprim a 76 % izolátů vykazovalo rezistenci na amoxicilin – klavulanovou kyselinu. Malý počet, celkem 3 % izolátů bylo rezistentních

vůči amikacinu, ceftazidimu, cefepimu, gentamicinu a ciprofloxacinu. U bakterie *Kl. oxytoca* byla ve všech případech prokázána rezistence na ampicilin. Dále byla stanovena rezistence na piperacilin u 25 % testovaných izolátů (Jacobo, 2012).

Ve výsledcích testování citlivosti na vybraná antibiotika, které shrnuje tabulka 13, si můžeme všimnout podobnosti mezi rody *Klebsiella* a *Raoultella* právě v rezistenci na ampicilin. Dle EUCAST (2016) je rezistence na ampicilin u rodu *Klebsiella* a *Raoultella* hodnocena jako přirozená. Podobnost podporuje původní zařazení *Raoultella ornithinolytica*, bakterie vyskytující se ve vodě, půdě a vodním prostředí, do rodu *Klebsiella* (Fager and Yurteri-Kaplan, 2019).

Tabulka 13 Výsledky testování citlivosti na antibiotika pro rod *Klebsiella* a *Raoultella*

ANTIBIOTIKUM (µg)	ENTEROBACTERIACEAE								
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Klebsiella oxytoca</i>			<i>Raoultella ornithinolytica</i>		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Gentamicin 10	C	C	R	I	C / I	C	C	C	C
Amikacin 30	C	C	I	C	C	C	C	C	C
Aztreonam 30	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Imipenem 10	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Ceftazidim 10	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Piperacilin 30	C / I	C	C	R	C	C	C	C	C
Amoxicilin – klavulanová kyselina 20–10	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Ampicilin 10	R	C	R	C	C	R	R	R	C
Ciprofloxacín 5		C	I	C	C	C	R	C	C
Chloramfenikol 30	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Cefotaxim 5	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Cefepim 30	C	C	C	C	C	C	C	C	C

Vysvětlivky:

- C Citlivý
- I Intermediálně rezistentní (žluté označení)
- R Rezistentní (červené označení)
- C / I Hraniční hodnota mezi citlivým a intermediálně rezistentním (modré označení)

označení různých izolátů z odpadních vod
Klebsiella pneumoniae (1–3)
Klebsiella oxytoca (3–6), *Raoultella ornithinolytica* (7–9)

U jednoho izolátu *Raoultella ornithinolytica* byla námi potvrzena rezistence na ciprofloxacin. Naopak Marietto-Gonçalves *et al.* (2018) ve své studii vyhodnotili citlivost izolátu bakterie *Raoultella ornithinolytica* vůči ciprofloxacinu.

4.1.2 Stanovení citlivosti na antibiotika u čeledi *Pseudomonadaceae*

U čeledi *Pseudomonadaceae* bylo pro testování využito 12 odlišných antibiotických disků. Jednalo se o antibiotickou řadu začleňující gentamycin (10 µg), amikacin (30 µg), aztreonam (30 µg), imipenem (10 µg), ceftazidim (10 µg) a piperacilin (30 µg), která byla shodná s řadou čeledi *Enterobacteriaceae*. Druhá antibiotická řada byla navržena dle poznatků odborných článků a jednalo se o meropenem (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), tobramycin (10 µg), netilmicin (10 µg), levofloxacin (5 µg) a doripenem (10 µg). Výsledky inhibičních zón izolátů *Ps. aeruginosa* byly hodnoceny dle breapointů v tabulce 14.

Tabulka 14 Breakpointy průměrů inhibičních zón u čeledi *Pseudomonadaceae* (EUCAST, 2018a, [cit. 2019- 02-15])

PSEUDOMONAS		
ANTIBIOTIKUM (µg)	Breakpointy průměru inhibičních zón (mm)	
	C ≥	R <
Gentamicin 10	15	15
Amikacin 30	18	15
Aztreonam 30	50	16
Imipenem 10	20	17
Ceftazidim 10	17	17
Piperacilin 30	18	18
Meropenem 10	24	18
Ciprofloxacin 5	26	26
Tobramycin 10	16	16
Netilmicin 10	12	12
Levofloxacin 5	22	22
Doripenem 10	25	22

Vysvětlivky:

C Citlivý
R Rezistentní

4.1.2.1 Stanovení citlivosti na antibiotika u vybraných izolátů *Pseudomonas aeruginosa*

Testování citlivosti vůči antibiotikům u *Ps. aeruginosa* bylo založené na porovnání izolátů získaných z vod a jednoho vzorku z lidské chronické rány. Vzorek z lidské chronické rány vykazoval oproti izolátům z vod vysokou odolnost (tab. 15). Rezistence byla nalezena u 10 z 12 testovaných antibiotik.

Tabulka 15 Výsledky testování citlivosti na antibiotika pro rod *Pseudomonas*

ANTIBIOTIKUM (μg)	PSEUDOMONAS							
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
	1	2	3	4	5	6	7	vzorek rány
Gentamicin 10	C	R	C	C	C	C	C	R
Amikacin 30	C	C / I	C	C	C	C	C	R
Aztreonam 30	I	I	I	I	I	I	I	I
Imipenem 10	C	C	C	C	C	C	C	C
Ceftazidim 10	C	C	C	C	C	C	C	R
Piperacilin 30	C	C	C	C	C	C	C	R
Meropenem 10	C	C	C	C	C	C	C	R
Ciprofloxacin 5	C	C	C	C	C	C	C	R
Tobramycin 10	C	C	C	C	C	C	C	R
Netilmicin 10	C	R	C	C	C	C	C	R
Levofloxacin 5	C	R	C	C	C	R	C	R
Doripenem 10	C	C	C	C	C	C	C	R

Vysvětlivky:

C Citlivý

I Intermediálně rezistentní (žluté označení)

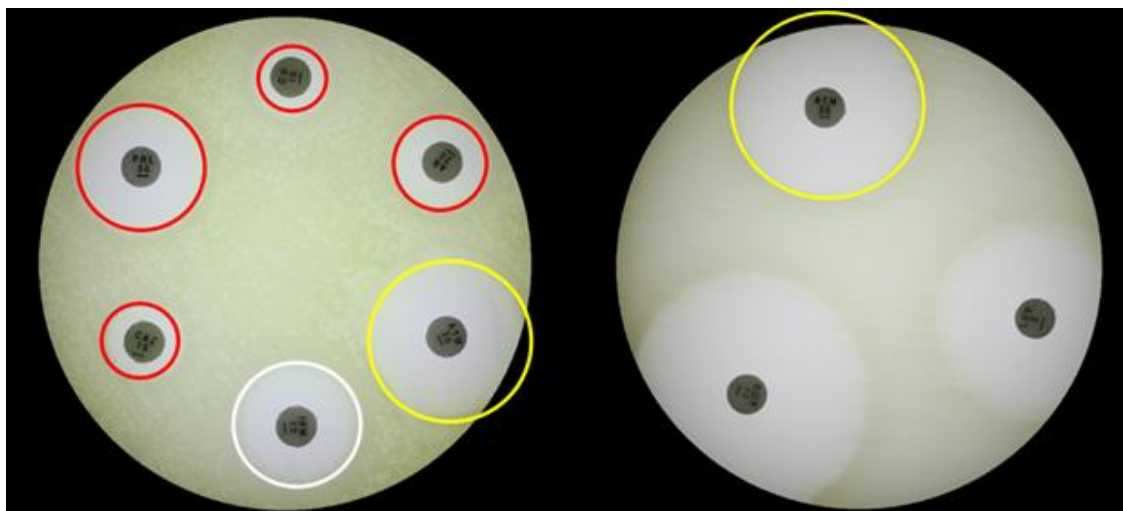
R Rezistentní (červené označení)

C / I Hraniční hodnota mezi citlivým a intermediálně rezistentním (modré označení)

označení různých izolátů z odpadních vod *Pseudomonas aeruginosa* (1–7)

Pseudomonas aeruginosa vzorek z chronické rány (8)

U všech testovaných kmenů byla nalezena intermediální rezistence na aztreonam, která dle EUCASTu odpovídá vysokému rozpětí průměru inhibiční zóny od 16 do 49 mm. Rezistenci první antibiotické řady a intermediální rezistenci na aztreonam můžeme vidět na obrázku 10. Nalezena byla pouze jedna citlivost vůči imipenemu.



Obrázek 10 Testování citlivosti *Pseudomonas aeruginosa* na vybraná antibiotika (foto autor)

Izolát chronické rány (vlevo) a intermediální rezistence izolátu z vod (vpravo). Mueller – Hinton agar, 16-20 hodin (35 ± 1 °C, aerobně). Rezistentní (červené označení) na gentamycin 10 μ g (GEN 10), amikacin 30 μ g (AMK 30), ceftazidim 10 μ g (CAZ 10) a piperacilin 30 μ g (PRL 30), intermediální rezistence (žluté označení) na aztreonam 30 μ g (ATM 30), citlivost (bílé označení) na imipenem 10 μ g (IPM 10)

Vzhledem k tomu, že v Evropě je míra rezistence na fluoroquinolony u *Ps. aeruginosa* vyšší než 30 % (Bassetti *et al.*, 2018), byla rezistence na levofloxacin a ciprofloxacin z řady fluorochinolonů zaznamenána i v naší práci.

Rezistenci na levofloxacin potvrzuje i pětiletá studie 646 izolátů *Ps. aeruginosa* z různých klinických vzorků. Většina izolátů pocházela z respiračních (60,99 %) a močových cest (23,22 %), zatímco nejméně z transudátů a exsudátů (2,01 %). Celkem 26,7 % izolátů bylo rezistentních na levofloxacin. Dále bylo zjištěno, že amikacin byl nejúčinnějším lékem s mírou rezistence 7,5 %, následovaným piperacilin – tazobaktamem (8,5 %) a v 13,5 % gentamicinem (Juayang *et al.*, 2017).

Ps. aeruginosa získaná ze vzorků pitné a rekreační vody shromážděných z různých prostředí a to bazénů, zdravotnických zařízení, ubytovacích zařízení a obecních vodovodů vykazovala rezistenci na imipenem. Přestože je imipenem stále považován za antibiotikum účinné proti

Ps. aeruginosa, výsledky tohoto výzkumu potvrzují trvalé šíření rezistence vůči tomuto antibiotiku. Z celkového počtu 53 izolátů bylo 5 izolátů rezistentních na imipenem. Tento výzkum zdůrazňuje roli porinů jako faktoru přispívající k rezistenci na karbapenem u gramnegativních bakterií (Schiavano *et al.*, 2017). Naopak v naší práci nebyla rezistence vůči imipenemu potvrzena.

Khosravi *et al.* (2017) uvádí vysokou míru antimikrobiální rezistence u 93 klinických izolátů. Zejména se jednalo o rezistenci na gentamicin (94,62 %), ciprofloxacin (93,54 %) a meropenem (90,32 %). Rezistence na tato zmíněna antibiotika potvrzuje i námi provedené testování.

4.1.3 Stanovení citlivosti na antibiotika u čeledi *Enterococcaceae*

Posledním testovaným kmenem vůči citlivosti na antibiotika byl *En. faecalis* patřící do čeledi *Enterococcaceae*. Jelikož ve většině případů nejsou známy breakpointy, byla zvolena pouze jedna řada 6 antibiotických disků. Pro testování byly vybrány nitrofurantoin (100 µg), linezolid (10 µg), tigecyclin (15 µg), ciprofloxacin (5 µg), imipenem (10 µg) a jako poslední ampicilin s obsahem disku 2 µg. Dané související breakpointy zaznamenává tabulka 16.

Tabulka 16 Breakpointy průměrů inhibičních zón u čeledi *Enterococcaceae* (EUCAST,2018a, [cit. 2019- 02-15])

ENTEROCOCCUS		
ANTIBIOTIKUM (µg)	Breakpointy průměru inhibičních zón (mm)	
	C ≥	R <
Nitrofurantoin 100	15	15
Linezolid 10	19	19
Tigecyclin 15	18	15
Ciprofloxacin 5	15	15
Imipenem 10	21	18
Ampicilin 2	10	8

Vysvětlivky:

C Citlivý

R Rezistentní (červené označení)

4.1.3.1 Stanovení citlivosti na antibiotika u vybraných izolátů *Enterococcus faecalis*

Bakterie *Enterococcus faecalis* vykazovala ze všech bakterií nejvyšší míru citlivosti (tab. 17). Celkově byla nalezena rezistence pouze na imipenem a ampicilin. Dle poznatků EUCAST (2016) je *En. faecalis* rezistentní vůči ampicilinu hodnocen jako výjimečný fenotyp. Pravidla odborníků EUCAST shrnující výjimečné fenotypy rezistence a interpretační pravidla, která mohou být použita pro testování antimikrobiální citlivosti, čerpají z poznatků uvedených v roce 2016 (EUCAST, 2019a). Je nutné si ale uvědomit, že to, co se v jednom okamžiku považuje za výjimečný fenotyp, nemusí být v pozdějším okamžiku výjimečné a že to, co se v jedné zeměpisné oblasti považuje za výjimečné, nemusí být výjimečné v jiné. Aktualizovaná verze doposud nebyla zveřejněna (EUCAST, 2018b).

Tabulka 17 Výsledky testování citlivosti na antibiotika pro *Enterococcus faecalis*

ANTIBIOTIKUM (µg)	ENTEROCOCCUS								
	<i>Enterococcus faecalis</i>								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nitrofurantoin 100	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Linezolid 10	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Tigecyclin 15	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Ciprofloxacin 5	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Imipenem 10	C	C	C	C	R	C	C	C	C
Ampicilin 2	C	C	C	C	R	C	C	C	C

Vysvětlivky:

C Citlivý

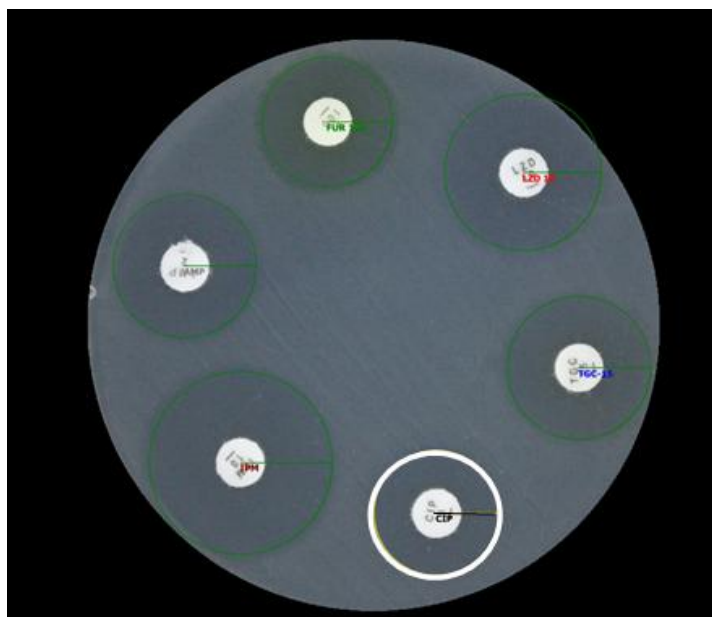
R Rezistentní (červené označení)

Enterococcus faecalis (1–9) označení různých izolátů z odpadních vod

Hodnocení všech 58 izolátů *En. faecalis* v čínské studii Wei *et al.* (2017) prokázalo citlivost na 12 druhů antibiotik, mezi které patřil i námi testovaný ampicilin, ciprofloxacin, nitrofurantoin a linezolid. Vzorky byly odebrány z minerálních a pramenitých vod. Další antibiotika jako penicilin, quinupristin – dalfopristin, vancomycin, gentamicin, streptomycin,

levofloxacin, norfloxacin a tetracyklin citlivé podle studie, nebyly využity při našem testování.

Igbinosa *et al.* (2016) analyzovali profil antimikrobiální rezistence enterokokových izolátů z rybníků. Studie prokázala 45 rezistentních izolátů na ciprofloxacin z celkového počtu 200. Naopak všech 9 námi testovaných kmenů izolovaných z vod vykazovalo na ciprofloxacin citlivost. Citlivost bakterie vůči ciprofloxacinu dokumentuje obrázek 11.



Obrázek 11 Testování citlivosti *Enterococcus faecalis* na vybraná antibiotika (foto autor)

Vyhodnocené pomocí systému BACMED. Mueller – Hinton agar, 16-20 hodin, (35 ± 1 °C, aerobně). Citlivost (bílý označení) na ciprofloxacin 5 μ g (CIP 5)

4.1.4 Vyhodnocení multirezistentních izolátů

Nejdůležitějším problémem kmenů jsou vznikající multirezistence. Obecně lze pojem multirezistence definovat jako necitlivost k nejméně jednomu antibiotiku ze tří a více antimikrobiálních skupin (Alnour and Ahmed-Abakur, 2017).

Z této obecné definice lze proto usuzovat izolát *Ps. aeruginosa* izolovaný z chronické rány jako multirezistentní. Odolnost z pohledu multirezistence byla stanovena hned u 4 antimikrobiálních skupin. Jednalo se o 4 antibiotika z řad aminoglykosidů, 2 zástupce z řad fluorochinolonů a jednoho zástupce cefalosporinů. Poslední vyhodnocenou skupinou byly peniciliny.

Jeden z izolátů *Ps. aeruginosa* získaný z odpadních vod sice vykazoval rezistenci ve třech případech (viz tabulka 15), ale jednalo se o dvě rezistence vůči aminoglykosidům a jednu rezistenci vůči skupině flourochinolonů. Z tohoto důvodu nelze kmen hodnotit jako multirezistentní.

Mezi multirezistentní izoláty můžeme zařadit dva zástupce *E. coli*, které pocházeli ze vzorků vod. Jeden vykazoval rezistenci vůči penicilinovému antibiotiku ampicilinu, cefalosporinu, cefadroxilu a sulfonamidu trimethoprim – sulfometaxozolu. Naopak druhý izolát byl odolný vůči gentamycinu, doxycyklinu a cefadroxilu řazených do skupin aminoglykosidů, tetracyklinů a cefalosporinů.

Serratia marcescens vykazovala multirezistenci na ampicilin a amoxicilin – klavulanovou kyselinu z řad penicilinů, cefuroxim a cefadroxil řazené k cefalosporinům a doxycyklin patří do skupiny tetracyklinů.

Celkem byly tedy pomocí diskové difúze nalezeny 4 multirezistentní bakterie z celkového počtu 57 testovaných izolátů.

4.1.5 Závěrečné vyhodnocení testovaných bakterií na antibiotickou citlivost pomocí diskové difúzní metody

Porovnáním citlivosti všech testovaných kmenů je zřejmé, že největší rezistence byla zaznamenána u cefadroxilu, na který bylo rezistentních 16 kmenů (52 %) z 31 testovaných. Další významná rezistence byla nalezena vůči levofloxacinu u 3 kmenů (37,5 %) z 8 testovaných izolátů. Beta-laktamové antibiotikum ampicilin bylo použito při testování 40 izolátů, z nichž čtvrtina izolátů (25 %)jevila vůči tomuto antibiotiku rezistenci.

Pozorována byla též rezistence na amoxicillin – klavulanovou kyselinu, doripenem a meropenem. Na každé z těchto tří jmenovaných antibiotik bylo rezistentních 12,5 % izolátů. Rezistence ostatních antibiotik dosahovaly hodnot pod 10 %, nebo nebyly nalezeny.

4.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace dle ČSN EN ISO 20776-1

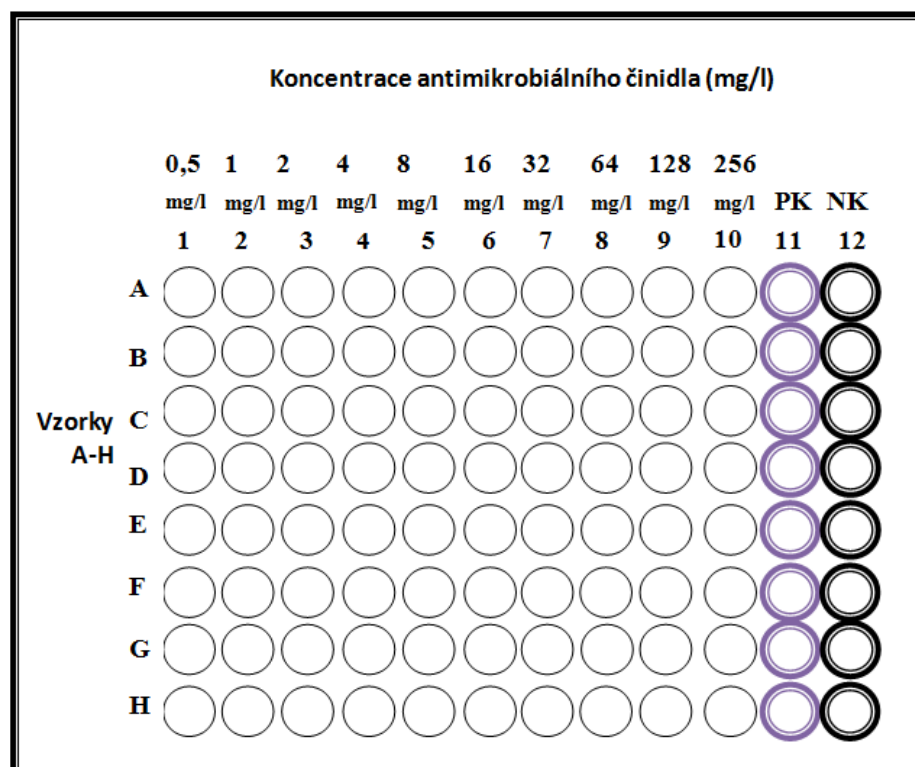
Druhá část diplomové práce navazovala na testování citlivosti vůči antibiotikům pomocí diskové difúzní metody. Bujónová mikrodiluční metoda byla provedena z důvodu potvrzení nebo vyvrácení výsledků rezistencí získaných diskovou difúzní metodou. Důvodem je možné

zatížení diskové difúzní metody chybou nepatrného rozdílu hodnoty bakteriálního zákalu (Özçelik *et al.*, 2004). Porovnáním těchto dvou metod se zabývala i zahraniční studie zahrnující testování 110 izolátů *Yersinia enterocolitica*. Podobné výsledky metod byly stanoveny pro 6 z 10 antimikrobiálních látek. Rozdílných výsledků bylo získáno u ampicilinu (1,8 %), kdy byl zjištěn falešně citlivý diskový difuzní test. Falešně rezistentní diskový difuzní test byl zjištěn u streptomycinu (0,9 %) a sulfamethoxazolu (1,8 %). Multirezistence byla diskovou difúzní metodou prokázána u 3 % případů, naopak při mikrodiluci byla potvrzena pouze v 1%. Diskový difuzní test poskytl nepřijatelné množství chyb pro ampicilin a vysokou četnost drobných chyb pro sulfamethoxazol (Mayer *et al.*, 2011).

Z těchto důvodů byly pro stanovení MIC vybrány bakteriální izoláty vod zahrnující kmeny *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Raoultella ornithinolytica*, *Serratia marcescens*, *Enterococcus faecalis* a *Yersinia enterocolitica* stanovené pomocí diskové difúzní metody jako rezistentní vůči ampicilinu (10 µg).

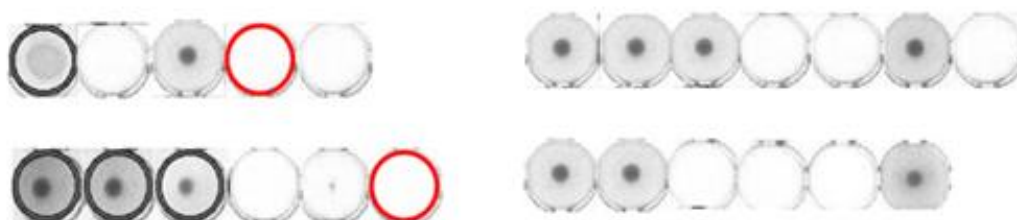
Dle kritérií byla analogicky provedena kontrola správnosti testování s využitím kontrolních kmenů. Pro kontrolu kvality byly použity 2 bakteriální kontrolní kmeny dané EUCASTem. Pro *Enterobacteriaceae* byl zvolen testovací kmen *Escherichia coli* ATCC 25922 (dostupný v České sbírce mikroorganismů pod označením *Escherichia coli* CCM 3954) a pro zástupce *Enterococcus*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (*Enterococcus faecalis* CCM 4224). Hodnota MIC kontrolních kmenů byla shodná s danými breakpointy EUCASTu. Dále byly provedeny pozitivní a negativní kontroly u všech testovaných bakteriálních izolátů. Kritérium hodnocení životaschopných kolonií odpovídalo rozsahu 20 až 80 kolonií.

Obrázek 12 znázorňuje testování MIC (mg/l) na plastové mikrotitrační destičce s 96 jamkami. Na pozicích A až H se nacházely testované bakteriální izoláty ve spojení s různou koncentrací antimikrobiálního činidla ampicilinu, kterou znázorňují pozice 1 až 10. Zbylé dvě pozice označené číslem 11 a 12 obsahovaly pozitivní a negativní kontroly jednotlivých izolátů. S ohledem na dupletové provedení jednotlivých izolátů byly na jedné mikrotitrační destičce s rozsahem deseti různých koncentrací testovány čtyři izoláty odpadních vod.



Obrázek 12 Využití plastové mikrotitrační destičky při testování minimální inhibiční koncentrace (autor)
 Pozitivní kontrola (PK), negativní kontrola (NK)

Odečítání bujónové mikrodiluční metody musí splňovat kritéria dostatečného růstu, hodnoceného jako knoflík na dně jamky nebo jednoznačný zákal v pozitivní kontrole růstu. Růst se projeví zákalem nebo jako usazenina buněk na dně jamky (EUCAST, 2019b). Při provádění testování MIC byl pozorován přeskok dvou a více jamek, obklopených jamkami s nárůstem (obr. 13).



Obrázek 13 Přeskok jamek u testování minimální inhibiční koncentrace (upraveno podle EUCAST, 2019b [cit. 2019- 02-15])

Přeskok jedné jamky (vlevo), přeskok dvou a více jamek (vpravo). Červené označení značí odečtenou minimální inhibiční koncentraci testovaného antibiotika

Příčinou může být dle (EUCAST, 2019b) nesprávná inokulace, kontaminace, či heterogenní rezistence. Možnost kontaminace byla při testování vyvrácena z důvodu

provádění testu 3x v dupletu a nálezu stejného přeskočku u všech 6 případů. Takto vyhodnocené izoláty byly z testování vyřazeny dle doporučení EUCASTu. Při detekci jedné prázdné jamky byl izolát opětovně otestován a hodnocena byla nejvyšší hodnota MIC.

4.2.1 Stanovení minimální inhibiční koncentrace u vybraných izolátů

Výsledky testování izolátů z vod byly odečteny spektrofotometrickým vyhodnocením přístrojem TECAN a vyočkováním jednotlivých koncentrací na MH agar. Hodnoty MIC byly interpretovány v kategoriích citlivosti jako citlivé, interrezistentní nebo rezistentní podle tabulek EUCAST. Výsledky testování minimální inhibiční koncentrace izolátů jsou shrnuty v tabulce 18 společně s výsledky provedených kontrol.

Tabulka 18 Výsledky testování minimální inhibiční koncentrace u vybraných izolátů

Breakpointy MIC (mg/l)		TESTOVANÝ IZOLÁT	MIC (mg/l)	VYHODNOCENÍ
		<i>Escherichia coli</i>	16	R
<i>Enterobacteriaceae</i>		<i>Escherichia coli</i>	2	C
C ≤	R >	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	R
8	8	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	C
Breakpoint MIC (mg/l)		<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	C
		<i>Raoultella ornithinolytica</i>	16	R
		<i>Raoultella ornithinolytica</i>	16	R
<i>Enterococcaceae</i>		<i>Serratia marcescens</i>	16	R
C ≤	R >	<i>Yersinia enterocolitica</i>	128	R
		<i>Yersinia enterocolitica</i>	256	R
4	8	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	C
Breakpoint MIC (mg/l)		ATCC 29212 <i>Enterococcus faecalis</i>	1	✓
ATCC 29212	0,5 – 2			
ATCC 25922	4 – 8	ATCC 25922 <i>Escherichia coli</i>	4	✓

Vysvětlivky:

C Citlivý

R Rezistentní , ✓ Hodnota v rámci daného rozmezí

Výsledky provedeného testování citlivosti u izolátu bakterie *E. coli* z odpadních vod potvrdily rezistenci vůči ampicilinu u jednoho ze dvou testovaných izolátů bujónovou mikrodiluční metodou.

Rezistenci vůči ampicilinu uvádí též studie, která testovala četnost antimikrobiální rezistence pro 201 izolátů *E. coli* pocházejících ze slepého střeva prasat. Vzorky byly odebrány v 19 australských farmách v průběhu července až prosince roku 2015. Vedle dalších 10 antimikrobiálních látek byly izoláty testovány na rezistenci vůči ampicilinu bujónovou mikrodiluční metodou. Rezistence bakterie *E. coli* vůči ampicilinu byla nalezena v 60,2 % případů (Kidsley *et al.*, 2018). Rezistenci vůči ampicilinu u bakteriálních izolátů *E. coli* dále potvrzuje studie různých vzorků surových odpadních vod a ošetřených vod UV zářením či chlorací pocházejících z ČOV odebraných v období od ledna do května roku 2016. Celkem bylo testováno 92 izolátů. Analýza MIC ukázala, že rezistence na ampicilin byla zaznamenána u 85 % testovaných izolátů (Aslan *et al.*, 2018).

Dalším testovaným rezistentním zástupcem vůči ampicilinu v naší práci byla bakterie *Klebsiella pneumoniae*. Výsledek námi prokázané rezistence potvrzuje testování klinických izolátů odebraných v období od ledna 2013 do prosince 2015 v oblasti Wenzhou ve východní Číně. Postupně bylo odebráno celkem 1838 izolátů bakterie *Kl. pneumoniae*. Celkem 21 izolátů bylo rezistentních (Zhan *et al.*, 2017). Wand *et al.* (2015) též hodnotili rezistenci u bakterie *Klebsiella pneumoniae*. Celkem bylo testováno 37 izolátů. Několik z nich vykazovalo vysoké hladiny rezistence na ampicilin a piperacilin i po přidání beta – laktamového inhibitoru tazobaktamu či kyseliny klavulanové. Tyto výsledky naznačovaly přítomnost beta – laktamázy v několika stanovovaných izolátech. Hariharan *et al.* (2015) uvádí, že při testování klinických izolátů vykazovalo rezistenci celkem 96,6 % z celkem 58 testovaných izolátů.

Výsledky testování citlivosti na antibiotika bujónovou mikrodiluční metodou a diskovou difúzní metodou shodně vyhodnotily izolát bakterie *Klebsiella oxytoca* rezistentní na ampicilin (Vali *et al.*, 2015). Naše výsledky se lišily. Izoláty byly stanoveny diskovou difúzí jako rezistentní, naopak bujónovou mikrodiluční metodou jako citlivé.

Zheng *et al.* (2015) uvádí, že u 7 izolátů identifikovaných jako *Raoultella ornithinolytica* výsledky stanovení MIC prokázaly rezistenci na ampicilin. Naopak vzorky byly citlivé na ciprofloxacin a piperacilin – tazobaktam. Studie potvrdila produkci

genu *IMP-4*. Všechny izoláty nesly gen *BlaIPM – 4* karbapenemázy, pět izolátů také neslo gen *blaSHV – 12*, čtyři obsahovaly gen *blaTEM – 1* a jeden obsahoval gen *blaOXA – 1*. Izolát *Raoultella ornithinolytica* s označením Ro25724 exprimoval karbapenemázu *Klebsiella pneumoniae* (KPC) – 2. Tato tvrzení popisuje první nález koexistence genů *blaKPC – 2* a *BlaIPM – 4* u rodu *Raoultella* (Zheng *et al.*, 2015). Oproti studii nebyla citlivost bakterie na ciprofloxacin a piperacilin – tazobaktam mikrodiluční metodou testována.

S. marcescens je všudypřítomný patogenní mikroorganismus vyskytující se ve vodě, půdě, rostlinách, hmyzu a zvířatech (Thompson *et al.*, 2007). *S. marcescens* je obvykle rezistentní na ampicilin, amoxicilin, amoxicilin – klavulanovou kyselinu, ampicilin – sulbaktam, cefalosporiny s úzkým spektrem, cefuroxim, nitrofurantoin a kolistin. Rezistenci dokládá i studie z Taiwanu, kde bylo získáno 403 izolátů bakterie *S. marcescens* během osmiletého studijního období v letech 2002 až 2010. Izoláty pocházely z respiračních vzorků (157 izolátů), následovaných močovými cestami (90 izolátů) a krví (77 izolátů). Celkově bylo 99,3 % izolátů citlivých na imipenem, 93,8 % na ceftazidim, 86,0 % na piperacilin – tazobaktam, 72,7 % na levofloxacin, 63,8 % na ciprofloxacin, 60,8 % na trimetoprim – sulfamethoxazol a 59,6 % na gentamicin. Naproti tomu byla pozorována citlivost ≤ 10 % na ampicilin, což naznačuje vysoké procento rezistentních izolátů (Liou *et al.*, 2014). Námí získaný izolát byl též vůči ampicilinu rezistentní.

Bakterie *Y. enterocolitica* je uváděna jako přirozeně rezistentní vůči beta – laktamovým antibiotikům (Tavassoli *et al.*, 2018), což potvrzuje výsledek rezistence našeho testování u izolátů z vod. Abdel-Haq *et al.* (2006) též uvádí testování citlivosti antibiotik pomocí bujónové mikrodiluční metody a to na 184 klinických izolátech *Y. enterocolitica* izolovaných ze vzorků od dětí s gastroenteritidou. Rezistence na ampicilin byla v této studii detekována u 87,2 % izolátů.

Posledním testovaným kmenem bujónovou mikrodiluční metodou byla bakterie *En. faecalis*. Coombs *et al.* (2014) uvádí, že z celkového počtu 1079 bakteriemií bylo 95,8 % způsobeno bakterií *En. faecalis* (61,0 %) nebo *En. faecium* (34,8 %). U žádného izolátů *En. faecalis* nebyla nalezena rezistence. Studie provedena Castillo-Rojas *et al.* (2013) porovnávala u bakterie *En. faecalis* citlivost vůči ampicilinu u vzorků klinických a vzorků z vod. Testováno bylo 17 klinických izolátů s výskytem rezistencí vůči ampicilinu u 11,8 %. Všech 36 izolátů *En. faecalis* izolovaných z vod vyhodnotila studie jako citlivé.

Námi testovaný izolát *En. faecalis* rezistentní podle diskové difúzní metody nemůže být potvrzen jako vyjímečný fenotyp z důvodu prokázání citlivosti bujónovou mikrodiluční metodou.

4.2.1.1 Závěrečné vyhodnocení testovaných bakterií pomocí bujónové mikrodiluční metody

Porovnáním výsledků diskové difúzní metody a bujónové mikrodiluční metody je zřejmé, že při testování stejných izolátů zmíněnými metodami došlo k rozdílným závěrům. Rezistence byla vyvrácena u 4 z 11 testovaných izolátů. Bujónová mikrodiluční metoda je považována za přesnější vůči metodě diskového difúzního testu, kde je stanovená pouze kvalita a výsledek může být ovlivněn nepřesností bakteriálního zákalu.

5 ZÁVĚR

Testováním citlivosti vůči antibiotikům pomocí diskové difúzní metody bylo vyšetřeno celkem 57 izolátů získaných ze vzorků vod. Testovány byly izoláty z rodů *Yersinia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Raoultella* a *Serratia*. Porovnání citlivosti všech testovaných kmenů diskovou difúzní metodou ukazuje, že největší rezistence byla zaznamenána u cefadroxilu, na který bylo rezistentních celkem 16 izolátů (52 %) z 31 testovaných. Ve všech případech se jednalo o kmen *E. coli*. Četná rezistence byla vyhodnocena vůči levofloxacinu (37,5 %) z 8 testovaných izolátů *Pseudomonas aeruginosa*. Dále byla detekována rezistence na amoxicillin – klavulanovou kyselinu, doripenem a meropenem. Na každé z těchto tří jmenovaných antibiotik bylo rezistentních 12,5 % izolátů. Beta – laktamové antibiotikum ampicilin bylo použito při testování 40 izolátů, z nichž čtvrtina izolátů (25 %) jevila vůči tomuto antibiotiku rezistenci. Jednalo se o 2 izoláty *E. coli*, 2 izoláty *Yersinia enterocolitica*, 1 izolát *Serratia marcescens*, 2 izoláty *Klebsiella pneumoniae*, 1 izolát *Klebsiella oxytoca* a 2 izoláty *Raoultella ornithinolytica*.

Na základě výsledků získaných diskovou difúzní metodou byly 4 izoláty vyhodnoceny jako multirezistentní. Jednalo se o 1 izolát bakterie *Serratia marcescens* 2 izoláty *E. coli* a klinický izolát *Pseudomonas aeruginosa*.

U izolátu *Ps. aeruginosa* izolovaného z chronické rány, byly vyhodnoceny rezistence u antibiotik z řad aminoglykosidů, fluorochinolonů, cefalosporinů a penicilinů.

Jeden izolát bakterie *E. coli* vykazoval rezistenci vůči penicilinovému antibiotiku ampicilinu, cefalosporinu cefadroxilu a sulfonamidu trimethoprim – sulfometaxozolu. Naopak druhý izolát byl odolný vůči gentamycinu, doxycyklinu a cefadroxilu řazených do skupin aminoglykosidů, tetracyklinů a cefalosporinů.

Serratia marcescens izolovaná z vod vykazovala multirezistenci na ampicilin a ampicilin – klavulanovou kyselinu z řad penicilinů, cefuroxim a cefadroxil řazené k cefalosporinům a doxycyklin patří do skupiny tetracyklinů.

Pro upřesnění výsledků diskové difúzní metody bylo provedeno stanovení minimální inhibiční koncentrace dle normy ČSN EN ISO 20776-1 bujónovou mikrodiluční metodou u vzorků rezistentních na ampicilin. Rezistence byla vyvrácena u 1 izolátu *E. coli* a *Enterococcus faecalis*, dále u 2 bakteriálních izolátů *Klebsiella pneumoniae*.

Rezistence vůči ampicilinu byla naopak potvrzena diskovou difúzní metodou i bujónovou mikrodiluční metodou u 1 izolátu *E. coli*, *Serratia marcescens* a *Klebsiella pneumoniae*. Výsledek rezistence byl shodný též u 2 izolátů *Raoultella ornithinolytica* a 2 izolátů *Yersinia enterocolitica*.

Závěrem lze říci, že zvyšující se tvorba rezistence na antibiotika se u bakterií netýká pouze klinických izolátů. Vznikající rezistenci bakterií izolovaných z vod podporuje nedostatečné přečišťování v ČOV. Pro řešení této situace je potřebné též zohlednit výskyt antibiotik a ostatních léčiv ve vodách lidským přičiněním. Nutná je redukce znečištění ze zemědělských, farmaceutických a jiných průmyslových pracovišť. Vzniku rezistence může zabránit i sám člověk, který nevyužitě léčivo nespláchne do odpadu, ale vrátí ho zpět do lékárny.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- ABBAS, F. M. Molecular characterization of AmpC beta-lactamase gene producing carbapenem-resistant *Klebsiella Pneumoniae* from Hilla River waters-Iraq. *Journal of Global Pharma Technology* [online]. 2017, 9(10), s. 371-374 [cit. 2019-02-28]. ISSN 0975-8542. Dostupné z: <http://www.jgpt.co.in/index.php/jgpt/article/view/546/391>
- ABDEL-HAQ, N. M, R. PAPADOPOL, B. I. ASMAR a W. BROWN. Antibiotic susceptibilities of *Yersinia enterocolitica* recovered from children over a 12-year period. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2006, 27(5), s. 449-452 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2005.12.008. ISSN 09248579. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857906000598?via%3Dihub>
- AL-AALI, K. Y. Exit-site infections in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients, Taif, Saudi Arabia. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* [online]. 2016, 5(4), s. 836-849 [cit. 2019-02-15]. DOI: 10.20546/ijcmas.2016.504.096. ISSN 23197692. Dostupné z: https://pdfs.semanticscholar.org/ef6f/2374e9d09b5fe3b6da750f8455fc846667c3.pdf?_ga=2.103068096.1950829432.1553269574-27554363.1520619000
- ALMEIDA, M. V. A., Í. M. CANGUSSÚ, A. L. S. CARVALHO, I. L. P. BRITO a R. A. COSTA. Drug resistance, AmpC- β -lactamase and extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from fish and shrimp. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* [online]. 2017, 59 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.1590/s1678-9946201759070. ISSN 0036-4665. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5679682/>
- ALNOUR, T. M. S. and E. H. AHMED-ABAKUR. Multidrug resistant *Pseudomonas (P) aeruginosa*: Medical impact, pathogenicity, resistance mechanisms and epidemiology. *JSM Microbiology* [online]. 2017, 5(3), 1046, s. 1-8 [cit. 2019-02-15]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/324475086_Multidrug_Resistant_Pseudomonas_P_aeruginosa_Medical_Impact_Pathogenicity_Resistance_Mechanisms_and_Epidemiology
- AMINOV, R. I. A Brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2010, 1, s. 1-7 [cit. 2019-03-23]. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00134. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3109405/>
- ANJU, P., C. LATHA, B. SUNIL a C. SETHULEKSHMI. Antimicrobial resistance profile of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia intermedia* isolates from retail pork. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science* [online]. 2014, 3(8), s. 231-234 [cit. 2019-02-15]. ISSN 2319-7706. Dostupné z: <https://www.ijcmas.com/vol-3-8/P.Anju,%20et%20al.pdf>

- ASLAN, A., Z. COLE, A. BHATTACHARYA a O. OYIBO. Presence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in wastewater treatment plant effluents utilized as water reuse for irrigation. *Water* [online]. 2018, 10(6), 805, s. 1-11 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.3390/w10060805. ISSN 2073-4441. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2073-4441/10/6/805>
- AZANU, D., B. STYRISHAVE, G. DARKO, J. J. WEISSER a R. C. ABAIDOO. Occurrence and risk assessment of antibiotics in water and lettuce in Ghana. *Science of The Total Environment* [online]. 2018, 622-623, s. 293-305 [cit. 2019-02-04]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.287. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29216470>
- BADAMCHI, A., R. K. FARAHANI, M. NAGHADALIPOOR, M. R. ETEMADI a A. TABATABAIE. Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients admitted to a third-level hospital in Tehran, Iran. *Current Pediatric Research* [online]. 2018, 22(3), s. 258-262 [cit. 2019-02-28]. ISSN 0971-9032. Dostupné z: <http://www.alliedacademies.org/articles/phenotypic-and-genotypic-characterization-of-antibiotic-resistance-in-klebsiella-pneumoniae-isolated-from-patients-admitted-to-a-th-10877.html>
- BALOUIRI, M., M. SADIKI a S. K. IBNSOUDA. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2016, 6(2), s. 71-79 [cit. 2018-02-14]. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005. ISSN 20951779. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177915300150>
- BASSETTI, M., A. VENA, A. CROXATTO, E. RIGHI a B. GUERY. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in Context* [online]. 2018, 7, s. 1-18 [cit. 2019-01-27]. DOI: 10.7573/dic.212527. ISSN 17404398. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5978525/>
- BERNATOVÁ, S., O. SAMEK, Z. PILÁT, M. ŠERÝ, J. JEŽEK, P. JÁKL, M. ŠILER, V. KRZYŽÁNEK, P. ZEMÁNEK, V. HOLÁ, M. DVOŘÁČKOVÁ a F. RŮŽIČKA. Following the mechanisms of bacteriostatic versus bactericidal action using raman spectroscopy. *Molecules* [online]. 2013, 18(11), s. 13188-13199 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.3390/molecules181113188. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/11/13188>
- BJÖRLENIUS, B., M. RIPSZÁM, P. HAGLUND, R. H. LINDBERG, M. TYSKLIND a J. FICK. Pharmaceutical residues are widespread in Baltic Sea coastal and offshore waters – Screening for pharmaceuticals and modelling of environmental concentrations of carbamazepine. *Science of The Total Environment* [online]. 2018, 633, s. 1496-1509 [cit. 2019-03-23]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.276. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:1198860/FULLTEXT01.pdf>

- CASTILLO-ROJAS, G., M. MAZARI-HIRÍART, S. PONCE DE LEÓN, R. I. AMIEVA-FERNÁNDEZ, R. A. AGIS-JUÁREZ, J. HUEBNER, Y. LÓPEZ-VIDAL a A. M. IBEKWE. Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from water and clinical samples: Antimicrobial susceptibility and genetic relationships. *PLoS ONE* [online]. 2013, 8(4) [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1371/journal.pone.0059491. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0059491>
- CAZEDEY, E. C. L. and H. R. N. SALGADO. Development and validation of a microbiological agar assay for determination of orbifloxacin in pharmaceutical preparations. *Pharmaceutics* [online]. 2011, 3(3), s. 572-581 [cit. 2019-02-27]. DOI: 10.3390/pharmaceutics3030572. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1999-4923/3/3/572>
- COCULESCU, B. I. Antimicrobial resistance induced by genetic changes. *Journal of Medicine and Life* [online]. 2009, 2(2), s. 114-123 [cit. 2019-02-21]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3018982/>
- COOMBS, G. W., J. C. PEARSON, D. A. DALEY, T. LE, O. J. ROBINSON, T. GOTTLIEB, B. P. HOWDEN, P. D. R. JOHNSON, C. M. BENNETT, T. P. STINEAR, a J. D. TURNIDGE. Molecular epidemiology of *Enterococcal* bacteremia in Australia. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2014, 52(3), s. 897-905 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1128/JCM.03286-13. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3957796/>
- ČSN EN ISO 20776-1 (857006) : Klinické laboratorní zkoušky a zkušební systémy pro diagnostiku in vitro - Zkoušení citlivosti původců infekcí a hodnocení účinnosti prostředků pro stanovení antimikrobiální citlivosti - Část 1: Referenční metody pro zkoušení aktivity antimikrobiálních činidel in vitro proti rychle rostoucím aerobním bakteriím způsobujícím infekční nemoci. Český normalizační institut, vydáno 2007.
- DALYNN BIOLOGICALS. *McFarland standard* [online]. 2014 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf
- DOWLING, A., J. O' DWYER a C. C. ADLEY. Antibiotics: Mode of action and mechanisms of resistance [online]. *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs* [online]. 2017, s. 536-545 [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/317381477_Antibiotics_Mode_of_action_and_mechanisms_of_resistance
- ECO TREND RESEARCH CENTRE s.r.o. *Optimalizace nakládání s kalý z komunálních čistíren odpadních vod. Oddíl II Hodnotící část* [online]. 2015, s. 1-128 [cit. 2019-02-04]. Dostupné z: [https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/projekty_po8_opzp_2007_2013/\\$FILE/OODP-Oddil_II_Hodnotici_cast_Vysledky-20160810.pdf](https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/projekty_po8_opzp_2007_2013/$FILE/OODP-Oddil_II_Hodnotici_cast_Vysledky-20160810.pdf)

- ETEBU, E. and I. ARIKEKPAR. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research* [online]. 2016, 4, s. 90-101 [cit. 2019-02-04]. ISSN 2053-1818. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/aebc/840138529c147e54552205bf26ec8aa3ca2e.pdf>
- EUCAST. *Často kladené otázky k dokumentům EUCAST*. 2018b [online]. [cit. 2019-02-15]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Casto_kladene_otazky_2018_FAQ_CZ.pdf
- EUCAST. *Disková difuzní metoda EUCAST pro vyšetřování citlivosti k antibiotikům*. Verze 5. 0, 2015 [online]. [cit. 2019-02-18]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Diskova_metoda/EUCAST_Disk_prezentace_v.5.0_2015.pdf
- EUCAST. *EUCAST návod k odečítání bujónové mikrodiluce*. Verze 1. 0, 2019b [online]. [cit. 2019-02-15]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/MIC/Navod_k_odecitani_BMD_v_1.0_2019.pdf
- EUCAST. *Expert rules and intrinsic resistance*. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST 2019 [online]. 2019a [cit. 2019-02-15]. Dostupné z: http://www.eucast.org/expert_rules_and_intrinsic_resistance/
- EUCAST. *Rutiní a rozšířená kontrola kvality doporučená EUCAST*. Verze 8, 2018c [online]. [cit. 2019-02-15]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/kontrola_kvality/Tabulky_pro_kontrolu_kvality_EUCAST_v_8.pdf
- EUCAST. *Tabulky přirozené rezistence a výjimečných fenotypů*. Expertní pravidla EUCAST. Verze 3.1, 2016 [online]. [cit. 2019-02-15]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Expert_rules/Vyjimecne_fenotypy_a_prirozena_rezistence_v3.1.pdf
- EUCAST. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Verze 8.0, 2018a [online]. [cit. 2019-02-15]. Dostupné z: <http://www.eucast.org>
- FAGER, CH. and L. YURTERI-KAPLAN. Urinary tract infection with rare pathogen *Raoultella Planticola*: A post-operative case and review. *Urology Case Reports* [online]. 2019, 22, s. 76-79 [cit. 2019-02-15]. DOI: 10.1016/j.eucr.2018.11.004. ISSN 22144420. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6249409/>

- FAIDAH, H. S., S. S. ASHGAR, A. A. A. BARHAMEEN, H. M. EL-SAID a A. ELSAWY. *Serratia marcescens* as opportunistic pathogen and the importance of continuous monitoring of nosocomial infection in Makah City, Saudi Arabia. *Open Journal of Medical Microbiology* [online]. 2015, 5(3), s. 107-112 [cit. 2019-02-15]. DOI: 10.4236/ojmm.2015.53013. ISSN 2165-3372. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/ojmm.2015.53013>
- FARRELL, D. J., R. E. MENDES, P. R. RHOMBERG a R. N. JONES. Revised reference broth microdilution method for testing telavancin: Effect on MIC results and correlation with other testing methodologies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2014, 58(9), s. 5547-5551 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1128/AAC.03172-14. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4135820/>
- FERJANI, S., M. SAIDANI, F. S. AMINE a I. B.-B. BOUBAKER. Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a Tunisian hospital. *Microbial Drug Resistance* [online]. 2015, 21(2), s. 158-166 [cit. 2019-02-21]. DOI: 10.1089/mdr.2014.0053. ISSN 1076-6294. Dostupné z: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2014.0053>
- GARNEAU-TSODIKOVA, S. and K. J. LABBY. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *Medicinal Chemistry Communications* [online]. 2016, 7(1), s. 11-27 [cit. 2019-02-18]. DOI: 10.1039/C5MD00344J. ISSN 2040-2503. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4752126/>
- GAŠO-SOKAČ, D., M. HABUDA-STANIĆ, V. BUŠIĆ a D. ZOBUNDŽIJA. Occurrence of pharmaceuticals in surface water. *Croatian Journal of Food Science and Technology* [online]. 2017, 9(2), s. 204-210 [cit. 2019-02-04]. DOI: 10.17508/CJFST.2017.9.2.18. ISSN 18473466. Dostupné z: <http://www.ptfos.unios.hr/novicjfst/index.php/2017/12/05/cjfst-2017-9-2-18/>
- GOUD, S. S. S., A. JAGADEESH BABU, CS. SWETHA, RA. SUPRIYA and M. SHYLAJA. A study on the antimicrobial resistance profile of *E. coli* isolated from dairy farm sewage. *The Pharma Innovation Journal* [online]. 2017, 6(7), s. 947-954 [cit. 2019-02-28]. ISSN 2277-7695. Dostupné z: <http://www.thepharmajournal.com/archives/2017/vol6issue7/PartG/6-7-34-989.pdf>
- GRACE, F. M. E-test for detection of antimicrobial susceptibility of vancomycin (glycopeptides) in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*[online]. 2013, 7(3), s. 29-31 [cit. 2019-04-26]. DOI: 10.9790/3008-0732931. ISSN 23197676. Dostupné z: <http://www.iosrjournals.org/iosr-jpbs/papers/Vol7-issue3/E0732931.pdf?id=3436>

- GRENNI, P., V. ANCONA a A. BARRA CARACCILO. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal* [online]. 2017, 136, s. 1-15 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1016/j.microc.2017.02.006. ISSN 0026265X. Dostupné z: <https://www.hort.vt.edu/args/documents/EcologicalEffects.pdf>
- HALEŠOVÁ, T., M. SEIFRTOVÁ, E. HUDEČKOVÁ, R. PEŠOUTOVÁ, L. STRÍTESKÝ, H. HABR a R. HRICH. *Sledování zátěže životního prostředí léčivý a pesticidními látkami (prostřednictvím monitoringů výstupů z ČOV)*. Zápis z konference sanační technologie XIX 2016 [online]. 2016, s. 1-13 [cit. 2019-03-22]. Dostupné z: http://www.life2water.cz/dwnld/Sanace_2016.pdf
- HARIHARAN P., T. BHARANI, J. S. FRANKLYNE, P. BISWAS, S. S. SOLANKI a M. PAUL-SATYASEELA. Antibiotic susceptibility pattern of Enterobacteriaceae and non-fermenter Gram-negative clinical isolates of microbial resource orchid. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine* [online]. 2015, 6(1), s. 198-201 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.4103/0976-9668.149121. ISSN 0976-9668. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4367035/>
- HORÁK, P. Místo naproxenu mezi ostatními nesteroidními antirevmatiky používanými v léčbě bolesti a zánětu u nejčastějších revmatických chorob. *Medicina pro praxi* [online]. 2015, 12(5), s. 218-222 [cit. 2019-02-04]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2015/05/03.pdf>
- HRABÁK, J., T. BERGEROVÁ, H. ŽEMLIČKOVÁ a P. URBÁŠKOVÁ. Detekce širokospektrých β-laktamáz (ESBL), β-laktamáz AmpC, metalo-β-laktamáz (MBL) a karbapenemáz KPC u gramnegativních tyčků. Zprávy epidemiologie a mikrobiologie: Informace z nrl a odborných pracovišť SZÚ [online]. SZÚ: Praha, 2009, 18(3), s. 100-106 [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/18_2009/3_brezen/100_betal.pdf
- HRKAL, Z., D. ROZMAN a Z. TŘÍSKALA. *Test of pharmaceutical pollution in the Czech mineral waters*. Publikován v rámci konference MinWat 2017, Portugalsko. Interní zdroje Svazu minerálních vod zaslané e-mailem
- CHEN, Y., H. CHEN, L. ZHANG, Y. JIANG, K. Yew-Hoong GIN a Y. HE. Occurrence, distribution, and risk assessment of antibiotics in a subtropical river-reservoir system. *Water* [online]. 2018, 10(2), 104, s. 1-16 [cit. 2019-02-04]. DOI: 10.3390/w10020104. ISSN 2073-4441. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2073-4441/10/2/104>
- CHOYAM, S., D. LOKESH, B. B. KEMPAIAH a R. KAMMARA. Assessing the antimicrobial activities of ocins. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2015, 6(1034), s. 1-8 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01034. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4585010/>

- IGBINOSA, E. O., T. ONUOHA a U. UDOCHUKWU. Antimicrobial resistance profile characterization of *Enterococcus* Species isolated from aquaculture environment. *Journal of Microbiology & Biotechnology*[online]. 2016, 1(2), s. 1-6 [cit. 2019-02-15]. Dostupné z: <https://medwinpublishers.com/OAJMB/OAJMB16000107.pdf>
- IGLESIAS, A., C. NEBOT, B. VÁZQUEZ, C. CORONEL-OLIVARES, C. M. F. ABUÍN a A. CEPEDA. Monitoring the presence of 13 active compounds in surface water collected from rural areas in northwestern Spain. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2014, 11(5), s. 5251-5272 [cit. 2019-02-04]. DOI: 10.3390/ijerph110505251. ISSN 1660-4601. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4053870/>
- JACOBO, CH. M. Distribution and antibiotic resistance of *Klebsiella* species in the aquatic environment [online]. 2012 [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: <https://aaas.confex.com/aaas/2012/webprogram/Paper7538.html>
- JAMES, O. O., CH. ANYAKORA, I. O. ADETIFA a A. A. ADEPOJU-BELLO. A screening for selected human pharmaceuticals in water using SPE-HPLC, Ogun State, Nigeria. *The African Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacy* [online]. 2017, 5(1), s. 1-12 [cit. 2019-02-04]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/319035226_A_Screening_for_Selected_Human_Pharmaceuticals_in_water_using_spe-hplc_ogun_state_Nigeria
- JENKINS, C., R. J. RENTENAAR, L. LANDRAUD a S. BRISSE. *Enterobacteriaceae*. *Infectious Diseases* [online]. 2017, 2, s. 1565-1578 [cit. 2019-01-27]. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6285-8.00180-5. ISBN 9780702062858. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702062858001805>
- JEŽKOVÁ, J. *Farmaka v přírodních a léčivých minerálních vodách v ČR* [online]. Svaz minerálních vod. 2019 [cit. 2019-02-06]. Dostupné z: <https://svaz-mv.cz/wp-content/uploads/2018/08/Farmaka-v-minera%CC%81ni%CC%81ch-voda%CC%81ch.pdf>
- JUAYANG, A. C., J. P. T. LIM, A. F. V. BONIFACIO, A. V. L. LAMBOT, S. M. MILLAN, V. Z. J. N. SEVILLA, J. K. T. SY, P. J. VILLANEUVA, C. P. GRAJALES and CH. T. GALLEGA. Five-year antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from a local tertiary hospital in Bacolod City, Philippines. *Tropical Medicine and Infectious Disease* [online]. 2017, 2(3) [cit. 2019-02-15]. DOI: 10.3390/tropicalmed2030028. ISSN 2414-6366. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2414-6366/2/3/28/htm>
- KECHAGIA, M. and V. SAMANIDOU. Trends in microextraction-based methods for the determination of sulfonamides in milk. *Separations* [online]. 2017, 4, 23, s. 1-16 [cit. 2019-02-06]. DOI: 10.3390/separations4030023. ISSN 2297-8739. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2297-8739/4/3/23>

- KHORVASH, F., M. YAZDANI, S. SHABANI a A. SOUDI. *Pseudomonas aeruginosa*-producing metallo- β -lactamases (VIM, IMP, SME, and AIM) in the clinical isolates of intensive care units, a University hospital in Isfahan, Iran. *Advanced Biomedical Research* [online]. 2017, 6, 147 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.4103/2277-9175.219412. ISSN 2277-9175. Dostupné z: <http://www.advbiores.net/text.asp?2017/6/1/147/219412>
- KHOSRAVI, A. D., M. MOTAHAR, E. ABBASI MONTAZERI a B. RYFFEL. The frequency of class1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in a burn center of Ahvaz, Iran. *PLOS ONE* [online]. 2017, 12(8) [cit. 2019-02-13]. DOI: 10.1371/journal.pone.0183061. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0183061>
- KIDSLEY, A. K., S. ABRAHAM, J. M. BELL, M. O'DEA, T. J. LAIRD, D. JORDAN, P. MITCHELL, CH. A. McDEVITT a D. J. TROTT. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* isolates from healthy pigs in Australia: Results of a pilot national survey. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2018, 9, s. 1-11 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01207. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01207/full>
- KIM, J.-W., H.-S. JANG, J.-G. KIM, H. ISHIBASHI, M. HIRANO, K. NASU, N. ICHIKAWA, Y. TAKAO, R. SHINOHARA, K. ARIZONO. Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in surface water from Mankyung river, South Korea. *Journal of Health Science* [online]. 2009, 55(2), s. 249-258 [cit. 2019-02-04]. DOI: 10.1248/jhs.55.249. ISSN 1344-9702. Dostupné z: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jhs/55/2/55_2_249/_article/-char/en
- KOLÁŘ, M., M. HTOUTOU SEDLÁKOVÁ a L. ČEKANOVÁ. Rezistence dětských bakteriálních patogenů a možnosti antibiotické léčby. *Pediatric pro praxi* [online]. 2013, 14(2), s. 114-117 [cit. 2019-02-21]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2013/02/10.pdf>
- KOLÁŘ, M., M. RÖDEROVÁ, K. HRICOVÁ, J. BARDONĚ, V. PUDOVÁ a V. HANULÍK. *Antibiotická politika: Problematika rezistence Escherichia coli k fluorochinolonům* [online]. Praha: Agentura B/P/P/, 2015 [cit. 2019-02-21]. ISBN 978-80-244-4699-8. Dostupné z: https://solan.bpp.cz/pdf/Sbornik_2015.pdf
- KOPECKÁ J. and G. ROTKOVÁ. *Script to the practice from general microbiology, cytology and morphology of bacteria* [online]. 2016, s. 1-154 [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: http://www.sci.muni.cz/mik/wp-content/uploads/2016_Microbiology_practice.pdf
- KOVAČIĆ, A., Ž. HULJEV a E. SUŠIĆ. Ground water as the source of an outbreak of *Salmonella* Enteritidis. *Journal of Epidemiology and Global Health* [online]. 2017, 7(3), s. 181-184 [cit. 2019-02-15]. DOI: 10.1016/j.jegh.2017.05.001. ISSN 22106006. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210600616301058>

- KOŽÍŠEK, F. and P. PUMANN. Léčiva v pitné vodě a vliv médií. *Envigogika* [online]. 2013, 8(3), s. 1-14 [cit. 2019-02-28]. DOI: 10.14712/18023061.388. ISSN 1802-3061. Dostupné z: <https://www.envigogika.cuni.cz/index.php/Envigogika/article/view/388/507>
- KOŽÍŠEK, F. and H. JELIGOVÁ. První systematické mapování léčiv v pitných vodách v ČR. Tisková zpráva Státního zdravotního ústavu [online]. 2012, s. 1-3 [cit. 2019-02-06]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/voda/pdf/gacr_leciva/Tiskova_zprava_SZU_leciva_ve_vode.pdf
- KUMAR, S., V. R. TRIPATHI a S. K. GARG. Antibiotic resistance and genetic diversity in water-borne *Enterobacteriaceae* isolates from recreational and drinking water sources. *International Journal of Environmental Science and Technology* [online]. 2013, 10(4), s. 789-798 [cit. 2019-02-15]. DOI: 10.1007/s13762-012-0126-7. ISSN 1735-1472. Dostupné z: <http://www.bioline.org.br/pdf?st13078>
- LI, H., Y.-F. LUO, B. J. WILLIAMS, T. S. BLACKWELL a C.-M. XIE. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. *International Journal of Medical Microbiology* [online]. 2012, 302(2) [cit. -2019-02-19]. DOI: 10.1016/j.ijmm.2011.10.001. ISSN 14384221. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3831278/>
- LIOU, B.-H., R.-W. DUH, Y.-T. LIN, T.-L. YANG LAUDERDALE a CH.-P. FUNG. A multicenter surveillance of antimicrobial resistance in *Serratia marcescens* in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* [online]. 2014, 47(5), s. 387-393 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1016/j.jmii.2013.04.003. ISSN 16841182. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1684118213000728#tbl2>
- MAGALHÃES, M. L. and J. S. BLANCHARD. Aminoglycosides: Mechanisms of action and resistance. *Antimicrobial Drug Resistance* [online]. 2009, s. 171-181 [cit. 2019-02-18]. DOI: 10.1007/978-1-59745-180-2_14. ISBN 978-1-60327-592-7. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-180-2_14
- MAHMOOD, A. R., H. H. AL-HAIDERI a F. M. HASSAN. Detection of antibiotics in drinking water treatment plants in Baghdad City, Iraq. *Advances in Public Health* [online]. 2019, s. 1-10 [cit. 2019-02-04]. DOI: 10.1155/2019/7851354. ISSN 2356-6868. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/aph/2019/7851354/>
- MACHUCA, J., M. ORTIZ, E. RECACHA, P. DÍAZ-DE-ALBA, F. DOCOBO-PEREZ, J.-M. RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ a Á. PASCUAL. Impact of AAC(6')-Ib-cr in combination with chromosomal-mediated mechanisms on clinical quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2016, 71(11), s. 3066-3071 [cit. 2019-02-21]. DOI: 10.1093/jac/dkw258. ISSN 0305-7453. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jac/article/71/11/3066/2462034>

- MAŁKA, Ł. and M. POPOWSKA. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolated from food. *Rocz Panstw Zakl Hig* [online]. 2016, 67(4), s. 343-358 [cit. 2019-02-21]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27922740>
- MARIETTO-GONÇALVES, G. A., E. L. LIMA, B. A. NAGAYOSHI, A. A. TONIN, T. KNÖBL a R. L. ADREATTI FILHO. *Raoultella ornithinolytica* isolation in cloacal microbiota of *Tinamus solitarius*: Preliminary Data. *Brazilian Journal of Poultry Science* [online]. 2018, 20(2), s. 189-192 [cit. 2019-02-15]. DOI: 10.1590/1806-9061-2017-0599. ISSN 1806-9061. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2018000200189
- MARTINEZ, J. L. and F. BAQUERO. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* [online]. 2000, 44(7), s. 1771-1777 [cit. 2019-02-21]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89960/>
- MATUSCHEK, E., D. F. J. BROWN a G. KAHLMETER. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2014, 20(4), s. 255 - 266 [cit. 2018-02-14]. Dostupné z: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)60298-6/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)60298-6/fulltext)
- MAYER, C., A. STOLLE a M. FREDRIKSSON-AHOMAA. Comparison of broth microdilution and disk diffusion test for antimicrobial resistance testing in *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 strains. *Microbial drug resistance* [online]. 2011, 17(3), s. 479-484 [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21568753>
- MOHAMMADZADEH, T., SADJJADI, S., HABIBI, P., a SARKIRI, B. Comparison of agar dilution, broth dilution, cylinder plate and disk diffusion methods for evaluation of anti-leishmanial drugs on *Leishmania* promastigotes. *Iranian Journal of Parasitology* [online]. 2012, 7(3), s. 43-47 [cit. 2018-02-14]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3469171/>
- MORALES, G., J. J. PICAZO, E. BAOS, F. J. CANDEL, A. ARRIBI, B. PELÁEZ, R. ANDRADE, M.-Á. de la TORRE, J. FERERES, M. SÁNCHEZ-GARCÍA. Resistance to linezolid is mediated by the *cfr* gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2010, 50(6), s. 821-825 [cit. 2019-02-21]. DOI: 10.1086/650574. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article/50/6/821/417176>
- MUNITA, J. M. and C. A. ARIAS. Mechanisms of antibiotic resistance. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition* [online]. American Society of Microbiology. 2016, s. 481-511 [cit. 2019-02-21]. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. ISBN 9781555819279. Dostupné z: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555819286.chap17>

- NASSIRI KOOPAEI, N. and M. ABDOLLAHI. Health risks associated with the pharmaceuticals in wastewater. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2017, 25(9), s. 1-7 [cit. 2019-01-25]. DOI: 10.1186/s40199-017-0176-y. ISSN 2008-2231. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5389172/>
- NEMETH, J., G. OESCH a S. P. KUSTER. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2015, 70(2), s. 382-395 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.1093/jac/dku379. ISSN 0305-7453. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jac/article/70/2/382/2911103>
- ÖZÇELİK, B., F. KAYNAK a U. ABBASOĞLU. Evaluation of susceptibility testing by comparison of broth microdilution and disk agar diffusion tests in *Staphylococci*. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2004, 1(2), s. 77-86 [cit. 2019-03-27]. ISSN 2148-6247. Dostupné z: <http://www.turkjps.org/archives/archive-detail/article-preview/evaluaton-of-susceptblty-testng-by-comparson-of-br/12596>
- PIERCE-HENDRY, S. A. and J. DENNIS. Bacterial culture and antibiotic susceptibility testing. *Continuing for Veterinarians* [online]. 2010, s. 1-6 [cit. 2019-03-23]. Dostupné z: https://pdfs.semanticscholar.org/3861/be8bccb4dc199507d8412ab31ef989fc64c6.pdf?_ga=2.264775050.448608088.1553003167-27554363.1520619000
- POMYKAČOVÁ, I., V. ČADEK, V. SVOBODOVÁ, F. KOŽÍŠEK a H. JELIGOVÁ. Stanovení stopových množství léčiv v pitných vodách metodou GC-MS. *Chemické listy* [online]. 2012, 106, s. 143-148 [cit. 2019-02-01]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/289481820_GC-MS_Determination_of_Trace_Amounts_of_Pharmaceuticals_in_Drinking_Water
- RAMIREZ, M. and M. TOLMASKY. Amikacin: Uses, resistance, and prospects for inhibition. *Molecules* [online]. 2017, 22(12), 2267, s. 1-23 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.3390/molecules22122267. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/12/2267>
- RANJBAR, R., S. S. TOLON, M. SAMI a R. GOLMOHAMMADI. Detection of plasmid-mediated *qnr* genes among the clinical quinolone-resistant *Escherichia coli* strains isolated in Tehran, Iran. *The Open Microbiology Journal* [online]. 2018, 12, s. 248-253 [cit. 2019-02-21]. DOI: 10.2174/1874285801812010248. ISSN 1874-2858. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6110078/>
- SABRI, N. A., H. SCHMITT, B. VAN DER ZAAN, H. W. GERRITSEN, T. ZUIDEMA, H. H. M. RIJNAARTS a A. A. M. LANGENHOFF. Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 2018 [cit. 2019-02-04]. DOI: 10.1016/j.jece.2018.03.004. ISSN 22133437. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213343718301258#fig0010>

- SANDNER-MIRANDA, L., P. VINUESA, A. CRAVIOTO a R. MORALES-ESPINOSA. The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *Serratia*. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2018, 9 [cit. 2019-02-28]. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00828. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00828/full>
- SHAHMANSOURI, A. and CH. BELLONA. Nanofiltration technology in water treatment and reuse: applications and costs. *Water Science and Technology* [online]. 2015, 71(3), s. 309-319 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.2166/wst.2015.015. ISSN 0273-1223. Dostupné z: <https://iwaponline.com/wst/article/71/3/309/18777/Nanofiltration-technology-in-water-treatment-and>
- SHIELDS, R. K., M. H. NGUYEN, E. G. PRESS, L. CHEN, B. N. KREISWIRTH a C. J. CLANCY. Emergence of ceftazidime-avibactam resistance and restoration of carbapenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K pneumoniae*: A case report and review of literature. *Open Forum Infectious Diseases* [online]. 2017, 4(3) [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1093/ofid/ofx101. ISSN 2328-8957. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ofid/article/doi/10.1093/ofid/ofx101/3916629>
- SHMARA, A., N. WEINSETEL, K. J. DERY, R. CHAVIDEH a M. E. TOLMASKY. Systematic analysis of a conserved region of the aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2001, 45(12), s. 3287-3292 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.1128/AAC.45.12.3287-3292.2001. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90828/>
- SCHIAVANO, G. F., E. CARLONI, F. ANDREONI, S. MAGI, M. CHIRONNA, G. BRANDI, G. AMAGLIANI a M. GALDIERO. Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in water samples in central Italy and molecular characterization of oprD in imipenem resistant isolates. *PLOS ONE* [online]. 2017, 12(12) [cit. 2019-02-13]. DOI: 10.1371/journal.pone.0189172. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0189172>
- SCHOFIELD, C. B. Updating antimicrobial susceptibility testing methods. *Clinical laboratory science* [online]. 2012, 25(4), s. 233-239 [cit. 2019-01-31]. Dostupné z: <http://clsjournal.ascls.org/content/25/4/233>
- SCHUMACHER, A., T. VRANKEN, A. MALHOTRA, J. J. C. ARTS a P. HABIBOVIC. *In vitro* antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models [online]. 2018, 37(2), s. 187-208 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1007/s10096-017-3089-2. ISSN 0934-9723. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5780537/>

- SINGH, G., A. K. SINGH a K. BHATT. Biodegradation of polythenes by bacteria isolated from soil. *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences* [online]. 2016, 5(2), s. 2056-2062 [cit. 2019-03-22]. ISSN 2278-0238. Dostupné z: <https://www.omicsonline.org/open-access/biodegradation-of-polythenes-by-bacteria-isolated-from-soil-.pdf>
- Směrnice rady (91/271/EEC) ze dne 21. května 1991 o čištění městských odpadních vod. Brusel.
- Směrnice Rady (91/271/EHS) ze dne 21. května 1991 o čištění městských odpadních vod. Brusel: Úřední věstník Evropské unie.
- SOOMRO, A. H., M. KHASKHELI, M. B. BHUTTO, G. SHAH, A. MEMON a P. DEWANI. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars isolated from poultry meat in Hyderabad, Pakistan. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* [online]. 2010, 35(5), s. 455-460 [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/132245>
- SPÍŽEK, J. *Boj s rezistencí na antibiotika: Edice Strategie AV21. Výzkumný program potravin pro budoucnost* [online]. Středisko společných činností AV ČR. Praha, 2016, s. 1-34 [cit. 2019-03-20]. ISBN 978-80-200-2631-6. Dostupné z: <http://www.academia.cz/uploads/media/preview/0001/04/6d0667c47faa80e5342c471ec2b13af5127d42da.pdf>
- STIBOROVÁ, H., A. BAČÁKOVÁ, L. MUSILOVÁ a K. DEMNEROVÁ. Od přirozeného fenoménu výskytu rezistence k antibiotikům v životním prostředí ke vzniku multirezistentních kmenů. *Chemické listy* [online]. 2018, 112, s. 833-839 [cit. 2019-02-21]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3239/3210>
- TAVASSOLI M., A. AFSHARI, D. DRĂGĂNESCU, A. L. ARSENE, T. I. BURYKINA, R. REZAEE. Antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* in different foods: A Review. *Farmacia* [online]. 2018, 66(3), s. 399-407 [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/326395160_Antimicrobial_resistance_of_yersinia_enterocolitica_in_different_foods_A_review
- TERRON CUADRADO, M. *WHO ATC Classification System (Anatomical Therapeutic Chemical Classification)* [online]. 2018 [cit. 2019-02-01]. Dostupné z: <https://ec.europa.eu/cefdigital/wiki/pages/viewpage.action?pageId=52609352>
- THOMPSON, S. A., E. V. MAANI, A. H. LINDELL, C. J. KING a J. V. McARTHUR. Novel tetracycline resistance determinant isolated from an environmental strain of *Serratia marcescens*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2007, 73(7), s. 2199-2206 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1128/AEM.02511-06. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02511-06>

- VAJDA, A. M., A. KUMAR, M. WOODS, M. WILLIAMS, H. DOAN, P. TOLSHER, R. S. KOOKANA a L. B. BARBER. Integrated assessment of wastewater treatment plant effluent estrogenicity in the upper Murray River, Australia, using the native Murray rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2015, 34(5), s. 1078-1087 [cit. 2019-02-04]. DOI: 10.1002/etc.2895. ISSN 07307268. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/etc.2895>
- VALI, L., A. A. DASHTI, S. EL-SHAZLY a M. M. JADAON. *Klebsiella oxytoca* with reduced sensitivity to chlorhexidine isolated from a diabetic foot ulcer. *International Journal of Infectious Diseases* [online]. 2015, 34, s. 112-116 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1016/j.ijid.2015.03.021. ISSN 12019712. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S120197121500082X>
- VAN HOEK, A. H. A. M., D. MEVIUS, B. GUERRA, P. MULLANY, A. P. ROBERTS a H. J. M. AARTS. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2011, 2 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00203. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2011.00203/abstract>
- WAND, M. E., K. S. BAKER, G. BENTHALL, H. MCGREGOR, J. W. I. MCCOWEN, A. DEHEER-GRAHAM a J. M. SUTTON. Characterization of pre-antibiotic era *Klebsiella pneumoniae* isolates with respect to antibiotic/disinfectant susceptibility and virulence in *Galleria mellonella*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2015, 59(7), s. 3966-3972 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1128/AAC.05009-14. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4468732/>
- WANG, D., X. HUANG, J. CHEN, Y. MOU, H. LI a L. YANG. Characterization of genetic structures of the *QepA3* gene in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2015, 6 [cit. 2019-02-21]. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01147. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.01147/full>
- WEI, L., O. WU, J. ZHANG, W. GUO, M. CHEN, L. XUE, J. WANG a L. MA. Prevalence and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from mineral water and spring water in China. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, 8, s. 1-8 [cit. 2019-02-15]. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01109. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01109/full>
- YING, M., J. WU, K. D. OAKES, A. HU. Removal of pharmaceuticals and personal care products from wastewater. *Wastewater Treatment* [online]. 2015, s. 81-109 [cit. 2019-02-04]. ISBN 978-1-63482-467-5. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/275892025_Removal_of_pharmaceuticals_and_personal_care_products_from_wastewater

- ZHAN, L., S. WANG, Y. GUO, Y. JIN, J. DUAN, Z. HAO, J. LV, X. QI, L. HU, L. CHEN, B. N. KREISWIRTH, R. ZHANG, J. PAN, L. WANG a F. YU. Outbreak by hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates with carbapenem resistance in a Tertiary hospital in China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2017, 7 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00182. ISSN 2235-2988. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2017.00182/full>
- ZHENG, B., J. ZHANG, J. JI, Y. FANG, P. SHEN, CH. YING, J. LV, Y. XIAO a L. LI. Emergence of *Raoultella ornithinolytica* coproducing IMP-4 and KPC-2 carbapenemases in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2015, 59(11), s. 7086-7089 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1128/AAC.01363-15. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <https://aac.asm.org/content/59/11/7086>
- ZHOU, X., L. XU, X. XU, Y. ZHU, Y. SUO, CH. SHI a X. SHI. Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from retail chicken products in Shanghai, China. *Foodborne Pathogens and Disease* [online]. 2018, 15(6), s. 346-352 [cit. 2019-02-15]. DOI: 10.1089/fpd.2017.2387. ISSN 1535-3141. Dostupné z: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2017.2387>