

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vývoj antibiotické rezistence u bakterií

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Klára Čeřovská**
Osobní číslo: **C17149**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Vývoj antibiotické rezistence u bakterií**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na dané téma.
2. V rešerši se hlavně zaměřte na metody zjišťování antibiotické citlivosti u bakterií.
3. Zjistěte současný stav rezistence na antibiotika u bakterií.
4. Popište cesty přenosu a mechanismy antibiotické rezistence.
5. Zjistěte, jaká je budoucnost antimikrobiální terapie.
6. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 7/2019: Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Iveta Brožková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

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

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Práci s názvem Vývoj antibiotické rezistence u bakterií 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 16.7.2021

Klára Čeřovská

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. za trpělivost, vstřícnost a cenné rady při psaní práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině za velkou podporu a oporu v průběhu studia. A poslední dík patří celému kolektivu Oddělení lékařské mikrobiologie Orlickoústecké nemocnice za ochotu, podporu a motivaci.

ANOTACE

Práce se zabývá objasněním vzniku a šíření antibiotické rezistence u bakterií. Představuje metody, které se používají ke zjištění antibiotické citlivosti bakterií. Dále představuje klinicky významné rezistentní bakterie. A na závěr se práce věnuje budoucnosti antibiotické léčby a jejím alternativním metodám.

KLÍČOVÁ SLOVA

antibiotika, antibiotická rezistence, testování antibiotické citlivosti, rezistentní bakterie

TITLE

Development of Antibiotic Resistance in Bacteria

ANNOTATION

The work deals with the explanation of the origin and spread of antibiotic resistance in bacteria. It presents methods that are used to determine bacterial antibiotic susceptibility. Furthermore, the work presents clinically important resistant bacteria. Finally it deals with the future of antibiotic treatment and its alternative methods.

KEYWORDS

antibiotics, antibiotic resistance, antibiotic susceptibility testing, resistant bacteria

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ.....	10
SEZNAM TABULEK	11
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	12
ÚVOD.....	14
1 ANTIBIOTIKA	15
1.1 Definice antibiotik.....	15
1.2 Dělení antibiotik.....	16
2 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE.....	17
2.1 Vývoj.....	17
2.2 Definice	17
2.3 Přírozená rezistence	18
2.4 Získaná rezistence	18
2.4.1 Transformace	20
2.4.2 Transdukce.....	20
2.4.3 Konjugace	21
2.5 Mechanismy rezistence	21
2.5.1 Omezení průniku antibiotika do buňky	22
2.5.2 Změna cílových struktur	22
2.5.3 Inaktivace bakteriálními enzymy.....	23
2.5.4 Bakteriální eflux	23
3 METODY ZJIŠŤOVÁNÍ ANTIBIOTICKÉ CITLIVOSTI	24
3.1 Fenotypové metody.....	25
3.1.1 Disková difuzní metoda	25
3.1.2 Diluční metody	27
3.1.3 E-test	29
3.2 Genotypové metody	30

3.2.1	PCR.....	30
3.2.2	Real Time PCR.....	31
3.2.3	DNA microarray.....	32
3.3	Analytické metody.....	33
3.3.1	UV spektrofotometrie.....	33
3.3.2	Hmotnostní spektrometrie.....	33
4	SURVEILLANCE ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE.....	35
4.1	EARS-Net.....	35
4.2	Národní antibiotický program.....	36
4.3	Národní referenční laboratoř pro antibiotika.....	37
5	REZISTENCE KLINICKY VÝZNAMNÝCH BAKTERIÍ.....	38
5.1	<i>Enterococcus faecium</i>	39
5.1.1	Ampicilin.....	39
5.1.2	High-level gentamicin.....	40
5.1.3	Vankomycin.....	40
5.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	42
5.2.1	Methicilin.....	42
5.2.2	Vankomycin.....	43
5.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	44
5.3.1	Karbapenemy.....	44
5.3.2	Cefalosporiny III. generace.....	45
5.3.3	Multirezistence.....	45
6	BUDOUCNOST ANTIMIKROBIÁLNÍ TERAPIE.....	47
6.1	Nová antibiotika.....	47
6.2	Antisense oligonukleotidy.....	47
6.3	Antimikrobiální peptidy.....	48
6.4	Fágová terapie.....	49

7	ZÁVĚR	50
8	LITERÁRNÍ ZDROJE	51

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 Přírodní a syntetická antibiotika	16
Obrázek 2 Možnosti horizontálního přenosu genů antibiotické rezistence.....	19
Obrázek 3 Dávkořáč antibiotických disků.....	26
Obrázek 4 Odeřítání inhibiãních zón na Petriho misce.....	26
Obrázek 5 Bujónová mikrodiluãní metoda.....	28
Obrázek 6 E-test prouřky od výrobce Biomérieux	29
Obrázek 7 Amplifikaãní křivka – Real Time PCR.....	31
Obrázek 8 Dvoumodulový pŕístroj GeneXpert System II od společnosti Cepheid.....	32
Obrázek 9 Pŕůkaz β -laktamáz metodou MALDI-TOF MS	34

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Klinicky významné rezistentní bakterie seřazené dle priority	38
Tabulka 2 Zastoupení rezistentních kmenů rodu <i>Enterococcus faecium</i> v jednotlivých letech v České republice	41
Tabulka 3 Zastoupení methicilin-rezistentních kmenů rodu <i>Staphylococcus aureus</i> v jednotlivých letech v České republice	43
Tabulka 4 Zastoupení rezistentních kmenů rodu <i>Klebsiella pneumoniae</i> v jednotlivých letech v České republice	46

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMP – ampicilin

AMPs – antimikrobiální peptidy

AR – antimikrobiální rezistence

ASO – antisense oligonukleotidy

ATB – antibiotikum

ATP – adenosintrifosfát

β -NAD – β -nikotinamidadenindinukleotid

CLSI – Institut standardů klinických laboratoří

EARS-NET – Evropská síť pro dohled nad antimikrobiální rezistencí

EARSS – Evropský systém sledování antimikrobiální rezistence

ESBL – širokospektré β -laktamázy

EUCAST – Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti

HLG – high-level gentamicin

MALDI-TOF MS – hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem

MBC – minimální baktericidní koncentrace

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MRSA – methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*

NAP – Národní antibiotický program

NRL – Národní referenční laboratoř

PBP – proteiny vázající penicilin

PCR – polymerázová řetězová reakce

qPCR – real-time PCR, PCR v reálném čase

VAN – vankomycin

WHO – světová zdravotnická organizace

ÚVOD

V posledních letech se antibiotická rezistence stává jedním z hlavních témat ve zdravotnictví. Objevení antibiotik sice pro populaci znamenalo obrovský přínos, nicméně nesprávné zacházení s nimi s sebou přináší i značná negativa. Nadměrné a často nesprávné užívání širokého spektra antibiotik velmi úzce souvisí s rozvojem antibiotické rezistence. Odhaduje se, že ročně na světě zemře 700 000 lidí v souvislosti s infekcemi způsobenými rezistentními kmeny bakterií. Podle odhadů Světové zdravotnické organizace WHO by se do roku 2050 mohl tento počet zvýšit až na 10 milionů.

Bakalářská práce se zaměřuje na souhrn poznatků o vývoji antibiotické rezistence u bakterií. Úvodní část práce stručně shrnuje objev antibiotik a jejich vývoj v čase. Dále definuje pojem antibiotická rezistence a popisuje typy rezistence, její mechanismy a možné cesty přenosu. Velká část práce je potom zaměřena na metody zjišťování antibiotické citlivosti u bakterií, a to metody fenotypové, genotypové a analytické. U všech těchto metod je stručně popsán jejich postup, vysvětlen princip a jejich použití v klinických laboratořích. Další část práce se věnuje přehledu klinicky významných rezistentních bakterií, objasňuje epidemiologický monitoring rezistentních kmenů a představuje organizace, které se na něm podílí. Závěr práce potom uvádí budoucnost antibiotik a jejich možnou náhradu.

1 ANTIBIOTIKA

Zavedení antibiotik (ATB) do klinické praxe je považováno za jeden z největších medicínských úspěchů 20. století. Největší podíl mají antibiotika při léčbě infekčních onemocnění, dále ale umožnila rozvoj moderních lékařských postupů, například při transplantaci orgánů, léčbě rakoviny apod. (Hutchings *et al.*, 2019).

1.1 Definice antibiotik

Antibiotikem se rozumí látka, která usmrcuje mikroorganismy nebo jim brání v jejich růstu. V podstatě se jedná o sekundární metabolity produkované bakteriemi (*Actinomyces*, *Streptomyces*) či mikroskopickými houbami (*Penicillium chrysogenum*). V tomto případě se jedná o látky přírodní. Synteticky, tedy čistě chemicky vyráběná antimikrobiální léčiva se pak označují jako chemoterapeutika, řadí se mezi ně například sulfonamidy či chinolony. Pojem antibiotikum se ale často používá jako obecné označení antimikrobiální látky bez ohledu na její původ (Durand *et al.*, 2019).

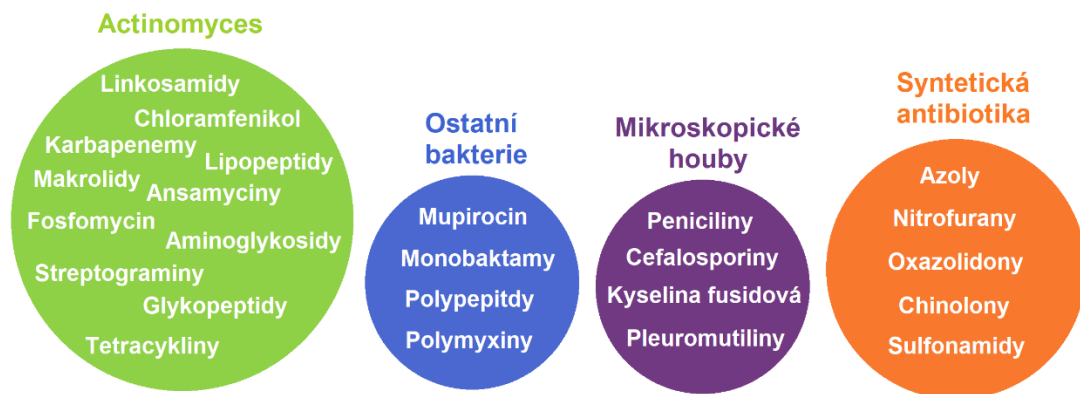
Velmi důležitou vlastností pro úspěšnou antibiotickou léčbu je selektivita účinku těchto látek. Znamená to, že cílí na specifické mikrobiální struktury a lidský organismus víceméně nepoškozují. Mírou toxické selektivity je tzv. chemoterapeutický index. Čím je jeho hodnota vyšší, tím je antibiotikum pro lidský organismus méně toxické a pro léčbu výhodnější (Hutchings *et al.*, 2019).

1.2 Dělení antibiotik

Všeobecně se podle mechanismu účinku antibiotika dělí na baktericidní, která usmrcují bakterie a bakteriostatická, která zastavují jejich růst a množení.

Další možné dělení ATB je na specifická a širokospektrá. Specifická ATB zasahují malé spektrum bakterií, dokonce až jednotlivé rody. Oproti tomu širokospektrá cílí na široké spektrum mikroorganismů, často i na naši vlastní mikroflóru, což je považováno za jednu z nevýhod jejich použití.

Další dělení může být podle mechanismu účinku nebo dle chemického složení ATB (Reygaert, 2018).



Obrázek 1 Přírodní a syntetická antibiotika (Hutchings *et al.*, 2019)

2 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE

2.1 Vývoj

První zmínky a antibiotických látkách můžeme datovat do počátku 20. století. První antibiotikum, salvarsan, bylo nasazeno v roce 1910. Zlatou éru antibiotik odstartoval Alexander Fleming, který v roce 1928 objevil penicilin. Do klinické praxe bylo toto ATB zavedeno v roce 1940, ovšem již před tím byly popsány penicilin-rezistentní kmeny rodu *Staphylococcus*. V roce 1959 byl do praxe zaveden methicilin a jen o rok později, v roce 1960, byly popsány první methicilin-rezistentní kmeny rodu *Staphylococcus*. Na léčbu infekcí způsobených methicilin-rezistentními kmeny bakterií byl v roce 1958 na trh uveden vankomycin. O několik desetiletí později byly zaznamenány vankomycin-rezistentní kmeny rodu *Enterococcus*, následně i kmeny rodu *Staphylococcus*. Dalším příkladem je antibiotikum tetracyklin, který byl uveden na trh v roce 1950. Tetracyklin-rezistentní kmeny rodu *Shigella* byly hlášeny o 9 let později, tedy v roce 1959 (Christaki *et al.*, 2020).

2.2 Definice

Antibiotická rezistence (AR) je definována jako schopnost mikroorganismu přežít a být životaschopný pod vlivem působení antibiotik (Abushaheen *et al.*, 2020).

Rozsáhlé a často nesprávné používání antibiotik vedlo u bakterií k rozvoji AR, která dnes představuje celosvětový problém. AR představuje pro společnost obrovskou zátěž. Odhaduje se, že jen v Evropské Unii se ročně vyskytne více než 670 000 infekcí způsobených rezistentními kmeny patogenních mikroorganismů. Obecně jde o to, že stoupá odolnost mikroorganismů vůči působení antibiotik, díky čemuž narůstá morbidita a mortalita, s čímž souvisí i zvýšení nákladů na zdravotní péči. Rezistence bakterií vůči antibiotikům může být přirozená či získaná (Kakoullis *et al.*, 2021).

2.3 Přirozená rezistence

Přirozená neboli primární rezistence je určena druhem bakterie a jejími přirozenými vlastnostmi. Nezávisí na předchozím kontaktu bakterie s daným ATB a je geneticky podmíněná, to znamená, že se šíří v rámci jednoho bakteriálního druhu. Některé bakterie mají unikátní strukturní či funkční charakteristiky, které jim umožňují být rezistentní vůči určitým druhům antibiotik. Tyto skupiny bakterií se zpravidla vyznačují tím, že postrádají cílovou strukturu pro ATB, čímž je zamezeno jejich správnému účinku, nebo produkují enzymy proti daným antibiotikům (Abushaheen *et al.*, 2020).

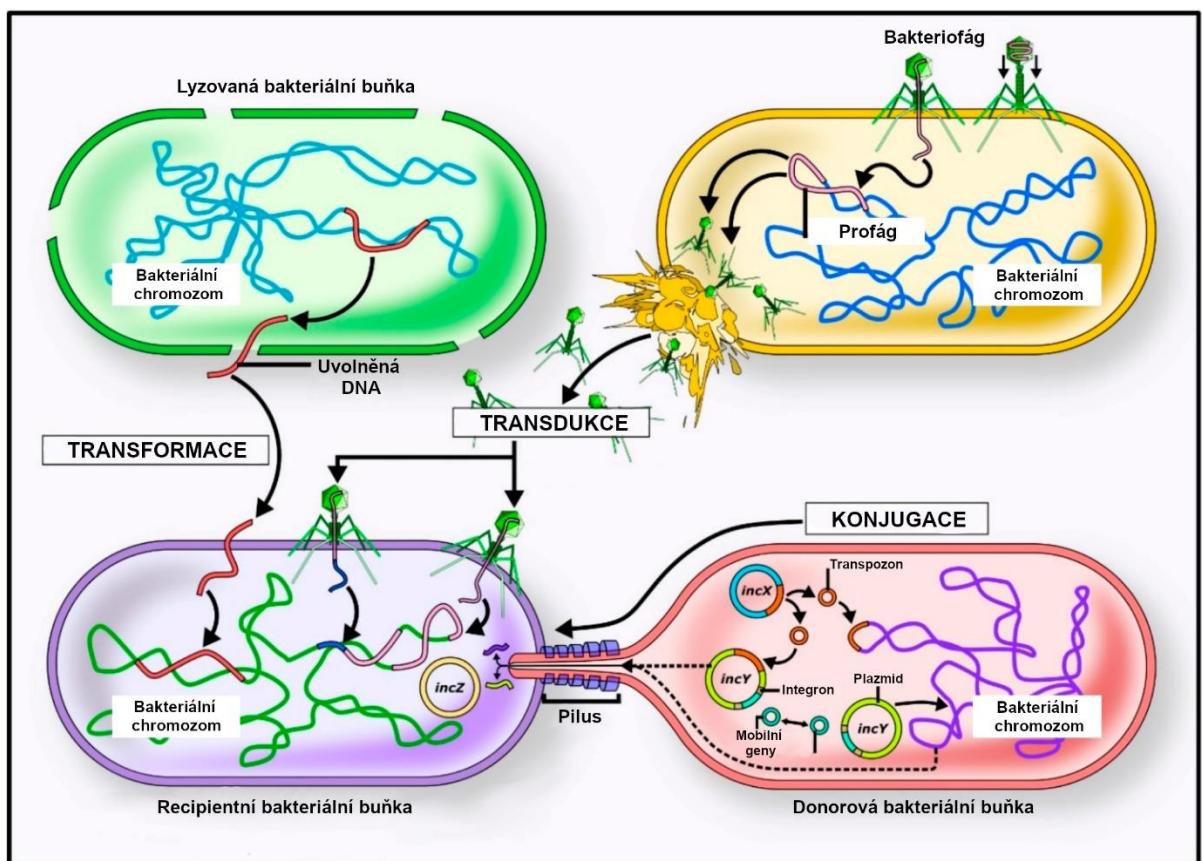
Příkladem přirozeně rezistentních bakterií mohou být gramnegativní bakterie přirozeně rezistentní vůči beta-laktamům či glykopeptidům, např. penicilin-rezistentní *Pseudomonas aeruginosa*, vankomycin-rezistentní *Neisseria gonorrhoeae*. Rezistence je pravděpodobně způsobena rozdílným složením buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií. (Christaki *et al.*, 2020).

Primární rezistence se využívá při kultivaci na selektivních půdách. Tyto půdy obsahují přísadu určitého množství antibiotika, vůči kterému je bakterie přirozeně rezistentní, čímž docílíme nárůstu požadovaného druhu bakterie. Oproti tomu ostatní druhy citlivé vůči danému antibiotiku na takové půdě nenarostou. Příkladem je selektivní půda s bacitracinem pro kultivaci hemofilů nebo půdy s vankomycinem určené k záchytu patogenních neisserií (Van Camp *et al.*, 2020).

2.4 Získaná rezistence

Oproti primární rezistenci, která není nijak ovlivněna selektivním tlakem antibiotik, rezistence získaná neboli sekundární se projeví až po vystavení bakterie účinkům daného antibiotika (Culyba *et al.*, 2015). Znamená to, že bakterie, která byla původně vůči antibiotiku citlivá, se nyní stává rezistentní. Získaná rezistence může být dočasná nebo trvalá a představuje mnohem větší riziko než rezistence primární (Reygaert, 2018).

Zpravidla může tento typ rezistence bakterie získat mutací jednoho či více genů, které se pak přenáší vertikálně, to znamená do dceřiných buněk při dělení. Mutace ovlivňující AR postihují pouze malé množství genů, jako jsou geny kódující cílové struktury pro ATB, transportéry ATB nebo enzymy modifikující ATB. Nebo může bakterie získat geny kódující rezistenci od jiné bakteriální buňky, a to horizontálním přenosem. Horizontální cesta přenosu je častější způsob získání AR, která se tak může šířit i mezi jednotlivými druhy bakterií. Mezi způsoby horizontálního přenosu se řadí transformace, transdukce a konjugace (Christaki *et al.*, 2020).



Obrázek 2 Možnosti horizontálního přenosu genů antibiotické rezistence (Bello-Lopez a Cabrero-Martinez, 2019)

2.4.1 Transformace

Transformací se označuje jev, kdy recipientní bakteriální buňka přijme část DNA od donorové bakteriální buňky a začlení ji do svého chromozomu. Dochází zde k přenosu pouze malých fragmentů DNA o velikosti asi 10 genů, větší fragmenty by totiž mohly být enzymaticky degradovány. Tato DNA je pro recipientní buňku cizorodá a pochází z narušených či lyzovaných bakteriálních buněk, ale mohou ji aktivně uvolňovat i buňky živé (Christaki *et al.*, 2020).

Proces transformace probíhá tak, že donorová a recipientní buňka spolu nejsou v kontaktu. Recipient přijímá genetický materiál z okolního prostředí. Nejprve dojde k přichycení tohoto materiálu na buněčnou stěnu, následně k průniku do cytoplazmy pomocí transmembránových přenašečů, a nakonec k inkorporaci do vlastní bakteriální DNA (Abushaheen *et al.*, 2020).

Pouze asi 1 % bakteriálních buněk je schopných přirozené transformace. Tento způsob získání genů pro antibiotickou rezistenci byl prokázán například u bakterií *Neisseria gonorrhoeae*, *Vibrio cholerae* či *Streptococcus pneumoniae* (McInnes *et al.*, 2020).

2.4.2 Transdukce

Transdukci se rozumí přenos genetického materiálu mezi dvěma bakteriálními buňkami pomocí virové částice, která se nazývá bakteriofág (Christaki *et al.*, 2020).

Bakteriofág napadá bakteriální buňky, dochází k adsorpci této částice na povrch bakteriální buňky (u grampozitivních bakterií většinou za účasti kyseliny teichoové v bakteriální buněčné stěně). Následuje replikace fágové DNA, syntéza mRNA a fágových proteinů a následná tvorba nových fágových částic.

Mechanismus transdukce není zcela objasněn, nicméně velmi pravděpodobně zde dochází k chybnému sestavování fágových částic v infikované bakteriální buňce, kdy dojde k inkorporaci bakteriální DNA do hlavy fága namísto replikované fágové DNA. Takto vytvořená virová částice následně přenáší genetickou informaci na další bakteriální buňku (Lerminiaux a Cameron, 2019).

Horizontální přenos genetické informace formou transdukce je hojně popsán například u rodu *Staphylococcus*, zejména pak u *Staphylococcus aureus* (Abushaheen *et al.*, 2020).

2.4.3 Konjugace

Při konjugaci je třeba přímého kontaktu dvou bakteriálních buněk. Opět se jedná o buňku donorovou a buňku recipientní. Mezi těmito buňkami dojde při jejich spojení k tvorbě tzv. konjugačního aparátu, jehož významnou strukturou je pilus (zejména u gramnegativních bakterií). Takto vytvořené spojení je krátkodobé, proto je pro bakterie výhodné předávat si konjugací pouze krátké oblasti genů, například R-plazmidy (malé kruhové molekuly DNA, které jsou schopny se samy replikovat).

Konjugace je pro bakterie nejzásadnějším a vědci nejvíce prostudovaným horizontálním přenosem genů pro AR. Tímto způsobem si mohou geny rezistence předávat i nepříbuzné bakteriální kmeny (Bello-Lopez a Cabrero-Martinez, 2019).

2.5 Mechanismy rezistence

Mechanismy antibiotické rezistence se dělí do 4 hlavních kategorií, omezení průniku antibiotika do bakteriální buňky, změna cílových struktur, inaktivace bakteriálními enzymy, aktivní odčerpání (eflux) antibiotika z bakteriální buňky.

U přirozené rezistence se může uplatnit omezení průniku ATB, inaktivace ATB či eflux. U rezistence získané se pak uplatňuje modifikace cílového místa, inaktivace ATB a eflux.

Byly též prokázány rozdíly mezi mechanismy rezistence u gramnegativních a grampozitivních bakterií. Tyto rozdíly jsou dány především rozdílnou strukturou bakteriální stěny. Gramnegativní bakterie mohou využít všech 4 typů mechanismu ATB rezistence. Oproti tomu bakterie grampozitivní využívají méně často efluxní systémy a omezení průniku ATB do buňky z důvodu chybějící vnější lipopolysacharidové membrány (Reygaert, 2018).

2.5.1 Omezení průniku antibiotika do buňky

Ač mají grampozitivní bakterie silnější buněčnou stěnu, přítomnost lipopolysacharidů v buněčné stěně gramnegativních bakterií představuje určitou bariéru před průnikem ATB. Jedná se o přirozenou rezistenci těchto bakterií. Podobný princip využívají mykobakterie, jejichž buněčná stěna obsahuje vysoký obsah lipidů, proto hydrofilní ATB jejich buněčnou stěnou neprochází. Oproti tomu hydrofobní látky, jako např. rifampicin, což je běžně užívané antituberkulotikum, mají do buňky snadnější přístup (Reygaert, 2018).

Hlavní cestou vstupu hydrofilních ATB (jako jsou β -laktamy, fluorochinolony, tetracykliny, chloramfenikol) skrz bakteriální membránu gramnegativních bakterií jsou integrální proteiny, tzv. poriny. Jejich počet ovlivňuje vstup hydrofilních ATB do buňky, tudíž i náchylnost bakteriální buňky k nim. Získaná rezistence pak může vzniknout mutacemi genů kódujících tvorbu či funkci porinů (Christaki *et al.*, 2020).

2.5.2 Změna cílových struktur

Navázání ATB na cílovou strukturu je jedním z mechanismů účinku antimikrobiálních látek. Jakmile dojde k modifikaci této struktury, dojde zároveň ke snížení afinity ATB k tomuto místu a ATB tak ztrácí svoji schopnost ovlivňovat bakteriální buněčné procesy (Hutchings *et al.*, 2019).

Typickým příkladem je rezistence vůči β -laktamům, kdy dochází ke změně struktury nebo počtu PBP (z angl. Penicilin Binding Proteins), tedy proteinů vázajících penicilin. Jedná se o transpeptidázy, které jsou součástí buněčné stěny zejména grampozitivních bakterií. Změna počtu či struktury PBP ovlivní množství ATB, které se může na tento cíl vázat. S tím následně souvisí snížení či inhibice účinku daného léčiva (Kakoullis *et al.*, 2021).

2.5.3 Inaktivace bakteriálními enzymy

Produkce enzymů inaktivujících antibiotika je jedním z hlavních mechanismů přirozené rezistence. ATB obsahují velké množství chemických vazeb, které vlivem bakteriálních enzymů podléhají hydrolýze, což vede k inaktivaci ATB (Peterson a Kaur, 2018).

Příkladem takových inaktivujících enzymů jsou β -laktamázy. Jedná se o skupinu enzymů, které rozkládají β -laktamový kruh, tedy hlavní strukturu β -laktamových ATB. Narušením této struktury nejsou β -laktamy schopny vazby na jejich cílové PBP proteiny v bakteriální membráně. Tyto enzymy mohou být součástí přirozené rezistence nebo může být jejich produkce kódována přeneseným plazmidem. Produkují je bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, dále *Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. Ale mohou je produkovat i grampozitivní bakterie, zejména potom *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* či *Enterococcus faecium*.

Jedná se o nejběžnější mechanismus penicilinové a cefalosporinové rezistence (Reygaert, 2018).

2.5.4 Bakteriální eflux

Dalším běžně užívaným mechanismem AR je aktivní odčerpání ATB, tedy eflux z bakteriální buňky. Obvykle se vyskytuje ve spojení s dalšími mechanismy, jako je modifikace ATB či modifikace cílové struktury (Christaki *et al.*, 2020).

Efluxní čerpadla jsou proteinové systémy přítomné na bakteriální cytoplazmatické membráně, které jsou schopné odčerpávat ATB z intracelulárního prostoru, čímž sníží koncentraci ATB v bakteriální buňce a zároveň tak sníží jeho účinnost. energii získávají zejména hydrolýzou ATP.

Bakteriální eflux se uplatňuje například u rezistence na tetracykliny, makrolidy, fluorochinolony. Tyto systémy však nemusí transportovat pouze jeden druh léčiva, naopak jsou často schopny transportu široké škály sloučenin. Označují se pak jako multi-drug efluxní čerpadla (Peterson a Kaur, 2018).

3 METODY ZJIŠŤOVÁNÍ ANTIBIOTICKÉ CITLIVOSTI

Při zpracování biologického materiálu v klinické laboratoři je jedním z cílů mikrobiologa určit mikroorganismus, který může být patogenem a způsobovat pacientovi klinické obtíže. Druhým cílem je pak stanovit antibiotickou citlivost zjištěného mikroorganismu, což je důležité jednak pro nasazení účinné antibiotické léčby, ale také pro monitorování výskytu a šíření rezistentních bakterií (Maugeri *et al.*, 2019).

Výstupem těchto metod jsou údaje kvalitativní, ale i kvantitativní. Kvalitativní údaje poskytují informace o tom, zda je bakterie vůči antibiotiku citlivá, či ne. Metody kvantitativní pak určují hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC). Naměřené hodnoty citlivosti jednoho bakteriálního kmene vůči různým antibiotikům se pak označují jako antibiogram (Khan *et al.*, 2019).

MIC je definována jako nejnižší koncentrace antibiotika, která je schopna zabránit růstu bakterií. Její hodnoty se vyjadřují v mg/ml, případně v mg/l. Z této definice vyplývá, že vystavení bakterie MIC ještě neznamená buněčnou smrt. MIC se tedy liší od MBC (minimální baktericidní koncentrace). MBC je nejnižší koncentrace antibiotika potřebná k usmrcení mikroorganismu (Syal *et al.*, 2017).

Zjištěné hodnoty MIC se poté porovnávají s tzv. breakpointy. Breakpoint je hraniční koncentrace antibiotika, na jejímž základě je daný bakteriální kmen rezistentní, citlivý, případně citlivý jen při zvýšené expozici. Breakpointy jsou mezinárodně přijaté standardy, které jsou každoročně přezkoumávány a aktualizovány organizacemi jako je Institut standardů klinických laboratoří (CLSI, z angl. Clinical and Laboratory Standards Institute) v USA nebo Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST, z angl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) v Evropě. Stanovování MIC slouží nejen k určení mikroba a jeho antibiotické citlivosti, ale i k epidemiologickému monitorování vývoje AR. Zvýšení hodnot MIC pro dané antibiotikum v průběhu času může znamenat získanou rezistenci vůči tomuto ATB daného bakteriálního druhu (Syal *et al.*, 2017).

V roce 2019 EUCAST změnil definice kategorií testování citlivosti. C (citlivý) značí, že při standardním dávkovacím režimu je mikroorganismus definován jako citlivý. I (citlivý při zvýšené expozici, dříve označován jako intermediálně citlivý) znamená, že je mikroorganismus definován jako citlivý pouze při zvýšené expozici antimikrobiálního přípravku. R (rezistentní) značí, že je mikroorganismus definován jako rezistentní při standardní i zvýšené expozici ATB (SZÚ, 2019).

3.1 Fenotypové metody

3.1.1 Disková difuzní metoda

Standardizovaná disková difuzní metoda je jednou z nejstarších metod. Byla zavedena v roce 1956. Přesto se v laboratořích klinické mikrobiologie jedná o nejpoužívanější metodu. Je totiž cenově dostupná a je vhodná k testování většiny bakteriálních druhů a téměř všech antibiotik (Khan *et al.*, 2019).

Pro kultivaci se využívají pevné půdy, které si mohou laboratoře připravit samy, nebo mohou využít komerčně připravených půd. Standardní půdou je MH (Mueller-Hinton) agar. Pro náročnější bakterie se doporučuje použít MH agar obohacený o 5 % defibrinované koňské krve a 20 mg/l β -NAD. Mezi takové bakterie se řadí například *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Corynebacterium spp.*, *Campylobacter jejuni* a další. MH agar je v Petriho miskách o průměru 90-150 mm, výška půdy je 3,5-4,5 mm (EUCAST, 2021a).

Obecný postup spočívá v přípravě bakteriální suspenze odpovídající zákalu 0,5 stupně McFarlandovy zákalové stupnice. Využívá se čistá bakteriální kultura (12-24 hodinová), která se bakteriologickou kličkou rozetře ve zkumavce s fyziologickým roztokem do požadovaného zákalu, který se ověří denzitometrem. Takto připravená suspenze se očkuje na MH agar sterilním tamponem či přelitím půdy, a to v rozmezí 15-60 minut od její přípravy. Do 15 minut se na inokulovanou půdu pokládají antibiotické disky, a to až 6 disků na jednu plotnu. Jedná se o komerčně vyráběné papírové kroužky impregnované danou koncentrací antibiotika. Disky se na plotny aplikují buď ručně přímo ze zásobníků, nebo speciálními antibiotickými dávkovači. Plotny se následně inkubují v zavěšené poloze při 36 °C 20 hodin (EUCAST, 2021a).

Princip metody spočívá v tom, že při inkubaci dojde k rozptýlení (difuzi) ATB do půdy okolo disku a tím k vytvoření inhibičních zón. Pokud je totiž bakterie vůči ATB v disku citlivá, okolo disku nedojde k jejímu růstu. Měření inhibičních zón a jejich porovnání s breakpointy poté stanoví citlivost daného kmene (Dietvorst *et al.*, 2020).



Obrázek 3 Dávkovač antibiotických disků (EUCAST, 2021a)



Obrázek 4 Odečítání inhibičních zón na Petriho misce (EUCAST, 2021a)

3.1.2 Diluční metody

Diluční metody jsou oproti metodám difuzním metodami nejen kvalitativními, ale navíc i kvantitativními. Mohou totiž stanovit MIC. Samotné vyšetření se provádí na pevných agarových půdách či ve zkumavkách s tekutým bujónem. Podle množství použitého média se potom dělí na mikro a makro metody (Khan *et al.*, 2019).

3.1.2.1 Bujónová makrodiluční metoda

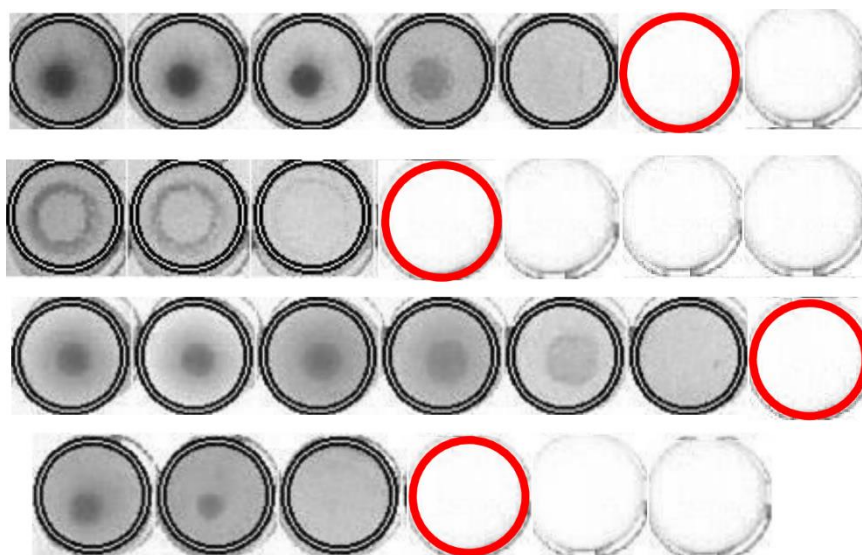
Při použití této metodiky se často používá 12 zkumavek se vzorky, 13. zkumavka slouží jako pozitivní kontrola, tedy kontrola nárůstu testovaného bakteriálního kmene. Do zkumavek se pipetuje 1 ml živného média (bujónu), stejné množství roztoku ATB o různých testovaných koncentracích a stejné množství bakteriální suspenze odpovídající zákalu 0,5 stupně McFarlandovy zákalové stupnice. Takto připravené vzorky se promíchají a nechají inkubovat při 36 °C 20 hodin. Následně se odečítají výsledky. Hodnota MIC odpovídá té zkumavce, která postrádá viditelný zákal. Všechny zkumavky se vzorky se porovnávají se zkumavkou kontrolní-bez ATB.

Jedná se o metodu zdlouhavou a poměrně pracnou, proto se v klinických laboratořích nevyužívá a slouží spíše k výzkumným účelům (Syal *et al.*, 2017).

3.1.2.2 Bujónová mikrodiluční metoda

Pro zjednodušení předchozí metody byly vyvinuty plastové mikrotitrační destičky o 96 jamkách, což odpovídá 8 řadám a 12 sloupcům. Je tak možné testovat 12 antibiotik, každé o 8 různých koncentracích. Do jamek se pipetuje znatelně menší objem média (např. 0,1 ml) a stejně malý objem roztoků antibiotik a bakteriální suspenze. Výhodné je využít mechanizované dávkovače či multikanálové pipety (Syal *et al.*, 2017).

Růst daného bakteriálního kmene se projeví jako zákal nebo usazenina na dně jamky. V jamkách s kónickým dnem můžeme pozorovat peletku z bakteriálních buněk. Při manuálním odečtu se využívá hodnocení proti tmavému pozadí. MIC se stanovuje jako nejnižší koncentrace ATB, která zcela inhibuje růst daného bakteriálního kmene. To odpovídá jamce bez zákalu (EUCAST, 2021b).



Obrázek 5 Bujónová mikrodiluční metoda – odečítání MIC v jamkách mikrotitrační destičky (EUCAST, 2021b)

Kromě manuálního zpracování dilučních metod je možné využít také automatizovaných přístrojů, což přináší větší přesnost a spolehlivost. Takovou možnost představují např. MicroScan WalkAway, Vitek, BD Phoenix nebo Sensititre. Tyto přístroje využívají k měření MIC fotometrickou detekci zákalu či měření intenzity fluorescence v případě plně automatického Sensititre. Navíc jsou rozšířeny o identifikační panely, takže kromě stanovení MIC jsou schopny také identifikace testovaného bakteriálního kmene.

Tyto přístroje se řadí k nejmodernějším technologiím v měření citlivosti bakterií vůči ATB. Ve srovnání s manuálními metodami zajišťují snadnější pracovní postup a větší přesnost metody. Nicméně jejich nevýhodou je jejich velikost, vysoká pořizovací cena a čas potřebný pro vyhodnocení výsledků. Ten se příliš neliší od metod manuálních (Syal *et al.*, 2017).

3.1.2.3 Agarová diluční metoda

Jak bylo řečeno výše, diluční metody nemusí být prováděny pouze v tekutém médiu. Bakteriální kmeny mohou být inokulovány na pevné agarové půdy s příměsí testovaných antibiotik o 12 koncentracích.

Princip metody je stejný jako u použití tekutých půd. Na plotnách se po inkubaci hodnotí nárůst testovaného kmene. MIC odpovídá takové koncentraci ATB, u které k růstu nedošlo.

Jelikož se jedná o metodu pracnou a zdlouhavou, nenachází v klinických laboratořích přílišného využití. Často se používá v kombinaci s jinými metodami jako metoda srovnávací (Dietvorst *et al.*, 2020).

3.1.3 E-test

E-test byl vyvinut v 90. letech minulého století. Jedná se o komerčně vyráběný plastový proužek, který je napuštěn logaritmicky se snižujícími koncentracemi ATB. Na zadní straně proužku je potom stupnice odpovídajících koncentrací ATB, která slouží k odečítání MIC.

Postup provedení E-testu spočívá v inokulaci testovaného bakteriálního kmene na pevnou půdu, na kterou se umístí proužek napuštěný ATB. Po následné inkubaci (36 °C, 20-24 hodin) se odečte výsledek. Kolem testovacího proužku dojde k vytvoření inhibiční zóny eliptického tvaru. Hodnota MIC se odečítá v místě, kde vzniklá elipsa protíná okraj proužku.

E-test představuje kombinaci dilučních a difuzních metod a jeho hlavními výhodami jsou jednoduchost, přesnost, spolehlivost, dostupnost (Khan *et al.*, 2019).



Obrázek 6 E-test proužky od výrobce Biomérieux (Biomérieux, 2019)

Společnost Biomérieux kromě klasického provedení E-testu nabízí i testovací proužky pro detekci ESBL, tedy širokospektrých beta-laktamáz. Tyto enzymy často produkují bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, jako např. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* či *Klebsiella oxytoca* (Biomérieux, 2019).

3.2 Genotypové metody

Genotypové nebo také molekulární metody napomáhají rozlišit jednotlivé mechanismy AR a jsou stále častěji používanými metodikami ke stanovení antibiotické citlivosti. Identifikace genotypů AR probíhá jako detekce genů rezistence a charakterizace mutací v těchto genech.

Když pomíneme pořizovací cenu přístrojů, přináší jejich použití řadu výhod. V první řadě je to rychlost. Jelikož identifikace probíhá přímo z klinického vzorku pacienta (plná krev, sérum, moč), dochází zde k eliminaci dlouhé doby kultivace. S tím souvisí i odbourání možné kontaminace vzorku při zdlouhavém zpracování v laboratoři. Dalšími výhodami jsou větší citlivost a přesnost (Maugeri *et al.*, 2019).

3.2.1 PCR

PCR (z angl. Polymerase Chain Reaction) neboli polymerázová řetězová reakce je molekulární metoda založená na principu replikace bakteriální DNA. Pro správný průběh metody je zásadní enzym DNA polymeráza (např. Taq polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*). PCR probíhá ve 3 fázích, denaturace DNA, navázání primerů a elongace řetězce. Tyto fáze se opakují v po sobě jdoucích cyklech. V 1 cyklu vznikají z 1 molekuly DNA její 2 kopie. Takových cyklů při jednom testování proběhne 30-60, čímž dojde k vytvoření miliónů kopií původní DNA (Sreejith *et al.*, 2018).

Výsledkem takto provedené metody PCR je tedy pouze namnožená templátová DNA. Tudíž je potřeba použít další techniky na její vyhodnocení. Výsledné produkty PCR mohou být dále podrobeny elektroforéze (gelové nebo kapilární) či hybridizačním metodám (typickým příkladem je Southern Blotting).

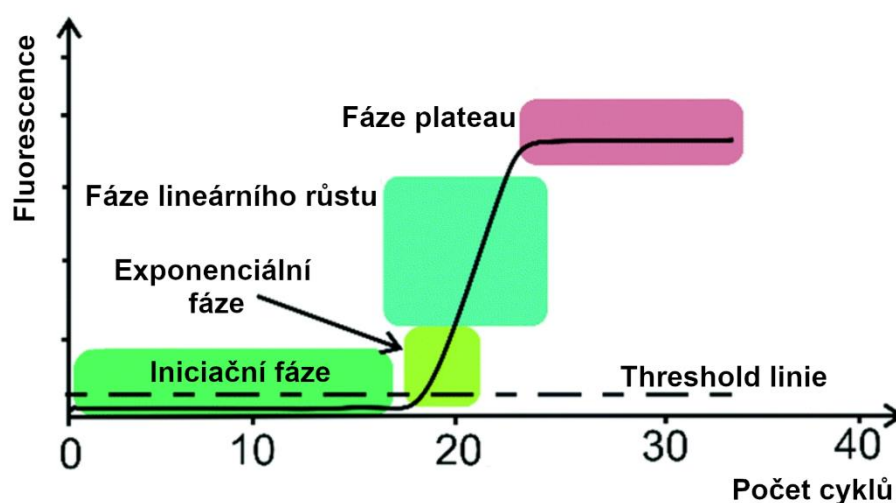
PCR je metoda spolehlivá, avšak nedá se považovat za nejúčinnější způsob screeningu rezistence u různých bakteriálních druhů, jelikož na trh přichází stále nové metody, které umožňují současnou analýzu velkého počtu genů AR (Dark *et al.*, 2009).

3.2.2 Real Time PCR

Metoda PCR v reálném čase (qPCR) vychází z konvenční PCR metody. Avšak oproti předchozí zmíněné poskytuje kvantitativní výstupy. Během qPCR dochází k monitoringu produktů v průběhu reakčních cyklů pomocí fluorescenčních barviv. Tato barviva se váží na vznikající DNA a následně vyzařují fluorescence, která je přímo úměrná koncentraci PCR produktů (Valones *et al.*, 2009).

V počátku reakce nastává iniciační fáze, která následně přechází do fáze exponenciálního růstu, kdy se exponenciálně zvyšuje koncentrace nových DNA molekul a s ní i fluorescence. Vlivem postupného odčerpávání substrátu se kinetika reakce zpomaluje, koncentrace nových DNA molekul přechází z exponenciálního do lineárního růstu. Nakonec dochází k úplnému vyčerpání substrátu a nastává fáze „plateau“.

Cyklus, ve kterém stoupla fluorescence nad práh pozadí a byla zaznamenána detektorem, se potom značí jako C_t (cycle of threshold). Velikost této hodnoty je nepřímo úměrná množství počáteční templátové DNA, které se dá na základě C_t určit (Sreejith *et al.*, 2018).



Obrázek 7 Amplifikační křivka – závislost fluorescence na počtu proběhnutých cyklů metodou Real Time PCR (Sreejith *et al.*, 2018)

Jednou z možností přístrojového zpracování qPCR nabízí GeneXpert od firmy Cepheid. Přístroj je vyráběn ve 4 variantách podle počtu modulů (1-4). Jedná se o plně automatizovanou platformu, která poskytuje přesné výsledky v krátkém čase a umožňuje testování široké škály bakteriálních kmenů, například MRSA, vankomycin-rezistentní *Enterococcus* či *Mycobacterium tuberculosis* a její rezistenci k rifampicinu (Biovendor LM[®], 2021).



Obrázek 8 Dvoumodulový přístroj GeneXpert System II od společnosti Cepheid
(Biovendor LM[®], 2021)

3.2.3 DNA microarray

DNA microarrays nebo také DNA mikročipy jsou molekulární metodou využívající princip hybridizace. Součástí metody je skleněná nebo silikonová destička (čip), která obsahuje řádově statisíce jednořetězcových DNA oligonukleotidů. Ty jsou na destičce pevně ukotveny. Jakmile se na destičku přidá vzorek, dojde k hybridizaci DNA oligonukleotidů vzorku s komplementárními oligonukleotidy na destičce. Tato místa jsou následně podrobena detekci (často fluorescenčními technikami), ta určí, které oligonukleotidy vzorek obsahuje.

Postup spočívá ve vytvoření DNA sond, případně použití komerčně vyráběných (např. firmou Affymetrix), následuje přidání vzorku, hybridizace, skenování čipu, zpracování výsledků a analýza dat (Khan *et al.*, 2019).

Pomocí DNA čipů byla odhalena isoniazid-rezistentní *Mycobacterium tuberculosis*. Využívají se i k detekci producentů β -laktamáz (Hammoudi *et al.*, 2014).

3.3 Analytické metody

3.3.1 UV spektrofotometrie

V současné době je zaznamenán výskyt bakterií produkujících karbapenemázy, např. *Klebsiella pneumoniae*. Karbapenemázy jsou enzymy hydrolyzující většinu β -laktamových ATB, zejména pak karbapenemy. Léčba infekcí způsobených takto rezistentními bakteriemi je pak významně omezena. Proto je hlavním cílem snížit šíření těchto rezistentních kmenů.

Jednou z metod, kterou je možné použít k detekci producentů karbapenemáz, je UV spektrofotometrie. Princip spočívá v hydrolyze karbapenemu, např. imipenemu. Pokud k ní v testovaném vzorku dojde, jedná se o pozitivní průkaz karbapenemázy. Produkty hydrolyzy se pak detekují při vlnové délce 297 nm v UV spektrofotometru.

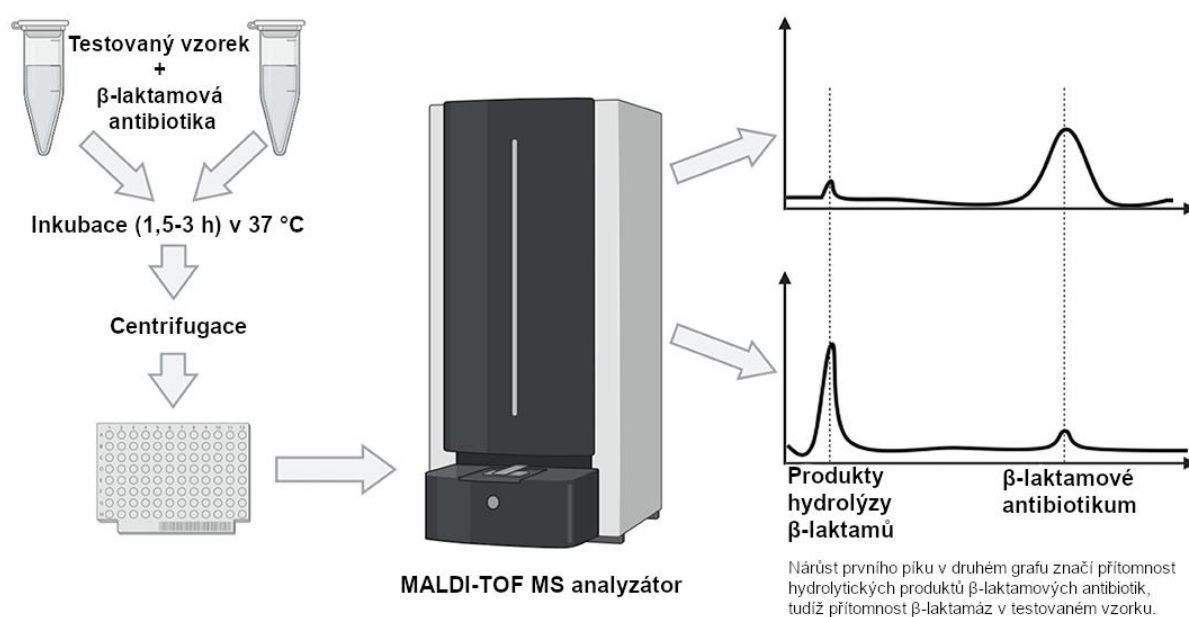
Tato metoda je sice poměrně levná a spolehlivá, nicméně je časově a technicky náročná, proto je využívána pouze v referenčních laboratořích (Hammoudi *et al.*, 2014).

3.3.2 Hmotnostní spektrometrie

Principem hmotnostní spektrometrie je laserová ionizace neutrálních molekul ve vzorku za vzniku iontů. Ty jsou následně ve spektrometru děleny podle podílu jejich hmotnosti a náboje. Výsledkem takové metody je potom soubor hmotnostních spekter, která jsou charakteristická pro každou chemickou sloučeninu (Cordovana *et al.*, 2019).

Příkladem takové metody je MALDI-TOF MS (z angl. Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry). Jak z názvu vyplývá, tato metoda využívá vhodnou matici (např. derivát kyseliny skořicové), která je přidána ke vzorku. Ta slouží k absorpci energie procházejícího laserového paprsku, následně dochází k její excitaci, a to způsobí ionizaci samotného vzorku. Ionty jsou pak urychleny působením silného elektrického pole a vstupují do trubice detektoru. Rychlost jejich pohybu je přímo úměrná jejich hmotnosti a velikosti náboje. Výsledkem je pak soubor hmotnostních spekter, která jsou v rámci mikroorganismů druhově specifická a jsou porovnávána s referenčními spektry v databázi přístroje (Florio *et al.*, 2020).

MALDI-TOF MS poskytuje rychlou a spolehlivou detekci rezistentních kmenů bakterií a tímto přístrojem jsou již vybaveny klinické laboratoře (Cordovana *et al.*, 2019).



Obrázek 9 Průkaz β-laktamáz metodou MALDI-TOF MS (Florio *et al.*, 2020)

4 SURVEILLANCE ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE

Je to více než 70 let, co se antibiotika stala běžnou součástí lidského života. Na jedné straně výrazně pomohla při léčbě bakteriálních infekcí a při prevenci jejich výskytu, čímž došlo k prodloužení průměrné délky života. Na straně druhé je tu problém s jejich nesprávným užíváním, často nadužíváním.

Využití ATB nesouvisí jen s humánní medicínou, ale tyto látky jsou užívány i jako veterinární přípravky a jejich spotřeba roste i v zemědělském či potravinářském průmyslu. Odhaduje se, že od roku 1940 byla celosvětově vyrobena více než miliarda tun ATB. Toto nadužívání vede k vylučování ATB do životního prostředí a k neustálému zvyšování míry rezistence bakteriálních kmenů (Serwecinska, 2020).

AR představuje globální hrozbu a je nutné ji určitým způsobem monitorovat. Epidemiologický monitoring je nazýván jako surveillance. Zároveň je nutná mezinárodní spolupráce, a to na úrovni tvůrců pravidel, zdravotníků, jednotlivců i jednotlivých odvětví průmyslu. Na všech úrovních společnosti by měly být podstoupeny kroky jako je zavádění národních akčních plánů na řešení AR, regulace používání ATB, dostatečné informování veřejnosti o dopadu AR, předpis ATB zdravotníkem jen v případě, kdy je to nutné, hlášení rezistentních bakteriálních kmenů příslušným institucím, informování pacientů zdravotníkem o správném užívání ATB a prevenci infekcí, uposlechnutí rad odborníka při používání ATB, investice do výzkumu a vývoje nových ATB, diagnostických postupů a dalších nástrojů, zamezení používání ATB pro podporu růstu nebo prevence nemocí zvířat, dále vakcinace zvířat a zlepšení hygieny a životních podmínek (WHO, 2020).

4.1 EARS-Net

V roce 1998 vydala Evropská komise doporučení pro surveillance AR na území Evropy. Na základě tohoto doporučení byl založen projekt EARSS (z angl. European Antimicrobial Surveillance System, Evropský systém sledování antimikrobiální rezistence), který shromažďoval údaje o AR v Evropě od roku 1999 do roku 2009 (ECDC, 2021a).

V roce 2010 přebralo koordinaci ECDC (z angl. European Centre for Disease Prevention and Control, Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí) a projekt byl přejmenován na EARS-Net (z angl. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, Evropská síť pro dohled nad antimikrobiální rezistencí). Úkolem EARS-Net je shromažďovat a analyzovat aktuální informace o AR u klinicky významných patogenů. Do roku 2000 byly sledovány bakterie *Streptococcus pneumoniae* a *Staphylococcus aureus*. V roce 2001 byl zahájen monitoring *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*, v roce 2005 *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa* a v roce 2013 započalo sledování rodu *Acinetobacter* spp. Výsledky jsou potom interpretovány dle breakpointů jednotlivých antibiotik od EUCAST na webových stránkách EARS-Net.

Hlavním cílem EARS-Net je snížení a prevence šíření AR. Aktivity EARS-Net podporuje Evropský parlament a Rada Evropské unie. V současné době je do projektu EARS-Net zapojeno více než 1000 mikrobiologických laboratoří z 28 zemí Evropy. Česká republika je součástí tohoto projektu od roku 2000 (SZÚ, 2021).

4.2 Národní antibiotický program

Národní antibiotický program (NAP) je program, který schvaluje Vláda České republiky, a který má za cíl zajistit dlouhodobě dostupnou, účinnou, bezpečnou a ekonomicky efektivní ATB léčbu pacientů s infekčními onemocněními. Zároveň by měl vést ke snižování šíření AR v humánní i veterinární medicíně (SZÚ, 2009).

V souvislosti s varováním WHO schválila 28.1.2019 Vláda České republiky akční plán Národního antibiotického programu pro období 2019-2022 (SÚKL, 2019).

Hlavní cíle NAP se mohou klasifikovat jako surveillance AR, zodpovědné používání ATB, zlepšení informovanosti a posílení spoluodpovědnosti společnosti, vytvoření metodické infrastruktury, preventivní opatření a kontrola infekcí, podpora výzkumu a vývoje (MZČR, 2019).

Do NAP by se měly zapojovat jednotlivé subjekty jako subjekty státní správy (Ministerstvo zdravotnictví, Ministerstvo zemědělství, Ministerstvo školství), státní zdravotnické či veterinární instituce (Státní zdravotní ústav, Ústav pro kontrolu léčiv, Státní veterinární správa), profesní organizace (Česká lékařská komora), zdravotní pojišťovny a jejich organizace, zdravotnická zařízení, vzdělávací instituce, vědecké instituce (Akademie věd ČR) a dále sdělovací prostředky, neziskové organizace apod.

Výkonnou strukturou na lokální úrovni jsou potom antibiotická střediska, což jsou klinické laboratoře, které kontrolují dodržování zásad správné ATB praxe, sledují AR na regionální úrovni, následně poskytují podklady pro národní surveillance AR a zajišťují informovanost a vzdělávání odborné i laické veřejnosti. (SZÚ, 2009).

4.3 Národní referenční laboratoř pro antibiotika

Zřizovatelem Národní referenční laboratoře pro antibiotika (NRL) je Státní zdravotní ústav (SZÚ). NRL je garantem Národního antibiotického programu a dále na národní úrovni koordinuje projekt EARS-Net.

Hlavním úkolem NRL je surveillance AR a rezistentních kmenů. Do NRL jsou zasílány vzorky rezistentních kmenů z klinických mikrobiologických laboratoří z celé ČR. NRL poté typizuje takové kmeny, stanovuje jejich citlivost na ATB a ukládá je pro další analýzu. Dále NRL ověřuje, inovuje a zavádí metody testování ATB citlivosti pro použití v rutinních laboratořích. NRL také testuje klinické laboratoře prostřednictvím EHK (externí hodnocení kvality) a následně vyhodnocuje výsledky (SZÚ, 2018).

5 REZISTENCE KLINICKY VÝZNAMNÝCH BAKTERIÍ

Alexander Fleming varoval ve svém projevu před AR již v roce 1945, když přebíral Nobelovu cenu za objev penicilinu. Je naprosto přirozené, že mikroorganismy, jakožto producenti antimikrobiálních látek, musí být schopny vyvíjet mechanismy na rozvoj rezistence vůči těmto látkám. Tím pádem zavedení každého nového antibiotika zákonitě vedlo k výskytu rezistentních kmenů. Jedná se o důkaz obrovské tvárnosti bakteriálního genomu a jeho schopnosti adaptovat se na změny prostředí (Peterson a Kaur, 2018).

V únoru roku 2017 zveřejnila WHO seznam klinicky významných rezistentních bakterií, kterým by měla být věnována zvláštní pozornost. Cílem tohoto seznamu je podpora výzkumu a vývoje nových ATB a řešení celosvětové antibiotické krize. Prioritní pozici v seznamu získaly bakterie ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species* (De Oliveira *et al.*, 2020).

Tabulka 1 Klinicky významné rezistentní bakterie seřazené dle priority (WHO, 2017)

Priorita	Bakterie	Rezistence
1: Kritická	<i>Acinetobacter baumannii</i>	karbapenem-rezistentní
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	karbapenem-rezistentní
	<i>Enterobacteriaceae</i>	karbapenem-rezistentní, producent ESBL
2: Vysoká	<i>Enterococcus faecium</i>	vankomycin-rezistentní
	<i>Staphylococcus aureus</i>	methicilin-rezistentní, vankomycin-rezistentní
	<i>Helicobacter pylori</i>	clarithromycin-rezistentní
	<i>Campylobacter spp.</i>	fluorochinolon-rezistentní
	<i>Salmonella</i>	fluorochinolon-rezistentní
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	cefalosporin-rezistentní, fluorochinolon-rezistentní
3: Střední	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	penicilin-rezistentní
	<i>Haemophilus influenzae</i>	ampicilin-rezistentní
	<i>Shigella</i>	fluorochinolon-rezistentní

Informace o aktuálním stavu a vývoji AR poskytuje především EARS-Net. Cílem tohoto sledování se staly zejména bakterie způsobující komunitní nebo nemocniční invazivní infekce (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa*). Bakterie se izolují z krve pacientů, případně z mozkomíšního moku. Od jednoho pacienta je do databáze zařazen vždy jeden kmen. U sledovaných bakteriálních druhů se stanovuje citlivost vůči antibiotikům volby pro léčbu invazivních infekcí. Z důvodu sjednocení interpretace výsledků mezi jednotlivými evropskými zeměmi se citlivost vyhodnocuje na základě breakpointů testovaných antibiotik dle EUCAST (SZÚ, 2014).

5.1 *Enterococcus faecium*

Enterokoky jsou grampozitivní bakterie, které jsou součástí běžné střevní flory člověka. Jelikož se jedná o oportunní patogeny, mohou být odpovědné za infekce močových cest, genitální infekce, infekce ran či endokarditidy. Častějším původcem enterokokových infekcí je *Enterococcus faecalis*, ovšem infekce vyvolané *Enterococcus faecium* bývají závažnější v důsledku častějšího rozvoje AR (Cattoir a Giard, 2014).

Enterokoky jsou přirozeně rezistentní vůči řadě ATB jako jsou cefalosporiny nebo aminoglykosidy. Rezistence vůči cefalosporinům je dána nízkou afinitou enterokokových PBP k těmto ATB. Rezistence vůči aminoglykosidům spočívá v nízké propustnosti bakteriální buněčné stěny pro tato ATB (Kakoullis *et al.*, 2021).

AR u *Enterococcus faecium* se v České republice monitoruje od roku 2001 a je sledována citlivost na ampicilin, high-level gentamicin a vankomycin (SZÚ, 2014).

5.1.1 Ampicilin

Rezistence *E. faecium* vůči ampicilinu (AMP) je rezistence získaná a je dána konformačními změnami struktury PBP, zejména pak PBP5, které následně vykazují nízkou afinitu vůči AMP. Zatímco izoláty *E. faecalis* vykazují malou mírou rezistence, izoláty *E. faecium* jsou dnes vůči AMP rezistentní ve většině případů (Cattoir a Giard, 2014).

V roce 2001 bylo v České republice testováno 64 izolátů *E. faecium*, z nich 43 bylo AMP-rezistentních, což představuje 67,2 % ze všech testovaných. V roce 2005 přesáhl počet rezistentních kmenů v ČR hranici 90 %. Z 211 testovaných kmenů bylo 194 AMP-rezistentních, což představuje 91,9 %. Poslední vyhodnocená data v ČR jsou za rok 2019, kdy bylo testováno celkem 349 izolátů, z nich bylo 323 AMP-rezistentních, což představuje 92,6 % (ECDC, 2021b).

5.1.2 High-level gentamicin

Rezistence vůči aminoglykosidům (gentamicin) je přirozenou vlastností enterokoků a je dána nízkou propustností bakteriální buněčné stěny pro tyto látky. Bylo ale zjištěno, že enterokoky mohou rezistenci i získat, a to pomocí plazmidů, čímž dojde ke zvýšení míry této rezistence. V takových případech je třeba použít vyšší dávky ATB, např. gentamicin ve vysokých dávkách, tzv. HLG (high-level gentamicin) (Cattoir a Giard, 2014).

V roce 2001 bylo v České republice z 64 testovaných izolátů *E. faecium* 21 HLG-rezistentních, což představuje 32,8 %. Velký nárůst rezistence byl v ČR zaznamenán opět v roce 2005, kdy ze 157 testovaných vykazovalo rezistenci vůči HLG 109 izolátů, což je 69,4 %. V roce 2019 bylo v ČR testováno 348 izolátů, z nich bylo 196 HLG-rezistentních, což představuje 56,3 % (ECDC, 2021b).

5.1.3 Vankomycin

Rezistence vůči glykopeptidům, mezi které se řadí vankomycin (VAN), je u enterokoků čistě získaná. Je kódována geny *vanA* a *vanB*. Tyto geny kódují přeměnu prekurzorů peptidoglykanu, který následně vykazuje menší afinitu vůči glykopeptidům. Kmeny, u kterých je rezistence zprostředkována operonem *vanA*, jsou rezistentní vůči vankomycinu i teikoplaninu. Oproti tomu kmeny s *vanB* jsou na teikoplanin citlivé. Jelikož vankomycin představuje záložní ATB na léčbu enterokokových infekcí, rozvoj AR vůči vankomycinu pak značně komplikuje takovou léčbu. Alternativami vankomycinu při léčbě infekcí způsobených VAN-rezistentními enterokoky mohou být antibiotika linezolid, daptomycin nebo tigecyklin (Kakkoulis, 2021).

V roce 2001 bylo v České republice testováno 64 izolátů *E. faecium*, z nich byl rezistentní pouze 1, tedy 1,6 % ze všech testovaných. V roce 2005 došlo opět k velkému nárůstu rezistence. V ČR bylo z 211 testovaných izolátů 29 VAN-rezistentních, což představuje 13,7 %. V roce 2019 pak bylo v ČR testováno 349 izolátů, z nich bylo VAN-rezistentních 69, tedy 19,8 % (ECDC, 2021b).

Tabulka 2 Zastoupení rezistentních kmenů rodu *Enterococcus faecium* v jednotlivých letech v České republice (ECDC, 2021b)

Rok	% rezistentních kmenů vůči ATB		
	AMP	HLG	VAN
2001	67,2	32,8	1,6
2002	73,2	35,4	8,5
2003	79,8	47,9	3,2
2004	81,1	43,4	2,8
2005	91,9	69,4	13,7
2006	90,1	74	3,8
2007	91,3	78,5	6,1
2008	94	75,3	8,1
2009	97,6	64,6	5,7
2010	97,3	54,3	4,8
2011	97,2	60,7	7,6
2012	97,7	69,5	11,5
2013	95,9	62,8	9
2014	96	68	4,4
2015	96,3	66,5	9,6
2016	95,3	70,2	7,8
2017	97	58,7	13,3
2018	95,3	62,6	20,7
2019	92,6	56,3	19,8

5.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je grampozitivní bakterie, která se vyskytuje zhruba u 30 % populace jako součást běžné flory, a to zejména sliznic horních cest dýchacích. Za určitých podmínek, např. oslabení imunitního systému, se mohou tyto kmeny stát původcem stafylokokových infekcí. Mezi ně se řadí bakteriemie, sepse, hnisavá onemocnění měkkých tkání, endokarditidy, pneumonie.

S. aureus je z hlediska rezistence jednou z nejvýznamnějších bakterií. Od počátku 40. let minulého století vyvíjí stále nové mechanismy rezistence, které mu zajišťují odolnost vůči β -laktamům, tetracyklinům, aminoglykosidům, fluorochinolonům, klindamycinu, vankomycinu, linezolidu apod. (Kakoullis *et al.*, 2021).

S. aureus je v České republice sledován prostřednictvím EARS-Net od roku 2000 a je monitorována citlivost vůči antibiotikům erytromycin, cefoxitin, linezolid, oxacilin (resp. methicilin) a vankomycin (SZÚ, 2014).

5.2.1 Methicilin

Prvním rezistentním kmenem rodu *S. aureus* byl penicilin-rezistentní kmen produkující penicilinázu. V důsledku toho v roce 1959 došlo k vývoji methicilinu, což je polosyntetická obdoba penicilinu odolná vůči působení penicilinázy. Necelé 2 roky poté byl izolován methicilin-rezistentní kmen rodu *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Guo *et al.*, 2020).

Dnes je MRSA považován za převládající rezistentní kmen. Geny pro methicilinovou rezistenci jsou například geny *mecA*, *mecC*. Princip rezistence pak spočívá v tvorbě PBP2a, což je obdobná struktura PBP2, jen není schopna vázat β -laktamová ATB (methicilin) (Kakoullis *et al.*, 2021).

V roce 2000 bylo v České republice testováno 515 izolátů *S. aureus*, z nich bylo 22 identifikováno jako MRSA, což představuje 4,3 % ze všech testovaných izolátů. V roce 2011 překročilo celkové množství methicilin-rezistentních kmenů v ČR 14 %. Bylo testováno 1555 izolátů, z nich bylo 226 rezistentních, což představuje 14,5 %. Od roku 2012 do roku 2019 se potom podíl rezistentních kmenů v ČR pohyboval v rozmezí 12-14 %. Například v roce 2019 bylo testováno 2 108 izolátů, z nich bylo rezistentních 264, tedy 12,5 % (ECDC, 2021b).

5.2.2 Vankomycin

Neméně významný je potom vankomycin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (VRSA). Tuto rezistenci kódují geny *vanA*, které získal *S. aureus* od VAN-rezistentních enterokoků. *VanA* operon umožňuje bakterii změnit strukturu peptidoglykanových prekurzorů, které potom mají výrazně sníženou afinitu k vankomycinu (Guo *et al.*, 2020).

VRSA prozatím nebyl hlášen v žádné evropské zemi. I jinde ve světě je jeho výskyt zatím vzácný. Podobně je na tom rezistence vůči ATB linezolid. Oproti tomu kmeny rezistentní vůči ATB erytromycin a cefoxitin jsou v České republice zaznamenány, nicméně tendence jejich výskytu se nezvyšuje tak jako např. u methicilinu (EUCAST, 2021b).

Tabulka 3 Zastoupení methicilin-rezistentních kmenů rodu *Staphylococcus aureus* v jednotlivých letech v České republice (ECDC, 2021b)

Rok	% rezistentních kmenů vůči methicilinu
2000	4,3
2001	5,9
2002	5,9
2003	6,1
2004	8,5
2005	12,9
2006	12,3
2007	12,9
2008	14,2
2009	14,6
2010	13,5
2011	14,5
2012	13
2013	13,2
2014	13
2015	13,7
2016	13,9
2017	13,2
2018	13,6
2019	12,5

5.3 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae je gramnegativní bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o bakterii přirozeně se vyskytující v gastrointestinálním traktu lidí i zvířat. Jako oportunní patogen může způsobovat infekce močových cest, cystitidy, pneumonie, infekce pooperačních ran, endokarditidy, septikémie. Ze všech infekcí vyvolaných gramnegativními bakteriemi představují infekce způsobené *Klebsiella pneumoniae* zhruba jednu třetinu (Navon-Venezia *et al.*, 2017).

V České republice je rezistence *K. pneumoniae* monitorována od roku 2005, přičemž se sleduje citlivost vůči karbapenemům, fluorchinolonům (ciprofloxacin), cefalosporinům III. generace (cefotaxim, ceftazidim), aminoglykosidům (gentamicin, amikacin) a sleduje se zároveň přítomnost multirezistentních kmenů (sdružená rezistence vůči cefalosporinům III. generace, fluorchinolonům a aminoglykosidům) (SZÚ, 2014).

5.3.1 Karbapenemy

Největší hrozbou současné doby je rezistence vůči karbapenemům, tedy poslední volbou mezi β -laktamovými ATB. *K. pneumoniae* produkuje několik typů karbapenemáz (KPC, NDM, OXA), které jsou zpravidla kódovány geny bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{OXA}. Dalšími možnými mechanismy rezistence jsou ztráta transmembránových proteinů či produkce efluxních pump (Navon-Venezia *et al.*, 2017).

Karbapenem-rezistentní *K. pneumoniae* je považována za jeden z hlavních nemocničních patogenů spojených s významnou mortalitou, která může u hospitalizovaných pacientů dosáhnout až 48 % (Kakoullis *et al.*, 2021).

V roce 2005 bylo v České republice testováno 44 izolátů *K. pneumoniae* a u žádného z testovaných nebyla prokázána rezistence vůči karbapenemům. První rezistentní kmeny byly v ČR zaznamenány v roce 2008, kdy z celkem 1260 testovaných izolátů byly 3 vyhodnoceny jako karbapenem-rezistentní, což představuje 0,2 %. Poslední vyhodnocená data v ČR z roku 2019 stanovují rezistenci na 0,6 %. Testováno bylo 1314 izolátů, z nich bylo 8 stanoveno jako karbapenem-rezistentní. V porovnání s ostatními evropskými zeměmi není v České republice výskyt těchto rezistentních kmenů vysoký, nicméně je patrné, že rezistence vůči karbapenemům postupně narůstá (ECDC, 2021b).

5.3.2 Cefalosporiny III. generace

Podobně jako proti karbapenemům, i proti cefalosporinům III. generace produkuje *K. pneumoniae* řadu enzymů, současně využívá i mechanismy jako je ztráta či modifikace transmembránových proteinů či tvorba efluxních pump (Navon-Venezia *et al.*, 2017).

Ani cefalosporiny III. generace netvoří výjimku a je u nich zaznamenán nárůst rezistence. V roce 2005 bylo v České republice testováno celkem 478 izolátů *K. pneumoniae* a 155 z nich bylo rezistentních, což činí 32,4 %. Následně v roce 2009 byla v ČR jako rezistentní poprvé vyhodnocena více než polovina testovaných izolátů. Testováno bylo 1415 izolátů, rezistentních bylo 737, tedy 52,1 %. Dle posledních dostupných dat v ČR z roku 2019, kdy bylo testováno 1563 izolátů, bylo vyhodnoceno 792 jako rezistentních, což činí 50,7 % (ECDC, 2021b).

5.3.3 Multirezistence

Značnou hrozbu představují i multirezistentní kmeny druhu *Klebsiella pneumoniae*. V případě rezistence na více druhů antibiotik se výrazně zužuje možnost výběru vhodného léčiva. Sledována je sdružená rezistence vůči cefalosporinům III. generace, fluorochinolonům a aminoglykosidům.

Zatímco v roce 2005 bylo v České republice rezistentních 81 ze 477 testovaných izolátů *K. pneumoniae*, což představuje 17 %, v roce 2019 v ČR vykazovalo multirezistenci 39,3 % izolátů (614 z celkem 1562 testovaných) (ECDC, 2021b).

Tabulka 4 Zastoupení rezistentních kmenů rodu *Klebsiella pneumoniae* v jednotlivých letech v České republice (ECDC, 2021b)

Rok	% rezistentních kmenů vůči ATB				
	FLUOROCHINOLONY	CEFALOSPORINY III. GENERACE	AMINOGLYKOSIDY	KARBAPENEMY	MULTIREZISTENCE
2005	38,1	32,4	36,3	0	17
2006	47,4	34,8	37,4	0	20,3
2007	48,5	45,7	41,6	0	28,7
2008	51,5	47,7	40,1	0,2	30,8
2009	54,3	52,1	46,1	0,2	35,1
2010	55,1	48,2	46,2	0,1	35,8
2011	52,8	48,3	43,8	0,1	35,8
2012	50,4	51,2	54,4	0,3	41,8
2013	47,7	52	51	0,5	38,3
2014	48	52,9	50,7	0,1	38,7
2015	48,9	54,1	51,9	0,3	41,5
2016	50,5	51,8	47,1	0	40,8
2017	49,2	53,2	49,6	0,4	41,8
2018	47,2	50,1	48,6	0,3	38,7
2019	48,7	50,7	47,7	0,6	39,3

6 BUDOUCNOST ANTIMIKROBIÁLNÍ TERAPIE

Je zřejmé, že vlivem stále narůstající míry AR antibiotika postupně ztrácí svou účinnost. Nabízí se tedy otázka, jaká je vůbec budoucnost antibiotik. Jednou z možností řešení antibiotické krize je vývoj nových antibiotik, což je možnost mimořádně nákladná. Další možnost by mohly představovat látky, které ATB nahradí (Popova *et al.*, 2021).

6.1 Nová antibiotika

V současné době představují největší komplikaci antibiotické léčby bakterie rezistentní vůči karbapenemům či cefalosporinům třetí generace. Z velké části se jedná o gramnegativní bakterie. V letech 2015-2020 byla schválena řada nových ATB účinných proti těmto bakteriím. Jedná se o plazomicin, eravacyklin, temocilin, cefiderocol, ceftazidim/avibactam, ceftolozan/tazobactam, meropenem/vaborbactam, imipenem-cilastatin/relebactam. Dle dostupných studií jsou tato nově vyvinutá ATB velmi účinná a mají potenciál v léčbě zejména infekcí způsobených karbapenem-rezistentními kmeny (Yusuf *et al.*, 2021).

Kromě výše zmíněných ATB vývoj nových stagnuje. Hlavním důvodem je nutnost velkých investic farmaceutických společností, které jsou často nevratné. Bakterie časem získají rezistenci a tato léčiva přestanou být účinná. Proto je třeba hledat i jiné, alternativní možnosti (Yusuf *et al.*, 2021).

6.2 Antisense oligonukleotidy

Jednou z alternativních možností je použití antisense oligonukleotidů (ASO). Jedná se o syntetické krátké jednovláknové nukleotidové řetězce, které představují zrcadlovou kopii krátkého úseku m-RNA. Vazbou na tento úsek v bakteriální buňce potom znemožní čtení řetězce a tím i následnou translaci. Pokud dojde k zamezení tvorby bílkoviny, která může být pro bakterii životně důležitým metabolitem, taková bakterie potom nemůže přežít.

Klíčovou vlastností, kterou musí ASO mít je to, že musí cílit na geny, které jsou přítomny pouze u bakterií, nikoli u člověka. V tomto případě představuje bakteriální genom značnou výhodu, protože je v porovnání s lidským genomem menší a jednodušeji organizovaný. Proto se dají správné bakteriální RNA úseky považovat za potenciální cíl pro ASO (Popova *et al.*, 2021).

Terapie pomocí ASO má potenciál nejen v léčbě infekčních onemocnění, ale i v léčbě genetických poruch, metabolických poruch či v onkologii. Z hlediska infekčních onemocnění by ASO mohly potenciálně cílit na jakýkoli patogen (bakteriální, virový, plísňový, parazitární) za podmínky znalosti základní sekvence cílového genu.

V současné době na trhu neexistuje žádné léčivo založené na mechanismu ASO. Existují ale klinické studie, které se antisense terapií zabývají (Streicher, 2021).

6.3 Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy (AMPs) jsou synteticky vyráběné látky na bázi protilátek, které jsou součástí vrozené imunity. Nabízí se proto myšlenka, že budou účinné v působení proti bakteriálním patogenům. Délka AMPs je 12 až 50 aminokyselinových zbytků.

Příkladem AMPs může být pyrrolicin, který se váže na RNA a inhibuje tak translaci. Jeho účinnost byla prokázána u *Escherichia coli*. Dalším peptidem je pVEC, který je odvozený od kadherinu. Jeho mechanismus účinku spočívá v narušení bakteriální buněčné stěny a jeho účinnost byla prokázána u *Escherichia coli* nebo *Bacillus megaterium* (Popova *et al.*, 2021).

Jelikož se očekává, že bakterie budou schopny vyvinout rezistenci vůči AMPs, je nutné lépe pochopit mechanismy působení těchto látek. Proto farmaceutické společnosti investují do výzkumu a vývoje a probíhá řada preklinických a klinických studií. Je možné, že jednou budou AMPs vhodnou alternativou antibiotik (Aslam *et al.*, 2018).

6.4 Fágová terapie

Další alternativní metodou léčby infekcí způsobených rezistentními bakteriální kmeny může být fágová terapie. Bakteriofágy jsou viry napadající výhradně bakterie. Nachází se ve všech ekosystémech včetně lidského těla a umí přežít i v extrémních podmínkách. Klíčovými vlastnostmi bakteriofágů jsou genomická plasticita a rychlá replikace.

Zatímco některé bakteriofágy infikují řadu bakteriálních druhů, většina z nich vykazuje druhovou specifitu. To je dáno tím, že každý bakteriofág je schopen rozpoznat konkrétní ligand na bakteriální buněčné stěně, tudíž může cílit jen na konkrétní patogen. Navíc jsou bakteriofágy pro člověka neškodné, nenapadají lidské buňky. Nežádoucí účinky nebyly prokázány ani u imunokompromitovaných pacientů (Popova *et al.*, 2021).

Další výhodou je způsob podání bakteriofágů. To by mohlo být jak systémové, ale i perorální či lokální. Navíc izolace bakteriofágů je poměrně jednoduchý proces, který je již po několik desetiletí neměnný, získávají se například z odpadních vod. Jediný problém této terapie by mohl spočívat v rychlém uvolnění bakteriálních endotoxinů při rozpadu bakteriálních buněk po napadení fágy (Streicher, 2021).

Fágová terapie není standardním postupem léčby, stále ještě probíhá řada klinických studií objasňujících řadu aspektů této terapie. Nicméně by se mohlo v rámci šířící se AR jednat o léčbu budoucnosti (Popova *et al.*, 2021).

7 ZÁVĚR

Antibiotická rezistence byl, je a vždy bude problém. Na jedné straně máme léčiva, která jsou schopna léčit bakteriální infekce, na straně druhé bakteriím umožňujeme vytvářet si proti nim vlastní imunitu. Bakterie mající geny kódující rezistenci přenesou tyto geny vertikálně na své dceřiné buňky, v horším případě je předá horizontálně jiné bakteriální buňce, a to i odlišného bakteriálního druhu. V této chvíli nastává problém stoupající míry antibiotické rezistence, která se šíří celosvětově.

V České republice k rozvoji rezistence přispívá masivní používání antibiotik v zemědělství, potravinářském průmyslu, ale i ve zdravotnictví. Často totiž dochází k tomu, že jsou antibiotika nesprávně předepisována, např. na probíhající virové infekce. Proto by měli lékaři spolupracovat s klinickými mikrobiologickými laboratoři, které potvrdí případnou bakteriální infekci, identifikují bakteriální druh a stanoví jeho citlivost vůči antibiotikům. Takový postup je základním předpokladem pro správnou a účinnou antibiotickou léčbu. K prevenci šíření rezistentních bakteriálních kmenů a zároveň antibiotické rezistence je velmi důležitá komunikace a spolupráce, a to na úrovni pacient-lékař, lékař-laboratoř, ale i laboratoř-vyšší instituce (například EARS-Net).

Je zcela patrné, že pokud nedojde k vývoji nových antibiotik, ta stávající ztratí vlivem rezistence svou účinnost. Alternativní cestou by mohlo být nahrazení antibiotik jinými látkami. Některé z nich mají poměrně velký potenciál - „antisense“ oligonukleotidy, antimikrobiální peptidy, bakteriofágy. Všechny zmíněné metody prochází klinickými studiemi a před uvedením na trh je čeká ještě dlouhá cesta. Už teď je ale jasné, že bakterie zcela jistě zvládnou vyvinout nové mechanismy na obranu proti těmto látkám. Bakterie totiž budou vždy o krok před lidmi.

8 LITERÁRNÍ ZDROJE

ABUSHAHEEN, Manar Ali, MUZAHEED, Amal Jamil FATANI, Mohammed ALOSAIMI, Wael MANSY, Merin GEORGE, Sadananda ACHARYA, Sanjay RATHOD, Darshan Devang DIVAKAR, Chitra JHUGROO, Sajith VELLAPPALLY, Aftab Ahmed KHAN, Jilani SHAIK, Poojdev JHUGROO, 2020. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month* [online]. **66**(6) [cit. 2021-04-11]. DOI: 10.1016/j.disamonth.2020.100971. ISSN 00115029. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001150292030033X>

ASLAM, Bilal, Wei WANG, Muhammad Imran ARSHAD, Mohsin KHURSHID, Saima MUZAMMIL, Muhammad Hidayat RASOOL, Muhammad Atif NISAR, Ruman Farooq ALVI, 2018. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance* [online]. **11**, 1645-1658 [cit. 2021-06-02]. DOI: 10.2147/IDR.S173867. ISSN 1178-6973. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6188119/>

BELLO-LOPEZ, Manuel Juan, Omar Alejandro CABRERO-MARTINEZ, 2019. Horizontal Gene Transfer and Its Association with Antibiotic Resistance in the Genus *Aeromonas* spp. *Microorganisms* [online]. **7**(9), 363 [cit. 2021-04-30]. DOI: 10.3390/microorganisms7090363. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/9/363>

BIOVENDOR LM[®], 2021. GeneXpert System IV [online]. *Biovendor LM[®]*, 2021 [cit. 2021-05-29]. Dostupné z: <https://www.biovendor.cz/genexpert-system-iv/p91.GXIV-4-L/#tab=popis>

BIOMÉRIEUX, 2019. ETEST[®] pro detekci antimikrobiální rezistence ARD [online]. *Biomérieux*, 2019 [cit. 2021-05-20]. Dostupné z: <https://www.biomerieux.cz/produkty/etestr-pro-detekci-antimikrobialni-rezistence-ard>

CATTOIR, Vincent, Jean-Christophe GIARD. 2014. Antibiotic resistance in *Enterococcus faecium* clinical isolates. *Expert review of anti-infective therapy* [online]. **12**(2), 239-248 [cit. 2021-06-05]. DOI: 10.1586/14787210.2014.870886. ISSN 1478-7210. Dostupné z: <https://www.proquest.com/docview/1492570921>

CORDOVANA, Miriam, Arthur Boniface PRANADA, Simone AMBRETTI, Markus KOSTRZEWA, 2019. MALDI-TOF bacterial subtyping to detect antibiotic resistance. *Clinical Mass Spectrometry* [online]. **14**, 3-8 [cit. 2021-05-30]. DOI: 10.1016/j.clinms.2019.06.002. ISSN 2376-9998. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2376999819300340>

CULYBA, Matthew, Charlie MO, Rahul KOHLI, 2015. Targets for Combating the Evolution of Acquired Antibiotic Resistance. *Biochemistry* [online]. **54**(23), 3573-3582 [cit. 2021-04-14]. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00109. ISSN 0006-2960. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biochem.5b00109>

DARK, Paul, Paul DEAN, Geoffrey WARHURST, 2009. Bench-to-bedside review: The promise of rapid infection diagnosis during sepsis using polymerase chain reaction-based pathogen detection. *Critical Care* [online]. **13**(4), 217 [cit. 2021-05-22]. DOI: 10.1186/cc7886. ISSN 1466-609X. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1186/cc7886>

DE OLIVEIRA, David Moraes, Brian FORDE, Timothy James KIDD, Patrick HARRIS, Mark SCHEMBRI, Scott BEATSON, David PATERSON, Mark James WALKER, 2020. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **33**(3) [cit. 2021-06-05]. DOI: 10.1128/CMR.00181-19. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7227449/>

DIETVORST, Jiri, Lluisa VILAPLANA, Naora URIA, Maria-Pilar MARCO, Xavier MUNOZ-BERBEL, 2020. Current and near-future technologies for antibiotic susceptibility testing and resistant bacteria detection. *Trends in Analytical Chemistry* [online]. **127** [cit. 2021-05-09]. DOI: 10.1016/j.trac.2020.115891. ISSN 0165-9936. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993620301205>

DURAND, André Guillaume, Raoult DIDIER, Grégory DUBOURG, 2019. Antibiotic Discovery: History, Methods and Perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. **53**(4), 371-382 [cit. 2021-04-24]. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010. ISSN 0924-8579. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857918303352>

ECDC, 2021a. EARS-Net [online]. *European Centre for Disease Prevention and Control*, Stockholm, 2021 [cit. 2021-06-06]. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/networks/disease-networks-and-laboratory-networks/ears-net-about>

ECDC, 2021b. ECDC Surveillance Atlas-Antimicrobial Resistance [online]. *European Centre for Disease Prevention and Control*, Stockholm, 2021 [cit. 2021-06-26]. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>

EUCAST, 2021a. EUCAST Disc Diffusion Methodology [online]. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, 2021 [cit. 2021-05-20]. Dostupné z: https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/

EUCAST, 2021b. MIC determination of non-fastidious and fastidious organisms [online]. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, 2021 [cit. 2021-05-20]. Dostupné z: https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/mic_determination/

FLORIO, Walter, Lelio BALDESCHI, Cosmeri RIZZATO, Arianna TAVANTI, Emilia GHERALDI, Antonella LUPETTI, 2020. Detection of Antibiotic-Resistance by MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Expanding Area. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. **10** [cit. 2021-05-29]. DOI: 10.3389/fcimb.2020.572909. ISSN 2235-2988. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.572909/full>

GUO, Yunlei, Guanhui SONG, Meiling SUN, Juan WANG, Yi WANG, 2020. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. **10**, 107 [cit. 2021-06-05]. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00107. ISSN 2235-2988. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00107/full>

HAMMOUDI, Dalal, Carole Ayoub MOUBARECK, Dolla Karam SARKIS, 2014. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *Journal of Microbiological Methods* [online]. **107**, 106-118 [cit. 2021-05-22]. DOI: 10.1016/j.mimet.2014.09.009. ISSN 0167-7012. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701214002875>

HUTCHINGS, Matthew, Andrew TRUMAN, Barrie WILKINSON, 2019. Antibiotics: Past, present and future. *Current Opinion in Microbiology* [online]. **51**, 72-80 [cit. 2021-04-24]. DOI: 10.1016/j.mib.2019.10.008. ISSN 1369-5274. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527419300190>

CHRISTAKI, Eirini, Markella MARCOU, Andreas TOFARIDES, 2020. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution* [online]. **88**(1), 26-40 [cit. 2021-04-11]. DOI: 10.1007/s00239-019-09914-3. ISSN 0022-2844. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00239-019-09914-3>

KAKOULLIS, Loukas, Eleni PAPACHRISTODOULOU, Paraskevi CHRA, George PANOS, 2021. Mechanisms of Antibiotic Resistance in Important Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens and Novel Antibiotic Solutions. *Antibiotics* [online]. **10**(4), 415 [cit. 2021-05-07]. DOI: 10.3390/antibiotics10040415. ISSN 2079-6382. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2079-6382/10/4/415/htm>

KHAN, Zeeshan Ahmad, Mohd Farhan SIDDIQUI, Seungkyung PARK, 2019. Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagnostics* [online]. **9**(2), 49 [cit. 2021-05-08]. DOI: 10.3390/diagnostics9020049. ISSN 2075-4418. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2075-4418/9/2/49/htm>

LERMINIAUX, Nicole, Andrew CAMERON, 2019. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. **65**(1), 34-44 [cit. 2021-04-30]. DOI: 10.1139/cjm-2018-0275. ISSN 0008-4166. Dostupné z: <https://cdnsiencepub.com/doi/full/10.1139/cjm-2018-0275>

MAUGERI, Gaetano, Iana LYCHKO, Rita SOBRAL, Ana Cecilia ROQUE, 2019. Identification and Antibiotic-Susceptibility Profiling of Infectious Bacterial Agents: A Review of Current and Future Trends. *Biotechnology Journal* [online]. **14**(1) [cit. 2021-05-09]. DOI: 10.1002/biot.201700750. ISSN 1860-6768. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/biot.201700750>

McINNES, Ross, Gregory McCALLUM, Lisa LAMBERTE, Willem van SCHAIK, 2020. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. *Current Opinion in Microbiology* [online]. **53**, 35-43 [cit. 2021-04-29]. DOI: 10.1016/j.mib.2020.02.002. ISSN 1369-5274. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527420300254>

MZČR, 2019. Akční plán Národního antibiotického programu [online]. *Ministerstvo zdravotnictví České republiky*, Praha, 2019 [cit. 2021-06-06]. Dostupné z: <https://www.mzcr.cz/akcni-plan-narodniho-antibiotickeho-programu/>

NAVON-VENEZIA, Shiri, Kira KONDRATYEVA, Alessandra CARATTOLI, 2017. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. **41**(3), 252-275 [cit. 2021-06-05]. DOI: 10.1093/femsre/fux013. ISSN 0168-6445. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article/41/3/252/3830265?login=true>

PETERSON, Elizabeth, Parjit KAUR, 2018. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology* [online]. **9** [cit. 2021-05-08]. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02928. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02928/full>

POPOVA, Katya, Aikaterini VALSAMATZI-PANAGIOTOU, Robert PENCHOVSKY, 2021. New drug discovery strategies for targeting drug-resistant bacteria. *Environmental Chemistry Letters* [online]. **19**(3), 1995-2004 [cit. 2021-06-06]. DOI: 10.1007/s10311-021-01181-3. ISSN 1610-3653. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10311-021-01181-3>

REYGAERT, Wanda, 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology* [online]. **4**(3), 482-501 [cit. 2021-04-14]. DOI: 10.3934/microbiol.2018.3.482. ISSN 2471-1888. Dostupné z: <http://www.aimspress.com/article/10.3934/microbiol.2018.3.482>

SERWECINSKA, Liliana, 2020. Antimicrobials and Antibiotic-Resistant Bacteria: A Risk to the Environment and to Public Health. *Water* [online]. **12**(12), 3313 [cit. 2021-06-06]. DOI: 10.3390/w12123313. ISSN 2073-4441. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2073-4441/12/12/3313>

SREEJITH, Kamalalayan Rajan, Chin Hong OOI, Jing JIN, Dzung Viet DAO, Nam-Trung NGUYEN, 2018. Digital polymerase chain reaction technology – recent advances and future perspectives. *Lab on a Chip* [online]. **18**(24), 3717-3732 [cit. 2021-05-22]. DOI: 10.1039/c8lc00990b. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/ko/content/articlehtml/2018/lc/c8lc00990b>

STREICHER, Laura Michelle, 2021. Exploring the future of infectious disease treatment in a post-antibiotic era: A comparative review of alternative therapeutics. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* [online]. **24**, 285-295 [cit. 2021-06-06]. DOI: 10.1016/j.jgar.2020.12.025. ISSN 2213-7165. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716521000102?via%3Dihub>

SÚKL, 2019. Akční plán Národního antibiotického programu pro roky 2019-2022 [online]. *Státní ústav pro kontrolu léčiv*, Praha, 2019 [cit. 2021-06-06]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/akcni-plan-narodniho-antibiotickeho-programu-pro-roky-2019>

SZÚ, 2009. Národní antibiotický program [online]. *Státní zdravotní ústav*, Praha, 2009 [cit. 2021-06-06]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/narodni-antibioticky-program>

SZÚ, 2014. EARS-Net, Metodika sběru dat antibiotika [online]. *Státní zdravotní ústav*, Praha, 2014 [cit. 2021-06-26]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/ears-net-4/metodika-sberu-dat#antibiotika>

SZÚ, 2018. Národní referenční laboratoř pro antibiotika [online]. *Státní zdravotní ústav*, Praha, 2018 [cit. 2021-06-06]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/narodni-referencni-laborator-pro-antibiotika>

SZÚ, 2019. Nové definice C, I a R při testování citlivosti na antibiotika [online]. *Státní zdravotní ústav*, Praha, 2019 [cit. 2021-05-20]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/nove-definice-c-i-a-r>

SZÚ, 2021. EARS-Net [online]. *Státní zdravotní ústav*, Praha, 2021 [cit. 2021-06-06]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/ears-net-4>

SYAL, Karan, Manni MO, Hui YU, Rafael IRIYA, Wenwen JING, Guodong SUI, Shaopeng WANG, Thomas GRYS, Shelley HAYDEL, Nongjian TAO, 2017. Current and Emerging Techniques for Antibiotic Susceptibility Tests. *Theranostics* [online]. 7(7), 1795-1805 [cit. 2021-05-09]. DOI: 10.7150/thno.19217. ISSN 1838-7640. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5479269/>

VALONES, Marcela Agne Alves, Rafael Lima GUIMARAES, Lucas Andre Cavalcanti BRANDAO, Paulo Roberto Eleuterio de SOUZA, Alessandra de Albuquerque Tavares CARVALHO, Sergio CROVELA, 2009. Principles and Applications of Polymerase Chain Reaction in Medical Diagnostic Fields: A Review. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. 40(1), 1-11 [cit. 2021-05-22]. DOI: 10.1590/S1517-83822009000100001. ISSN 1517-8382. Dostupné z: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/xGvDxSJK68CmJqwzkTLncZv/?format=pdf&lang=en>

VAN CAMP, Pieter-Jan, David HASLAM, Aleksey POROLLO, 2020. Bioinformatics Approaches to the Understanding of Molecular Mechanisms in Antimicrobial Resistance. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 21(4) [cit. 2021-04-11]. DOI: 10.3390/ijms21041363. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/4/1363>

WHO, 2017. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [online]. *World Health Organization*, 2017 [cit. 2021-06-05]. Dostupné z: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

WHO, 2020. Antibiotic Resistance [online]. *World Health Organization*, 2020 [cit. 2021-06-06]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>

YUSUF, Erlangga, Hannelore BAX, Nelianne VERKAIK, Mireille van WESTREENEN, 2021. An Update on Eight „New“ Antibiotics against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Journal of Clinical Medicine* [online]. **10**(5), 1068 [cit. 2021-06-06]. DOI: 10.3390/jcm10051068. ISSN 2077-0383. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2077-0383/10/5/1068>