Středoškolská technika 2016

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

Citlivost bakterií rodu *Arcobacter* k antibiotikům

Jitka Vodičková

Gymnázium, Pardubice, Mozartova 499

Mozartova 449, 530 09 Pardubice

Citlivost bakterií rodu *Arcobacter* k antibiotikům

Sensitivity of *Arcobacter* bacteria to antibiotics

Autor:	Jitka Vodičková
Škola:	Gymnázium, Pardubice, Mozartova 499 Mozartova 449 530 09 Pardubice ročník: 3
Kraj:	Pardubický kraj
Konzultant:	Ing. David Šilha Univerzita Pardubice Studentská 573 532 10 Pardubice Česká Republika
Místo zpracování:	Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice Katedra biologických a biochemických věd

Pardubice 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze podklady (literaturu, projekty, SW atd.) uvedené v seznamu vloženém v práci SOČ. Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné. Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V …… dne …… podpis: ……

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala všem, kteří mi při práci pomáhali. Zejména panu Ing. Davidu Šilhovi děkuji za poskytnutí cenných rad. Jistě mi budou užitečné v dalším studiu. Děkuji i za trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Univerzitě Pardubice, která mi nabídla možnost vypracovat zde práci SOČ a za bezplatné použití všech materiálů využitých při mé práci. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také paní RNDr. Květě Sýkorové, která je učitelkou chemie a biologie na našem Gymnáziu a která mě podporovala v mých zájmech a ochotně mi vždy pomohla a poradila.

Anotace

Rok 1928 byl rok, kdy pro svět medicíny došlo k historickému objevu. Skotský vědec Alexander Fleming objevil přirozenou antibakteriální látku. Tu produkovala plíseň *Penicillium,* a proto tuto látku nazval penicilin. Následně bylo objeveno mnoho dalších antibiotik, a tak se tyto látky, které zachránily mnoho lidských životů, začaly v lékařství hojně používat. Došlo však k tomu, že se antibiotika začala užívat nadměrně. Toto nadměrné užívání významně ovlivňuje naše životní prostředí, kdy se tyto látky mohou dostat prostřednictvím moči například do odpadních vod.

Bakterie se zákonitě stávají na antibiotika postupně rezistentní. V současné době se projevuje stále častěji problém s užitím antibiotik. Často se totiž stává, že již bakterie neusmrcují.

Cílem mé práce bylo zjistit, jak jsou citlivé bakterie rodu *Arcobacter* vůči antibiotikům, konkrétně druh *A.butzleri.* Předmětem zkoumání byla antibiotika ampicilin 10 µg, amoxycillin 30 µg, tetracyklin 30 µg, clindamycin 2 µg, erythromycin 15 µg, ciproclofacin 5 µg. Můj výzkum byl proveden diskovou difuzní metodou EUCAST (Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti). Základem této metody je homogenní inokulum na Müller-Hinton agaru s 5% koňské krve, popřípadě krve beraní. Bakteriální suspenze by měla odpovídat hodnotě 0,5 dle McFarlandovy zákalové stupnice. U rodu *Arcobacter* jsem používala zákal číslo 2-4, vzhledem k charakteru růstu arkobakterů tak, aby skutečné počty bakterií odpovídaly požadovaným hodnotám. Růst kultury mikrobů by měl být homogenní a rovnoměrný na agarovém médiu.

Dále se tato metoda řídí pravidlem 15-15-15 minut, aby se daly získat výsledky použitelné v dalším výzkumu. To znamená, že do 15 minut od přípravy se musí použít inokulum. Do 15 minut od aplikování mikrobiální suspenze se musí aplikovat antibiotické disky. A do 15 minut po aplikaci disků se musí zahájit inkubace.

Výsledky z 20 izolátů ukázaly, že arkobaktery jsou rezistentní téměř na všechna testovaná antibiotika. To odpovídá i jiným studiím. Nejúčinnější antibiotikum bylo erytromycin 15 µg, kde 6 izolátů bylo citlivých, 1 intermediátní (není ani citlivý ani odolný) a 13 kmenů bylo odolných.

Naopak nejméně účinná byla látka tetracyklin 30 µg, u které bylo všech 20 izolátů rezistentních.

Obsah

1. ÚVOD 7
2. TEORETICKÁ ČÁST 8
2.1. **Bakterie** 8
2.1.1.Stavba bakterie 8
2.1.2.Výskyt bakterií 8
2.1.3.Rozmnožování bakterií 11
2.2. **Bakterie rodu *Campylobacter* a *Arcobacter*** 11
2.2.1.Bakterie rodu *Campylobacter* 11
2.2.2.Bakterie rodu *Arcobacter* 11
2.3. **Antimikrobiální látky** 13
2.3.1.Baktericidní antimikrobiální látky 14
2.3.2.Bakteriostatické antimikrobiální látky 14
2.3.3.Úzkospektré antimikrobiální látky 14
2.3.4.Širokospektré antimikrobiální látky 15
2.3.5.Účinnost antimikrobiálních látek 15
2.3.6.Charakteristika antibiotik testovaných v mém experimentu 15
2.4. **Rezistence bakterií proti antibiotikům** 17
2.4.1.Způsob obrany bakterií proti antibiotikům 17
2.4.2.Druhy rezistence 18
2.5. **Zjišťování citlivosti bakterií k antibiotikům** 19
2.5.1.Diskové difuzní testy 19
2.5.2.Kvantitativní difuzní test (E – test) 19
2.5.3.Diluční testy 20
2.5.4.Kapková metoda 21
2.5.5.Komínková metoda 21
2.5.6.Genotypová metoda 21
3. PRAKTICKÁ ČÁST 21
3.1. **Bakteriální vzorky** 21
3.2. **Metodika** 22
3.2.1.EUCAST Disková difuzní metoda pro vyšetření citlivosti k antibiotikům 22
4. VÝSLEDKY 28
4.1. **Výsledky pro jednotlivá antibiotika** 28
4.2. **Přehled všech izolovaných kmenů a jejich citlivost na testovaná antibiotika** 31
4.2.1.Extrémně rezistentní izolované kmeny arkobakterů 31
5. ZÁVĚR 32
6. DISKUSE 32
7. SEZNAM ZKRATEK 33
8. ZDROJE 33
8.1. **Použitá literatura** 33

8.2. **Internetové zdroje** 33
8.3. **Obrázky** 36

1. Úvod

Práce se zabývá tématem z oboru mikrobiologie, konkrétně rezistencí bakterií rodu *Arcobacter.* Výsledky pro jednotlivé vzorky se mohou lišit, protože každý vzorek byl odebrán z jiného prostředí, např. z krůtího krku, kuřecího krku, z lososa, kuřecích jater, ale také z vody v ČOV v Havlíčkově Brodě. Je popsáno přibližně dvacet druhů arkobakterů. Svůj výzkum jsem převážně věnovala druhu *A.butzleri,* který se vyskytuje nejhojněji. Dále jsem měla kmen *A.cryaerophilus* a dva klinické izoláty *A.butzleri* odebrané od pacientů z nemocnice v Litomyšli, jeden od ženy a jeden od muže.

Hlavním cílem mé práce bylo zjistit, jak citlivé jsou arkobaktery na antibiotika. Výskyt tohoto rodu bakterií byl dlouhá léta podceňován. Tyto bakterie jsou považovány za patogenní bakterie. Patogenní bakterie jsou organismy, které napadají jiné organismy a způsobují bakteriální infekci. Konkrétně se jedná o enteropatogeny, bakterie způsobující onemocnění střevního traktu. Byly izolovány z různorodých prostředí a hostitelů, například z mušlí, ústřic, odpadních vod, mořské vody, drůbeže nebo jatečně upravených zvířat. Tudíž se dá uvažovat o tom, že hlavně prostřednictvím drůbeže a prasat jsou přenášeny. Toto tvrzení není zcela potvrzeno.

Dosud bylo popsáno přibližně dvacet druhů těchto bakterií, avšak další budou zřejmě popsány. Nemůžeme říci, že arkobaktery zcela známe. Například testy citlivosti na antibiotika nejsou pro arkobaktery dosud standardizované. V rámci studií bylo využito mnoho metod, např. E-test, diluční agarová metoda, diluční bujónová metoda a také disková difuzní metoda. Tuto metodu jsem použila ve svém výzkumu. Mé výsledky ukázaly, že mnoho kmenů *A.butzleri* je převážně odolných proti tetracyklinu 30 μg a clindamycinu 2 μg.

Praktický výzkum jsem prováděla na Katedře biologických a biochemických věd v rámci Fakulty chemicko-technologické na Univerzitě Pardubice v srpnu 2015. Má práce trvala několik měsíců. Musela jsem si nejprve zpracovat jednotlivé dokumenty o bakteriích rodu *Arcobacter* a o metodách zjišťujících citlivost bakterií k antibiotikům. Materiály byly dostupné pouze v anglickém jazyce.

2. Teoretická část

2.1. Bakterie

Bakterie jsou jednobuněčné prokaryotní organismy o velikosti přibližně tisíciny milimetru. Jsou popsány přibližně tři tisíce bakterií[1]. Vědci ale odhadují, že jsou jich na světě až miliony. V půdě se vyskytuje více bakterií než v mořích a oceánech[2]. Většina lidí zná bakterie jako škodlivé organismy. Vyskytují se ale i bakterie, které jsou prospěšné. Například jsou surovinou pro chemický průmysl, podávají nezbytné nebo prospěšné produkty hostiteli nebo slouží při úpravě potravin.

2.1.1. Stavba bakterie

Bakterie mají různý tvar buňky, např. do tvaru tyčinky či spirály[3]. DNA těchto organismů tvoří nukleoid. Právě nukleoid tvoří jeden chromozom, neboli genom, který kóduje jednotlivé geny. Bakteriální buňku vyplňuje zevnitř cytoplazma. Cytoplazma je rosolovitá hmota obsahující zásobní látky jako je například glykogen a kyselina poly-β hydroxymáselná. Tyto látky jsou zdrojem uhlíku a energie organismu. V cytoplazmě se nacházejí organely, ribozomy, které mají za úkol vytvářet bílkoviny. Skládají se z malé podjednotky, která je tvořena jednou molekulou mRNA. Je zde také velká podjednotka, která je tvořena dvěma molekulami mRNA. Dále se zde mohou nacházet i plazmidy. Plazmid je do kruhu smotané DNA. V bakteriální buňce můžeme najít více druhů plazmidů. Tato forma DNA může pronikat z jedné buňky do druhé, nebo se také může včlenit do centrální DNA tvořící nukleoid. Zvenku je organismus ohraničen cytoplazmatickou membránou tvořící tuhou buněčnou stěnu. Základní složkou buněčné stěny je peptidoglykan. Buněčnou stěnu může dále chránit i pouzdro tvořené bílkovinou nebo polysacharidem. Na povrchu mají bakterie důležité struktury zajišťující například obranu, zachycení na povrchu a také přilnutí na buňku hostitele. Pohybují se pomocí bičíků, fimbrí, smršťováním těla nebo klouzáním. Pomocí těchto lokomočních orgánů utíkají před nebezpečím, pohybují se za potravou nebo v těle hostitelů. Bakterie mají mnoho přirozených prostředí např. povrch těla, sliznice živočichů, voda, půda. Můžeme je najít také ve vzduchu.

2.1.2 Výskyt bakterií

I když jsou tyto organismy velmi malé, pouhým okem neviditelné, dokáží odolat extrémním podmínkám. Můžeme je najít v žaludku, kde jsou žaludeční šťávy. Jsou přítomny také v Mrtvém moři, zde je zase vysoká koncentrace soli a také vysoký tlak. Na Islandu se vyskytují v horkých pramenech, tam jsou extrémně vysoké teploty. Právě za nepříznivých podmínek ztratí bakteriální

---

[1]. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 80-247-3170-3

[2]. Bakterie v půdě a moři. In: *Osel.cz* [online]. Česká Republika: osel.cz, 2002, 2002 [cit. 2016-01-08]. Dostupné z: http://www.osel.cz/42-bakterie-v-pude-a-v-mori.html

[3]. SCHINDLER, Jiří.*Ze života bakterií*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2008, 143 s., [16] s. obr. příl. Průhledy (Academia). ISBN 978-80-200-1666-9

buňka vodu. Následně se cytoplazma zakoncentruje a uvnitř bakteriální buňky se vytvoří spora, která se nemnoží. V tomto stavu vydrží teploty od -190 °C do 100 °C. Pokud se buňka opět vystaví příznivým podmínkám, přijme vodu, změní se na bakterii s plnou životaschopností. Spora se vytváří pouze u některých mikroorganismů. Například arkobaktery sporu nemají.

Bakterie můžeme podle různých členění dělit do mnoha skupin:

1) <u>Podle teploty, která je pro bakterie vyhovující</u>

a) Mezofilní bakterie
Pro tyto bakterie je optimální teplota k růstu mezi 25-37 °C. Do této skupiny patří arkobaktery.
b) Psychrofilní bakterie
Rostou při nižších teplotách od 6 °C do 20 °C, sem můžeme zařadit například *rod Pseudomonas.*
c) Termofilní bakterie
Rostou v rozmezí mezi 40-70 °C. Díky této schopnosti mohou přežít v dříve jmenovaných termálních pramenech. Do této skupiny řadíme *Campylobacter jejuni,* tu však považujeme spíše za termotolerantní. Vysoce termofilní bakterií je *Geobacillus.*

2) <u>Podle tvaru</u>

a) Koky
Tyto bakterie mají kulovitý tvar. Podle počtu a tvaru dělíme je na:
- <u>koky</u> - nespojují se do žádných řetězců, žijí samostatně, např. *Micrococcus luteus*
- <u>diplokoky</u> - diplokoky se spojují do řetězců po dvou, např. *Neisseria gonorhoeae*
- <u>streptokoky</u> - spojují se do lineárních řetězců, vznikají spojením více než dvou bakterií, např. *Streptococcus pneumoniae*- pneumokok
- <u>stafylokoky</u> - stafylokoky se spojují do různorodých útvarů, které připomínají tvar hroznu, např. *Staphylococcus aureus*
- <u>sarciny</u> - tyto bakterie se shlukují nejčastěji po čtyřech do tvaru krychle, např. *Peptococcus anaerobius*

b) Tyčinky
Tyto bakterie mají tyčinkovitý tvar těla, který je však hodně různorodý. Tvar těla může být:
- <u>vibrio</u> - tyto bakterie mají zakřivený tvar těla, většinou mají bičík, např. *Vibrio cholerae*
- <u>spirila</u> - tvoří spirály, např. *Leptospira interrogans*
- <u>spirocheta</u> - též bakterie mající tvar spirály, např. *Borrelia burgdorferi*

3) <u>Podle nároku na kyslík</u>

Bakterie dělíme podle toho, zda potřebují vzduch nebo naopak nesmí žít na vzduchu.
<u>Aerobní bakterie</u> - potřebují pro život kyslík. Patří sem většina známých bakterií.
<u>Anaerobní bakterie</u> - v přítomnosti kyslíku by tyto bakterie zahynuly. Nesmí mít kyslík.
<u>Fakultativně anaerobní</u> - jsou schopné přežít jak v prostředí s kyslíkem, tak i bez kyslíku.

4) <u>Podle funkce</u>

Bakterie jsou velmi významné organismy. Vyskytují se téměř po celé Zemi. Důležité jsou hlavně v půdě, zde přeměňují organické zbytky odumřelých živočichů na anorganické zbytky. Právě anorganické zbytky potřebují rostliny ke svému růstu. Tomuto procesu říkáme mineralizace.

Nitrifikační bakterie - přeměňují amoniak na dusičnany. Tyto bakterie jsou důležité pro oběh dusíku v přírodě.
Denitrifikační bakterie - jsou opakem nitrifikačních bakterií. Přeměňují dusičnany na plynný dusík nebo amoniak.
Hlízkovité bakterie - jsou symbiotické bakterie. Žijí v souladu s bobovitými rostlinami, na jejich kořenech dokážou vázat vzdušný kyslík.
Hnilobné a kvasné - Jsou velmi důležité. Vyskytují se v zažívacím traktu, kde za nepřístupu kyslíku rozkládají potravu. Využívají se také v potravinářském průmyslu, např. octové a mléčné kvašení, kdy vzniká kyselina octová nebo mléčné výrobky.

5) Podle prostředí, ve kterém žijí

a) Bakterie žijící v půdě

Již jsem se zmínila o tom, že se bakterie vyskytují převážně v půdě. Zde plní funkci dekompozitorů. Rozkládají organické zbytky na anorganické. Způsobují tak zúrodňování půdy a oběh látek jako je P, N, S atd. V tomto prostředí mohou žít v symbióze s ostatními organismy a zde jsou jejich nezbytnou součástí života. Mohou být také patogenní a nebezpečné. Např. *Clostridium tetani*, bakterie způsobující tetanus.

b) Bakterie žijící ve vodě

Mohou se nacházet se vodách se zvýšeným obsahem organických látek. Tam zajišťují mineralizaci a samočištění vody. Tyto bakterie jsou prospěšné, avšak ve vodě se mohou vyskytovat i patogenní bakterie. Právě tyto organismy se naopak vyskytují ve vodě, která je kontaminována např. výkaly. Zástupce je např. *Vibrio cholerae*, která způsobuje choleru.

6) Bakterie patogenní, symbiotické

Bakterie dělíme na symbiotické a patogenní. Symbiotické bakterie jsou pro hostitele prospěšné. Naopak patogenní způsobují jiným organismům problémy a parazitují u nich.

a) Symbiotické bakterie

Žijí například v těle jiných organismů bez toho, aniž by jim způsobovaly nějaké onemocnění nebo ho poškozovaly. Oba účastníci tohoto vztahu mají určité výhody. Zástupci jsou bakterie rodu *Bifidobacterium* ovlivňující trávení v lidském střevě.

b) Patogenní bakterie

Patogenní bakterie napadají jiné organismy a způsobují závažná a přenosná onemocnění u lidí, rostlin i zvířat. Při napadení organismu nejdříve najdou místo v těle, které je pro ně ideální, rozmnoží se a následně infikují hostitele. Narušení hostitelského organismu způsobují mechanickým působením nebo také metabolity jejich organismu[4]. Některá onemocnění mohou být lehčí, jiná vážná a další mohou vést až ke smrti.

Seznam bakterií způsobujících některá známá vážná onemocnění[5]:

[4]. Bakterie patogenní. In: *Leporelo.info* [online]. [cit. 2016-01-08]. Dostupné z: https://leporelo.info/bakterie-patogenni

[5]. JELÍNEK, Jan a Vladimír ZICHÁČEK.*Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. 9. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2007, 575 s., [92] s. barev. obr. příl.:. ISBN 978-80-7182-213-4]

pneumokoky - zápal plic
streptokoky - zápal plic, angína
stafylokoky - nežity, kožní defekty a infekce
salmonely - břišní tyfus, salmonelóza
vibria - cholera
mykobaktria - tuberkulóza (TBC)

Proti některým původcům se můžeme bránit např. vakcinací. Nemoci se léčí užíváním antibiotik, avšak nadměrným užíváním těchto látek jsou patogenní bakterie na řadu antimikrobiálních látek odolné.

2.1.3. Rozmnožování bakterií

1) Nepohlavně

Bakterie se rozmnožují nepohlavním dělením velmi rychle. Jedno reprodukční dělení trvá od 20 do 50 minut. Rychlost závisí na množství živin v prostředí, ve kterém se bakterie nachází. Dělení začíná tak, že se chromozom začíná replikovat. Vzniknou tak dva chromozomy. Každý přejde k jednomu pólu buňky. Mezitím se buňka začíná zvětšovat a vytvářet novou plazmatickou membránu a buněčnou stěnu. Po dokončení replikace se každý chromozom přesune do jedné buňky. Ty jsou následně v místě dotyku rozděleny přehrádkou z nové plazmatické membrány a buněčné stěny. Výsledkem celého dělení jsou dvě naprosto identické dceřinné buňky. V příznivých podmínkách se může dělení uskutečnit každých 20 minut.

2) Pohlavně

Dva jedinci si vymění část chromozomu. Začíná tak, že se samičí buňka spojí se samčí. Samčí chromozom se pohybuje v samičí buňce. Pouze část samčího chromozomu vstoupí do samičí buňky, než se buňky rozdělí. Část samčího chromozomu nahradí část samičího chromozomu. Pohlaví buněk určuje F faktor (fertilní faktor). Pokud je v buňkách přítomen, potom jsou buňky samčí, pokud není, jsou buňky samičí.

2.2 Bakterie rodu *Campylobacter* a *Arcobacter*

2.2.1. Bakterie rodu *Campylobacter*

Bakterie rodu *Arcobacter* byly dříve zařazovány do rodu *Campylobacter.* Vědci však věděli, že v této skupině se také vyskytují i bakterie lišící se od ostatních kampylobakterů. Tyto dva rody se od sebe liší díky různým genům. Například kampylobaktery jsou termofilní bakterie rostoucí při 42 °C, avšak arkobaktery jsou mezofilní bakterie rostoucí při 30 °C. Díky výzkumu Vandamme et al. byly v roce 1991 zařazeny do rodu *Arcobacter*[6].

Kampylobaktery jsou drobné mikroby o velikosti buněk 0,3-0,6 μm. Způsobují velmi podobná onemocnění jako arkobaktery. Například průjmová onemocnění nebo aborty u zvířat. Stejně jako arkobaktery rostou pomaleji než jiné baterie. Růst trvá 24 - 48 hodin, při delší kultivaci i 72 hodin. Přežijí i v nepříznivých podmínkách. Zdrojem těchto bakterií bývají nejčastěji různá domácí zvířata. Dá se říci, že se vyskytují u stejných hostitelů jako arkobaktery. Nákaza může být například ze špatně upravených kuřat, ústřic, mléka, kozích sýrů nebo také od zvířat s průjmem. Příznaky jsou horečka, bolest hlavy a následně průjem a křeče v břiše. Stolice je vodnatá, popřípadě s krví. Často se vyskytují v zažívacím traktu volně žijících ptáků, těm ale nezpůsobuje

[6]. PHILLIPS, C.A. Arcobacter spp in food: isolation, identification and control.Trends in Food Science & Technology [online]. Elsevier, 2001, Srpen 2001,**12,**(8), 263–275 [cit. 2016-01-09]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224401000905

žádné problémy. Proto volně žijící ptactvo může být přenašečem kampylobakterů.

2.2.2. Bakterie rodu *Arcobacter*

Arkobaktery jsou gramnegativní bakterie, což znamená, že mají odlišnou buněčnou stěnu. Kolonie jsou mléčného zbarvení, buňky mají tyčinkovitý tvar. Může být zakřivený či rovný. Jsou charakteristické také zvláštním zápachem. Jsou přibližně 0,2-0,9 µm široké a 0,5-3 µm dlouhé[7]. Pohybují se díky bičíku. Mohou žít jak v aerobním, ale i anaerobním prostředí. Řadíme je mezi slabě rostoucí bakterie, proto je práce s nimi složitější než s jinými bakteriemi. Tato vlastnost může mít negativní následky při určování citlivosti na antibiotika. Například inhibiční zóny jsou méně výrazné než u bakterií, jako je např. *Staphylococcus*. Při kultivaci vytváří 2-4 mm velké kolonie bělavé barvy. Bylo popsáno přibližně dvacet druhů těchto bakterií a další budou zřejmě popsány. Popsané druhy jsou *A.butzleri, A.cryaerophilus, A.skirrowii, A.halophilus, A.nitrofigilis, A.cibarius* a další.

Tyto bakterie jsou na rozdíl od kampylobakterů méně známé zejména v důsledku omezené detekce či omezených identifikačních metod. V izolačních postupech pro tyto bakterie se vyskytují odchylky. Izolace jsou založeny na základě jiného prostředí, vody, zeměpisné polohy nebo velikosti vzorku. Vědci však zjistili, že bakterie tohoto rodu jsou odolné na velké množství antibiotik.

Arkobaktery jsou velmi nebezpečné. Nejen, že mohou způsobovat závažná onemocnění střevního traktu, ale bylo prozkoumáno, že se občas vyskytují s bakteriemi způsobujícími endokarditidu. Toto onemocnění se projevuje zánětem vnitřní výstelky srdce. Považují se také za původce alimentárního onemocnění. Toto onemocnění vzniká na základě nákazy mikroorganismem, který se dostane do těla živočicha[8]. Mikroorganismus se sem dostane přes trávicí trakt prostřednictvím kontaminované vody. Následně se projeví onemocněním střevního traktu.

Právě průjem je hlavním příznakem onemocnění způsobeného arkobaktery. Například *A.butzleri* je hlavním původcem vodnatého průjmu, na rozdíl od *Campylobacter jujuni* způsobující krvavý průjem. Arkobaktery napadají i zvířata. U zvířat jsou příčinou abortů, mastitidy (zánětu mléčné žlázy), předčasných narození mláďat a poruch trávení.

Byly izolovány z různých prostředí a hostitelů. Například byly objeveny na korálech, v planktonu, šnecích nebo také v ropných polích. Zejména u drůbeže, mléka, prasat a červeného masa se ukázalo, že jsou často kontaminovány bakteriemi rodu *Arcobacter.* Na základě toho byla tato zvířata určena jako přenosné cesty pro arkobaktery. Myšlenka nebyla však plně dokázána. Přenos na člověka či zvíře se může také uskutečnit prostřednictvím kontaminované vody nebo potravin. Arkobaktery byly například nalezeny ve zdrojích pitné vody, což může mít velmi vážné následky. Pitná voda byla kontaminovaná například v Německu. Ve vodě byly nalezeny stejné arkobaktery jako v izolátech získaných od pacientů. Tato cesta však není zcela prokázána. *A.butzleri, A.cryaerophilus, A.skirrowii* se nejvíce vyskytují zejména ve vodě, která je kontaminovaná výkaly, než ve vodě, která není kontaminovaná. Všechny vzorky kanalizačních vod byly pozitivní na arkobaktery. Kanalizace mohou být důležitým zdrojem pro tyto mikroby.

Bakterie rodu *Arcobacter* žijí i v mořích. Můžeme zde najít *A.halophilus, A.marinus* nebo nedávno objevený *A. defluvii.* V minulosti proběhlo několik výzkumů. Na základě jejich závěrů můžeme tvrdit, že bakterie rodu *Arcobacter* snášejí vysokou koncentraci chloridu sodného, růst

---

[7]. YESILMEN, Simten, Aydin VURAL, Mehmet Emin ERKAN a Ibrahim Halil YILDIRIM. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Arcobacter species in cow milk, water buffalo milk and fresh village cheese

[8]. Původci alimentárních onemocnění. In: *Eagri.cz* [online]. Česká Republika, 2012, 2012 [cit. 2016-01-09]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/mze/potraviny/bezpecnost-potravin/puvodci-alimentarnich-onemocneni.html

nastává při nižších teplotách, mají schopnost připojit se k různým typům povrchů. Právě tyto vlastnosti mohou vysvětlit kontaminaci potravin arkobaktery. Bakterie tohoto druhu byly rovněž nalezeny u hospodářských zvířat. U nich se arkobaktery vyskytují hlavně na kůži nebo vnitřnostech.

Na základě několika studií se objevil názor, že se maso může kontaminovat, pokud se při porážecím procesu dostane do kontaktu s výkaly nakažených zvířat. Zdrojem nemusí být pouze kuřecí či vepřové maso, ale také mušle a jiní měkkýši. V minulosti byla provedena studie, která měla zajímavé výsledky. 100% škeblí a 41% mušlí bylo kontaminováno arkobaktery. Zajímavé však je, že zde byla velká rozmanitost druhů arkobakterů. Mušle jsou hlavním zdrojem pro objevování nových druhů. Bylo také zjištěno, že arkobaktery jsou původci cestovatelských průjmů. Těmito průjmy mohou trpět například Evropané nebo Američané, kteří navštíví Mexiko, Guatemalu či Indii. Převážně zde se tyto mikroby hojněji vyskytují. Nákazu způsobuje hlavně *A.butzleri.*

Arkobaktery byly izolovány od pacientů, kteří trpěli i netrpěli průjmem. Více se vyskytují u lidí trpících nějakou vážnou nemocí. Může to být cukrovka, rakovina, chronické selhání ledvin nebo HIV[9]. Jak jsem již zmínila, arkobaktery napadají i zvířata. Byly získány z vaginálních výtěrů krav bez problémů rozmnožování, z předkožky kanců nebo od prasnic, které měly opakované problémy s potratem. Právě *A.cryaerophilus* je spojen s aborty u zvířat. Naopak *A.butzleri* je původcem průjmů u koní, skotu a prasat. *A.skirowii* je spojen s průjmem u ovcí a také skotu. Ve Velké Británii však izolovali lékaři *A.butzleri* z krve těhotné matky. V důsledku těchto zjištění můžeme říci, že *A.butzleri* je všudypřítomný patogen. Je také považována za původce novorozenecké bakteriální infekce, která může vyvolat předčasný porod[10].

Na základě nedostatečného prozkoumání patogenity druhů jako je *A.halophilus, A.nigrofigilis* nebo *A.cibarius* nebylo určeno, co tyto druhy konkrétně způsobují u lidí a zvířat. Bylo vyzkoumáno, že významným hostitelem arkobakterů je drůbež. Zejména kuře, kachna, domácí husa, krůta a poté také mléko[11]. Většina klinických případů svědčí o tom, že jsou izolovány především ze savců. Arkobaktery byly ale také objeveny u přirozeně infikovaného pstruha duhového. I v mém experimentu jsem použila jeden vzorek, který byl odebrán z kontaminovaného masa lososa. Nebyla zatím zjištěna ideální izolace pro arkobaktery. Je známo, že těmto bakteriím vyhovuje izolace používaná při izolování kampylobakterů.

2.3. Antimikrobiální látky

Tyto látky můžeme rozdělit podle jejich původu. Existují syntetická antibiotika, ale také antibiotika přírodního původu. Jsou to produkty mikroorganismů napomáhající jim k přežití v daném prostředí, např. plíseň *Penicillium* produkuje látku pojmenovanou jako penicilin.

Přírodní produkty, které obsahují antimikrobiální látky, jsou cibule, česnek, rebarbora,

[9]. COLLADO, Luis a Maria José FIGUERAS. Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus Arcobacter. American Society for Microbiology [online]. 2011, Leden 2011, **24** (1), 174–192 [cit. 2016-01-09]. Dostupné z: http://cmr.asm.org/lens/cmr/24/1/174

[10]. ON, S.L.W, A. STACEY a J. SMYTH. Isolation of Arcobacter butzleri from a neonate with bacteraemia. Journal of Infection [online]. Elsevier, 1995, 7.3.1995, **31** (3), 225-227 [cit. 2016-01-09]. Dostupné z: http://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(95)80031-X/pdf]

[11]. International Journal of Food Microbiology [online]. Elsevier, 2014, 1.10.2014, **1**(188), 11-14 [cit. 2016-01-09]. Dostupné z:http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160514003365

švestky, med, zázvor či skořice[12]. Z těchto plodů přírody se vyrábějí různé extrakty. Jsou využívány, pokud je jedinec alergický na farmaceutická antibiotika. Někteří lidé je využívají jako prevenci v období nemocí.

První objevy nastaly v 19. století a velký rozvoj byl během válek, kdy se choroby daleko snadněji přenášely. Nejdříve byla antibiotika získávána z přírodního prostředí. Později se antibiotika začala vyrábět i chemicky. První chemicky připravené antibiotikum se nazývalo pyocyanáza. Bylo produkováno rodem *Bactericium pyocyaneum*. Průzkum ukázal, že tato látka byla účinná v inhibici růstu, ale také usmrcovala patogenní bakterie. Účinná byla proti tyfu, záškrtu a moru. Antibiotikum sklidilo velký úspěch. Později, když bylo aplikováno na pacientech, se zjistilo, že je nestálé a toxické. Krátký čas se používalo ve formě kožní masti. Poté se přestalo zcela používat.

Mnoho vědců se zajímalo o nalezení antibiotik, která by byla účinná a přitom netoxická. V roce 1928 Alexandr Fleming objevil penicilin. Penicilin se však pro léčbu bakteriální infekce využil poprvé až v roce 1940[13]. Prvními účinnými, chemicky vyrobenými látkami byly sulfoamidy, kdy Gerhard Domagk přišel s tím názorem, že barviva usmrcují patogenní bakterie[14]. Jeho úspěšný pokus mu vyšel na zvířatech uměle infikovaných streptokoky. Později se však ukázalo, že usmrcení nezpůsobují barviva. Byly to totiž sulfoamidy navázané na molekulu barviva. Sulfoamidy se v těle uvolňovaly a následně bakterie usmrtily. Poté bylo vyvinuto antibiotikum Prontosil. Bylo netoxické, stálé a účinné. Sulfidy se tedy považují za syntetické látky, protože prvotně nebyly vylučovány jinými mikroorganismy.

Existuje přes 6000 různých produktů majících antibiotický účinek, avšak pouze 80 těchto látek se používá k léčbě. Jejich výroba je velmi drahá. Aby byla daná látka použita jako antibiotikum, nesmí ničit v těle eukaryotní buňky. Musí mít co nejméně vedlejších účinků jako je např. alergie, únava, bolest hlavy, střevní potíže či potlačení obnovení imunitního systému[15]. Účinkovat musí v malých koncentracích. Žádné antibiotikum není totiž pro jakékoliv mikroorganismy zcela neškodné.

Antimikrobiální látky můžeme rozdělit:

2.3.1. Baktericidní antimikrobiální látky

Jsou látky způsobují usmrcení bakterie. Působí rychleji než antibiotika bakteriostatická, přibližně od jednoho dne do dvou dnů. Např. peniciliny.

2.3.2. Bakteriostatické antimikrobiální látky

Tato antibiotika pouze zastavují růst bakterií. Poté už je pouze na našem těle a jeho

---

[12]. Jaké jsou nejúčinnější přírodní antibiotika? Příroda nás připravila na vše. In: *Http://svobodnenoviny.eu*[online]. Česká Republika: svobodnenoviny.eu, 2015 [cit. 2016-03-06]. Dostupné z: http://svobodnenoviny.eu/jake-jsou-nejucinnejsi-prirodni-antibiotika-priroda-nas-pripravila-na-vse/

[13]. Objev penicilinu. In: *Www.ceskebakterie.estranky.cz* [online]. Česká Republika, 2014, 2014 [cit. 2016-01-09]. Dostupné z: http://www.ceskebakterie.estranky.cz/clanky/penicilin.html

[14]. LEVY, Stuart B. *Antibiotický paradox: jak se nesprávným používáním antibiotik ruší jejich léčebná moc*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2007, 312 s. Galileo. ISBN 978-80-200-1485-6

[15]. Antibiotika: Víte, kdy a jak nám opravdu pomáhají? *Http://www.alphega-lekarna.cz* [online]. Česká Republika: ALLIANCE HEALTHCARE FRANCE SA [cit. 2016-02-22]. Dostupné z: http://www.alphega-lekarna.cz/web/consumer-facing/antibiotika1

imunitním systému, jak se s cizorodou bakterií vyrovná. Látky pouze sníží metabolismus bakteriální buňky. Začínají působit přibližně za tři až čtyři dny. Pokud se však podají ve větší koncentraci, než je určeno, mohou se tyto látky stát také bakteriocidními. Často se používají. Důvodem je, že jsou levnější, mají méně vedlejších účinků. Např. tetracykliny, sulfoamidy.

2.3.3. Úzkospektré antimikrobiální látky

Používáme v případě, pokud víme, jakým mikroorganismem jsme nakaženi[16]. Působí pouze na některé bakteriální rody a druhy.

2.3.4. Širokospektré antimikrobiální látky

Jsou aplikovány, pokud přesně nevíme, jakým mikroorganismem jsme nakaženi. Např. pokud pojedu na dovolenou, vezmu si širokospektrá antibiotika, protože nevím, čím se mohu nakazit. Usmrcují větší spektrum bakterií. Stává se, že zabijí i bakterie užitečné pro naše tělo. Na základě toho můžeme říci, že jsou více agresivní.

Usmrcují bakterie, prvoky a některé houby. Je však nutné upozornit na to, že na viry a parazity nepůsobí[17]. V letech, kdy byl objeven penicilin, se věřilo, že právě antibiotika působí i na viry a jsou jakýsi „všemocný“ lék. Postupem času se ukázalo, že tato myšlenka byla mylná.

Používají se hlavně k léčbě infekčních onemocnění např. angína, zápal plic, tyfus a dříve mor. Jsou využívány i pro profylaktické použití. To znamená, že antibiotika se preventivně podávají pacientovi před chirurgickou či ortopedickou operací, aby se předešlo infekci. Jak jsem se již zmínila, ničí i bakterie užitečné pro naše tělo[18]. Zpravidla se při léčbě antibiotik používají probiotika. Probiotika mají zlepšit rovnováhu střevní mikroflóry člověka. Následně vytvářejí fungující imunitu. Naše tělo tak správně využije vitamíny, vápník a jiné tělu prospěšné látky. I probiotika snižují riziko infekce střevního traktu. Z těchto důvodů se v poslední době stává, že se probiotika stávají doplňkem při léčbě antibiotiky. Užívají se při léčbě, pokud je vedlejším účinkem antibiotik průjem[19].

2.3.5. Účinnost antimikrobiálních látek

Účinnost antibiotik závisí na místě konkrétní infekce a na schopnosti antibiotika pronikat do jednotlivých tkání. Jejich působení je symptomatické. Antimikrobiální látky reagují na příznaky nemoci a ne na příčiny, které ji vyvolaly. Z tohoto důvodu je projev nemoci léčen, avšak příčina ne. Bakterie jsou zneškodněny tak, že se antibiotikum naváže na bakterii. Následně způsobí lýzu buňky (její rozpad). Antimikrobiální látky zasahují struktury bakterií, což znamená, že ničí jejich buněčnou stěnu nebo cytoplazmatickou membránu. Zabrání totiž syntéze bílkovin do cytoplazmatické membrány. Mohou také poškodit metabolismus bakterie. Poté si bakterie nemůže syntetizovat proteiny z prostředí, nukleové kyseliny atd. .

---

[16]. LOYDOVÁ, Vladimíra. Vliv antibiotik na lidské tělo. [prezentace]. Chrudim: Nemocnice, [cit.2016-03-06]

[17]. Co jsou antibiotika? *Http://www.testcrp.cz* [online]. Česká Republika: 4 Orion Diagnostica [cit. 2016-03-06]. Dostupné z: http://www.testcrp.cz/antibiotika/co-jsou-antibiotika/

[18]. Antibiotika? Jen v krajním případě! *Http://www.abecedazdravi.cz*[online]. Česká Republika: Abeceda Zdraví s.r.o., 2015 [cit. 2016-03-06]. Dostupné z: http://www.abecedazdravi.cz/doplnky-stravy/antibiotika-jen-v-krajnim-pripade-1

[19]. Užívání antibiotik a probiotické bakterie.*Http://www.alphega-lekarna.cz* [online]. Česká Republika: Alliance Healthcare Group France [cit. 2016-02-22]. Dostupné z: http://www.alphega-lekarna.cz/uzivani-antibiotik-a-probioticke-bakterie

U antibiotik je velmi důležitá MBC (minimální baktericidní koncentrace), je to množství antibiotika, které ovlivňuje růst bakterií v dané populaci. Dále je důležitá MIC (minimální inhibiční koncentrace), toto je taková koncentrace antibiotika, která dané bakterie usmrtí.

2.3.6. Charakteristika antibiotik testovaných v mém experimentu

Ampicilin 10 µg

Zkratka je AMP. Řadí se do skupiny aminopenicilinů. Účinná látka je ampicilin. Princip účinku je narušení buněčné stěny bakterií. Některé bakterie si již na toto antibiotikum vybudovaly rezistenci díky enzymu beta-laktamáza. Ten je vypouštěn a následně je zničeno toto antibiotikum. Vytvořily se různé deriváty ampicilinu, na které zatím mikroorganismy odolné nejsou. Používá se k léčbě zánětu močových cest, horních a dolních dýchacích cest. Vedlejšími účinky může být oslabení imunitního systému nebo vyrážka.

Amoxicillin 30 µg

Zkratka je AMC. Nachází se ve skupině beta-laktamových antibiotik. Je to širokospektré antibiotikum. Je velice podobné ampicilinu[20].Má lepší schopnost lépe se vstřebat do střeva. Je široce používané. Jako ampicilin je také rozkládáno beta-laktamázou. Má i podobné využití. Používá se pro léčbu zápalu plic, infekce močových cest, infekce dýchacích cest, zánětu průdušek a středoušních zánětů[21]. Vedlejší účinek může být průjem, vyrážka a méně obvyklý lehký zánět jater. *E.coli* a *Staphylococcus aureus* si na toto antibiotikum vytvořily rezistenci.
Obchodní názvy jsou např. Amoxi, Amoxil, Amoxin.

Clindamycin 2 µg

Zkratka je CLI. Patří mezi linkosamidy. Je velmi hojně využíván. Mechanismus účinku je takový, že narušuje tvorbu bakteriálních bílkovin. Na základě toho narušuje celkový metabolismus bakterie. Toto antibiotikum může být jak bakteriostatické, tak i bakteriocidní. Záleží na míře koncentrace. Používá se pro léčbu hloubkových zánětů např. zubní infekce, zápal plic či otrava krve. Má totiž schopnost procházet kostní tkání.

Tetracyklin 30 µg

Zkratka je TET. Je zařazen do skupiny tetracyklinů. Patří mezi bakteriostatická antibiotika. Dobře se vstřebává do střevního traktu. Dříve měl velmi velké spektrum účinnosti. V současné době se zvyšuje rezistence na tuto látku. Rezistence byla vybudována u stafylokoků, streptokoků a pneumokoků. Vedlejším účinkem může být průjem. Může se ukládat do nedotvořené kostní tkáně a následně způsobit narušení její skladby a růstu. Je málo toxický. Použití pro léčbu infekce pohlavních a močových cest.

Erythromycin 15 µg

Zkratka je ERY. Je zařazen do skupin makrolidů. Je bakteriostatický. Toxicita je velmi nízká. Spektrum jeho působnosti je malé, protože se na něj mikroorganismy staly rezistentní. Dobře se vstřebává do trávicího traktu. Občas se používá jako náhrada za penicilin, pokud je pacient na tuto

---

[20]. Amoxicillin. In: *Http://lekarske.slovniky.cz* [online]. České Republika: Maxdorf [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: http://lekarske.slovniky.cz/pojem/amoxicili

[21]. Amoxicilin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Amoxicilin]

látku alergický. Používá se při léčbě akné. Klinické použití je proti streptokokům, pneumokokům a stafylokokům. Tyto mikroorganismy jsou však na erythromycin již převážně rezistentní.

Ciprofloxacin 5 µg

Zkratka je CIP. Je zařazen mezi chinolony. Je to baktericidní látka. Ciprifloxacin má široké spektrum působnosti. Léčí infekce močového měchýře, ledvin, v oblasti břicha a dýchacích cest.[22] Nežádoucími účinky může být horečka, otoky obličeje a krku, problémy s dýcháním či zežloutnutí očí a kůže.

2.4. Rezistence bakterií proti antibiotikům

Mnoho patogenních bakterií je v současné době odolných na antibiotika již dříve využívaná. Může to být ale také na antibiotika používaná pouze krátkou dobu. Znamená to, že bakterie jsou schopny přežít a rozmnožovat se v MIC podávaného antibiotika. To by však za normálních okolností mělo inhibovat nebo usmrcovat dané bakterie.

Nadměrným využíváním antibiotik, které není vždy potřeba, se bakterie postupně naučily antibiotikům odolávat. Dokonce i špatným předepisováním se stala většina antibiotik celkem neúčinná. Někdy se také stává, že jsou předepsána proti virovým onemocněním, jako je chřipka. Na ni však nejsou účinná. Často si sami vynucujeme předepsání antibiotik. Antibiotické látky jsou také někdy předepisovány čistě z komerčního důvodu.

Jak jsem se již zmínila, používání antibiotik bylo před několika lety významně zvýšené. Například mezi rokem 1989 až 2000 se používání v ČR zvýšilo o jednu čtvrtinu. Jsou nejprodávanější lék na světě. Ročně se prodá množství antibiotik v ceně 45 miliard dolarů. Různé kontrolní inspekce zjistily, že se 50 - 80% antibiotik předepisuje zcela zbytečně[23].

Dříve se antibiotika podávala dobytku. Nejen, že způsobovala jeho přírůstek, ale i preventivně zabraňovala epidemiím a následnému vyhubení celého chovu. Dnes je již tato činnost zakázána. Antibiotické látky se mohou také špatně užívat. Někdy je nevhodně zvolena doba, po kterou se antibiotika podávají, jindy se užívají v nesprávné koncentraci. Pokud jedinec užívá antibiotika krátce, může se stát, že bakterie se dostanou pouze do stavu utlumení. Poté, když se antimikrobiální látky přestanou užívat, se opět navrátí do běžných životních funkcí. Tak se postupně bakterie stávají rezistentní na antibiotika. Toto je bohužel velmi častý případ. Rezistence může ale také probíhat v přírodě. Tam se tyto látky dostávají pomocí odpadních vod.

V současné době je daleko obtížnější vyvinout či najít nová antibiotika. Jako nové antibiotické látky se většinou používají deriváty již používaných antibiotik. Jenže bakterie jsou za určitých podmínek odolné i na tyto nové deriváty.

2.4.1. Způsob obrany bakterií proti antibiotikům

Bakterie změní povrch buňky. Mohou vylučovat určité enzymy[24]. Enzymy antibiotikum

---

[22] . *Ciprofloxacin* [online]. In: Česká Republika, 2012 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: http://pribalove-letaky.cz/ciprofloxacin-teva-tablety

[23]. Antibiotika - léčí i škodí - a jak z toho ven. *Http://www.zelene-zdravicko.cz* [online]. Česká Republika: Clear shot s.r.o. [cit. 2016-03-06]. Dostupné z: http://www.zelene-zdravicko.cz/antibiotika.php

[24]. Žurnál online: Za sníženou funkcí antibiotik stojí enzymy [online]. Univerzita Palackého v Olomouc, 2014 [cit. 2016-03-06]. ISSN 1805-6865. Dostupné z:

zneškodní tak, že zničí jejich strukturu, změní cíl působení antibiotika. I bakterie mohou vylučovat různá antibiotika, díky kterým se ochrání[25]. Obsahují také přenosné geny zajišťující bakteriím obranu vůči jednotlivým antibiotikům. Geny jsou uloženy v plazmidech. Toto do kruhu smotané DNA si mohou bakterie vyměňovat. V důsledku toho se může celá kolonie postupně stát rezistentní.

Plazmidy umožňují provádět nové funkce a vylučovat nové produkty nemající genetický kód uložený na chromozomu. Díky těmto organelám se přizpůsobují změnám teplot, ultrafialovému záření a dalším podmínkám. Při těchto podmínkách by byly bakterie jinak usmrceny. Na rozdíl od virů nemají plazmidy u bakterií vnější bílkovinný obal, proto se mohou vyskytovat i mimo bakteriální buňku. Množit se ale mohou pouze uvnitř buňky. Plazmidy se neustále mění a získávají nové geny. V bakteriální buňce se může více různých plazmidů kombinovat nebo si vyměňovat úseky DNA. Následkem je, že se bakterie může stát rezistentní na větší počet antibiotik.

2.4.2. Druhy rezistence

Přirozená (primární) rezistence

Přirozená rezistence je stav, pokud jsou bakterie již od přírody na antibiotikum nebo jinou antibiotickou látku odolné[26]. Je to vrozená vlastnost, která zajišťuje bakteriím necitlivost na podávané antibiotikum. Např. nepropustí antibiotikum dovnitř bakteriální buňky. Následkem je to, že antimikrobiální látka na bakterii nepůsobí. Bakterie mají stejný genetický kód, tudíž jsou i odolné na stejné množství antibiotik. Mají ji všichni jedinci v kolonii. Je kódována na chromozomu a je vertikálně nepřenosná.

Získaná (sekundární) rezistence

Tento druh rezistence je v současné době velmi závažným problémem v medicíně[27]. Bakterie, které byly nejprve citlivé na antibiotikum, se postupně stávají odolnými. Vybrané antibiotikum se tak stává neúčinným. Pokud antibiotikum nezničí všechny jedince v daném prostředí, buňky se stávají odolnými a následně i jejich potomstvo. Ve výsledku se tedy mohou různé druhy bakterií stát odolnými na antibiotikum. Daná látka bude již nepoužitelná. Tomuto jevu říkáme selekční tlak antibiotik.

Může k ní docházet také prostřednictvím mutací. Dojde ke spontánním změnám v genomu bakterie. Následně se buňky začínají množit a rezistence se přenáší na potomstvo. Tomuto jevu se říká vertikální přenos rezistence. Mutace však nejsou příliš časté. Potomků s mutací se vyskytuje malé množství, navíc jejich růst bývá zpomalen.
Pod sekundární rezistenci můžeme také zařadit plazmidovou rezistenci.

Plazmidová rezistence

Jak jsem již popsala, vzniká na základě toho, že si bakteriální buňky získají plazmidy. Ty

---

http://www.zurnal.upol.cz/zprava/clanek/za-snizenou-funkci-antibiotik-stoji-enzymy/

[25]. Antibiotická rezistence. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001, 29. 12. 2015. Dostupné také z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Antibiotická_rezistence

[26]. LOCHMANN, Otto.*Základy antimikrobiální terapie*. Vyd. 2. Praha: Triton, 1999, 127 s. ISBN 80-725-4005-X

[27]. NĚMCOVÁ,Sabina. Problematika bakteriální rezistence, nežádoucí účinky antibiotik.[online prezentace]. [cit.2016-03-06]. Dostupné z: http://slideplayer.cz/slide/3252161/

kódují jednotlivé geny pro obranu vůči antibiotikům. Plazmidy kódují přibližně do 5% celkové DNA v bakteriální buňce[28]. Tato zvláštní DNA poskytuje bakterii geny potřebné na ochranu před antibiotiky. Bakterie zase dává plazmidu prostředí potřebné na rozmnožení.

Multirezistence

V dnešní době je velmi závažným problémem, protože stěžuje lékařům léčbu bakteriálních infekcí jak u lidí, tak u zvířat. Bakterie jsou odolné na více antibiotik najednou. Vzniká na základě získávání odolnosti proti jednotlivým antibiotikům. Bakterie totiž jednotlivě získané znaky neztrácí. Mohou být rezistentní jak k antibiotikům s podobnou chemickou strukturou, tak k antibiotikům, která mají chemické složení zcela odlišná. Bakteriální buňky mají totiž více mechanismů obrany, obsahují rovněž plazmidy, které mohou být vyměňovány mezi různými druhy bakterií. Velmi odolné bakterie jsou např. pneumokok odolný na penicilin a cyfaslosporiny. Dále to je stafylokok odolný na oxycilin a vankomycin. V průběhu 20. století se přišlo na to, že se již objevila multirezistence k penicilinům, sulfoamidům a tetracyklinům. Právě bakterie, které jsou odolné na tetracyklin, bývají často rezistentní i na penicilin.

2.5. Zjišťování citlivosti bakterií k antibiotikům

Provádí se za účelem toho, aby se zjistilo, zda jsou bakterie na antibiotikum citlivé a následně jestli se antibiotikum může pacientovi podat.

2.5.1. Diskové difuzní testy

Tento způsob testování je nejjednodušší[29] a nejrychlejší. Na Petriho misku, ve které je uloženo agarové médium, se nanese mikrobiální suspenze. Poté se nanesou antibiotické disky z buničiny. Misky se dají inkubovat. Dojde k difuzi antibiotika z jednotlivých disků do agarového média. Antibiotikum tak difunduje do agarového média. Po inkubační době vznikají inhibiční zóny okolo antibiotických disků. Tyto zóny jsou prostředím, kde antibiotikum bakterie usmrtilo. Čím větší je zóna, tím více je antibiotikum účinné a tím více jsou bakterie citlivé. Zóny mají kulatý tvar. Velikost závisí na citlivosti bakterie, difuzi antibiotika, pH půdy, výšce půdy, velikosti bakterií, jejich množení. Závisí také na živné látce, ve které byly bakterie rozptýleny. Metoda dovoluje usoudit, zda jsou bakterie citlivé nebo odolné na testované antibiotikum. Můžeme také určit jaká je potřebná koncentrace antibiotika, aby dokázala usmrtit bakterii a minimálně škodila pacientovi.

[28]. Plazmid. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001, 12. 9. 2015. Dostupné také z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Plazmid

[29]. *Mikrobiologické laboratorní metody* [online]. Brno, 2014, , 1 - 84 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z:http://www.vfu.cz/inovace-bc-a-navmgr/realizovane-klicove-aktivity/skripta/ls-2013-2014/mikrobiologicke-laboratorni-metody.pdf

Obr. č . 1 – Disková difuzní metoda

2.5.2. Kvantitativní difúzní testy (E-test)

Tyto testy jsou finančně náročné. Pro každé testované antibiotikum se totiž musí použít jeden test. Používáme je za předpokladu, že již známe kvalitativní hodnoty testovaného antibiotika. V testu používáme agarové médium. Na něj je nanesena mikrobiální suspenze s testovaným inokulem. Dále se na agar přiloží plastový testovací proužek. Proužek je napuštěn různými koncentracemi testovaného antibiotika. Koncentrace jsou na proužku uspořádány vzestupně. Na proužku se také nachází číselná stupnice znázorňující dané koncentrace[30]. Petriho misky se dají na 24 hodin inkubovat. Po uplynutí doby kultivace se na miskách objeví inhibiční zóny. Inhibiční zóny mají tvar elipsy. Tam, kde se inhibiční zóna dotýká s proužkem, určíme MIC. Stupnice na proužku slouží k jejímu odečtu. Záleží na tom, v jaké části proužku se vytvoří inhibiční zóna. Výhodou testu je lehká manipulace. Nevýhodou je velká cenová nákladnost.

Obr. č. 2 - E-test

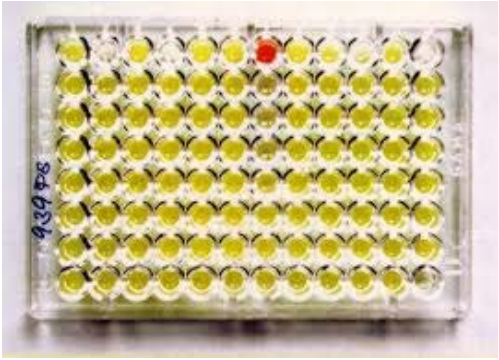
2.5.3. Diluční testy

Diluční testy slouží ke kvantitativnímu stanovení citlivosti. Spočívají v tom, že se do malých jamek přidá bujón, do každé pozice jiná koncentrace testovaného antibiotika. Antibiotika jsou ředěna postupně v předem dané koncentrační posloupnosti. Následně se naočkují do bujónu testované bakterie pomocí mikropipety. Mikropipety slouží k rychlejší manipulaci. Jako živné médium, tedy bujón, používáme Müller-Hinton bujón. Zkumavky se nechají inkubovat. Poté se podle míry zakalení pozná, jakou rozmnožovací schopnost mají bakterie v tomto prostředí.

[30]. Stanovení citlivosti na ATB kvantitativní metodou – E-test. *Http://ulbld.lf1.cuni.cz* [online]. Česká Republika: GAlén, 2015 [cit. 2016-02-23]. Dostupné z: http://ulbld.lf1.cuni.cz/seznam-lab-vysetreni?vysetreni=1320

Určujeme také účinnost dané koncentrace antibiotika. Čím je zákal větší, tím více se bakterie rozmnožily. V důsledku toho považujeme antibiotikum za méně účinné. Výsledkem je zjištění, jaká je nejmenší koncentrace antibiotika, která dokáže zastavit viditelný růst bakterií. To znamená, že zjistíme hodnotu MIC.

Někdy MIC může být shodná, pokud je testované antibiotikum baktericidní a má silný účinek. MIC může být jindy oproti MBC mnohonásobně vyšší. Jednotlivé hodnoty závisí na druhu antibiotika a druhu bakterií. Zakalení se měří spektrofotometrem. Výhodou testů je, že se na jedné destičce může testovat až 12 koncentrací daného antibiotika. Metoda také dovoluje testovat na jedné destičce současně 12 různých antibiotik. Nevýhodou je špatné stanovení výsledků, pokud se v testu objeví kontaminace.



Obr.č. 3 - Diluční metoda v bujónu

Diluční metoda v bujonu (zkumavková)

Testy se mohou provádět s bujónem. Tento test nazýváme zkumavkový test. Do zkumavek obsahujících jamky se aplikuje bujón o objemu vyšším než 1 ml. Bakterie musí tvořit podle McFarlandovy zákalové stupnice zákal 0,5[31]. Následně se přidají rozdílné koncentrace antibiotika.

Diluční metoda v agaru

Tato metoda se provádí s agarem v Petriho miskách. Tento test se nazývá plotnový. Agar, který slouží k testování, obsahuje rozpuštěné sloučeniny o různých koncentracích antibiotika. Agarové médium má výšku 4 mm a pH 7,4. Bakterie opět musí tvořit zákal 0,5. Na plotny je naneseno inokulum. Misky se poté nechají při příslušné teplotě inkubovat. Nevýhodou jsou náročné přípravy. Tento test není vhodný pro běžný provoz.

2.5.4. Kapková metoda

Používá se velmi zřídka. Je nepřesná. Základem je nanesení mikrobiální suspenze na tuhý povrch, tudíž na Müller-Hinton agar. Využívá se pouze ke zjištění, zda je testovaná bakterie vůbec na antibiotika citlivá.

2.5.5. Komínková metoda

Je nejstarší metodou[32]. Do agaru se vtlačují stejně vysoko komínky ze skla nebo porcelánu.

[31]. Diluční metoda. *Http://old.lf3.cuni.cz* [online]. Česká Republika [cit. 2016-02-23]. Dostupné z: http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/mic/mic.htm

[32]. Vybrané metody a techniky v potravinářské mikrobiologii [online]. 2013, , 1 - 29 [cit. 2016-02-23]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1411/jaro2013/BVMI0221p/um/Mikr.pdf?lang=en

Komínky se ještě mohou přelít další vrstvou agaru. To proto abychom měli jistotu, že komínek a agar k sobě přilnuly. Do těchto komínků se pipetují jednotlivé roztoky testovaných látek. Na agar se nanese vrstva testované bakterie. V jiném případě můžeme komínky přelít agarem s obsahem bakterie. Po inkubaci se sledují inhibiční zóny.

2.5.6. Genotypová metoda

Slouží ke stanovení rezistence. Zároveň můžeme pomocí této metody zjistit, díky jakému mechanismu jsou bakterie na testované antibiotikum rezistentní. Metodu provádíme pomocí detekce genů. Jednotlivé detekce jsou prováděny pomocí DNA sond či polymerázových řetězcových reakcí[33]. V současné době se tato metoda rychle vyvíjí. Díky ní dokážeme objevit mutace a geny spojené s rezistencí. Výhodou je, že je tato metoda rychlá. Vyhodnotí i výsledky u pomalu a slabě rostoucích bakterií. Nevýhodou je obtížné zjištění citlivosti v případě malého množství mikrobů. Problémem také je, pokud se testuje populace s jedinci, kteří jsou citliví a kteří jsou rezistentní. Metoda potřebuje speciální laboratorní vybavení. Je velmi nákladná.

3. Praktická část

3.1. Bakteriální vzorky

Jak jsem již zmínila, v mé práci jsem se zaměřila na testování citlivosti bakterií rodu *Arcobacter* na antibiotika. Pracovala jsem celkem s 20 izolovanými kmeny. Ty byly odebrány z různých prostředí. Celkem 19 izolátů byly *A.butzleri.* 1 kmen byl *A.cryaerophilus.*
Jednotlivé vzorky jsem si označila 2015/1, 2015/2 atd.. Označení odpovídá uložení daných kmenů ve sbírce Univerzity Pardubice. Izolované bakterie odebrané od pacientů z nemocnice v Litomyšli jsem si označila 2015/Ab-M (*A.butzleri* odebraná od muže) a 2015/Ab-Ž (*A.butzleri* odebraná od ženy). Pouze vzorek pod označením 2015/16 byl *A.cryaerophilus.*

Seznam vzorků odebraných z různých prostředí :
2015/1 - *A.butzleri*, izolát z kuřecího křídla
2015/2 - *A.butzleri*, izolát z kuřecího srdce
2015/3 - *A.butzleri*, izolát z kuřecího křídla
2015/4 - *A.butzleri*, izolát z kachního žaludku
2015/5 - *A.butzleri*, izolát z odpadní vody v Chotči
2015/6 - *A.butzleri*, izolát z krůtího krku
2015/7 - *A.butzleri*, izolát z vepřového mletého masa
2015/8 - *A.butzleri*, izolát z ČOV v Havlíčkově Brodě
2015/9 - *A.butzleri*, izolát z vody toku Labe v Pardubicích
2015/10 - *A.butzleri*, izolát z kuřecího krku
2015/11 - *A.butzleri*, izolát z kuřecích jater
2015/12 - *A.butzleri*, izolát z kuřecích jater
2015/13 - *A.butzleri*, izolát z kachního krku
2015/14 - *A.butzleri*, izolát z krůtího mletého masa
2015/15 - *A.butzleri*, izolát z kuřecího prsního řízku
2015/16 - *A.cryaerophilus*, izolát z lososa
2015/17 - *A.butzleri*, izolát z kuřecího prsního řízku
2015/19 - *A.butzleri*, izolát z krůtího ořezu

[33]. *Biologicky aktivní látky* [online]. , 1 - 10 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: http://is.muni.cz/el/1431/jaro2012/Bi4091c/um/10_Stanoveni_citlivosti_a_koncentrace_antibiotik.pdf

2015/Ab - M - *A.butzleri,* izolát od pacienta z nemocnice v Litomyšli
2015/Ab - Ž - *A.butzleri,* izolát od pacientky z nemocnice v Litomyšli

Z tohoto seznamu je zjevné, že drůbež je významným zdrojem těchto bakterií.

3.2. Metodika

V mém výzkumu jsem používala metodu vyšetřování schválenou podle EUCAST (Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti). Tato organizace určuje standardizované postupy pro výzkumy. Spolupracuje s mikrobiologickými laboratořemi a farmaceutickými firmami. Svou působnost má v mnoha zemích Evropské Unie. Postupy schválené EUCAST se dodržují ve velké většině mikrobiologických laboratoří. Pro svůj výzkum jsem si vybrala diskovou difuzní metodu pro vyšetření citlivosti k antibiotikům. Tato metoda byla schválena v lednu 2015.

3.2.1. EUCAST disková difuzní metoda pro vyšetření citlivosti k antibotikům

Jak jsem již výše uvedla, disková difuzní metoda je jednou z nejstarších a nejpoužívanějších metod k vyšetření citlivosti bakterií na antibiotika. Není nijak zvláště náročná. Nepožaduje drahé vybavení. Je vhodná pro testování jakýchkoliv antibiotik a téměř všech patogenních bakterií.

Prvním krokem při výzkumu je vytvoření kultivačních půd. EUCAST schválená půda pro testování antibiotik je Müller-Hinton agar. Obecně řečeno agar je živné médium uloženo v Petriho miskách. V této látce jsou uloženy živiny potřebné pro bakterie k růstu a výživě. Každá bakterie potřebuje jiné živiny. Z tohoto důvodu se jednotlivé agary liší. Většinou obsahují různé výtažky z masa a půdy. Agarové médium i Petriho misky jsou sterilní. Pokud by došlo ke kontaminaci, výzkum není možné vyhodnotit. Agary se používají bez krve. Tato antimikrobiální média mají žluté zbarvení. Mohou se použít také s krví. Agary s krví obsahují 5% koňské nebo beraní krve. Pro testování antibiotik je doporučen agar s krví, protože je pro testované bakterie vhodnější. Na agaru bez krve bakterie rostou méně. Mikrobiologická laboratoř si může agar objednávat. Je zde i možnost vytvářet si agar podle stanovených standardů. Je to výhodnější, protože jedna Petriho miska s agarovým médiem stojí až 50 Kč. Pro testování je tedy doporučen Müller-Hinton agar. Svým složením neovlivňuje působnost testovaných antibiotik.

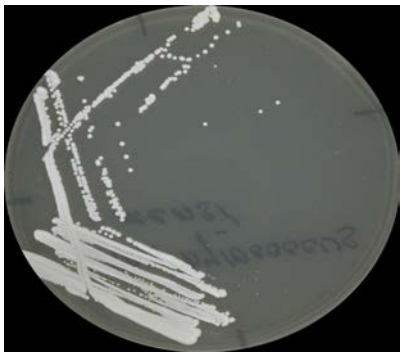
Vyrábí se tím způsobem, že do 1000 ml destilované vody přidáme 38 g připraveného prášku. Směs vložíme do přístroje autokláv, kde se po dobu 15 minut a při teplotě 121 °C sterilizuje. Po sterilizaci následuje tuhnutí při teplotě 40 °C. Nakonec se směs nalije do Petriho misek. Müller-Hinton agar obsahuje hovězí masovou infuzi, kyselý hydrolyzát kaseinu, škrob a agar způsobující ztuhnutí hmoty. Výsledný agar má pH 7,3 při teplotě 25 °C. Prášek, který jsem při výzkumu používala, byl dodáván firmou HIMEDIA. Kultivační půdy jsem si při výzkumu sama nevytvářela. Byly připravovány laborantkou. Výška kultivační půdy by měla být 4 mm. Agary by neměly být vlhké, ale ani přesušené. Na vlhkosti velmi záleží. Pokud je plotna příliš vlhká, mikrobiální suspenze se do agaru plně nevsaje. Agarová média se před použitím skladují při teplotě 8-10 °C.

Druhým krokem je příprava izolátů. Inokulum jsem si nejdříve musela izolovat. Z objednaných vzorků jsem si musela dané izoláty nechat kultivovat na Petriho miskách určených pro můj výzkum. Předtím, než jsem začala vždy pod dohledem pracovat v laboratoři, musela jsem projít řádným školením. V mikrobiologické laboratoři je nutné neustále dávat pozor na to, aby vše zůstalo absolutně sterilní. Nesmí dojít k žádné kontaminaci. Každý den se před zahájením práce laboratoř vysterilizovala UV zářením. Toto záření totiž usmrcuje bakterie v ovzduší atd.. Další preventivní opatření před kontaminací je práce při zažehnutém kahanu. Nástroje jako například inokulační klička, L hokejka a další se vždy po manipulaci na misce likvidují. Na další misku se použijí opět čistě sterilní potřeby. Po práci a během práce jsem si musela vydezinfikovat své pracovní místo.

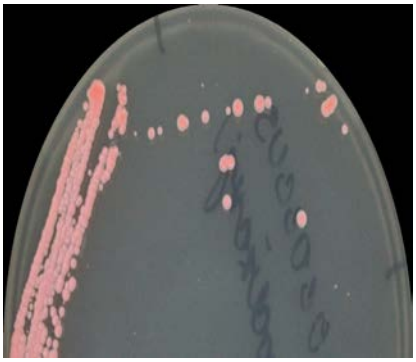
Izolace, po které jsem si nechala izoláty inkubovat se nazývá „izolace čárkováním.“ Tuto

metodu jsem se nejdříve musela naučit na bakteriích méně škodlivých zdraví. Jako první byl izolován *Micrococcus* a *Staphylococcus aureus.* Izolace sloužila k přenesení kultury z jedné Petriho misky na druhou. Z jednotlivých kolonií také získáme čisté bakterie, potřebné pro další práci. V praxi se například izolace používá v nemocnicích. Tam laboranti touto izolací získají čistou kulturu ze směsi mikrobů získaných z výtěru krku. Izolace je provedena čtyřmi kroky. Nástroj, který používáme je plastová inokulační klička. Je to tyčinka mající na konci malé očko. Kličkou vytvoříme velké množství pruhů. S pomocí této techniky postupně naředíme původní počty bakterií na menší počty bakteriálních buněk. Výsledkem je na agaru „čárkovaná kresba.“ První krok je, že jednou stranou kličky vytvoříme na agaru hustou síť čárek. Dále druhou stranou inokulační kličky protneme původní proužky a vytvoříme čtyři pruhy, které se ale neprotínají. Krok opakujeme ještě jednou. Musí být použita již nová sterilní klička. V posledním kroku se opět protnou pruhy vytvořené v předchozím kroku. Na konci se vytvoří vlnovka. Důležité je, aby se vlnovka nedostala do oblasti, kde izolace začínala. Izolace by se jinak stala neúčinnou. Důraz se musí klást na to, abychom na kličku příliš netlačili. Mohli bychom vytvořit do agaru díru. Během prvního dne jsem provedla dvě izolace bakterie *Micrococcus*, dvě izolace bakterie *Staphylococcus aureus* a čtyři izoláty *A.butzleri.*

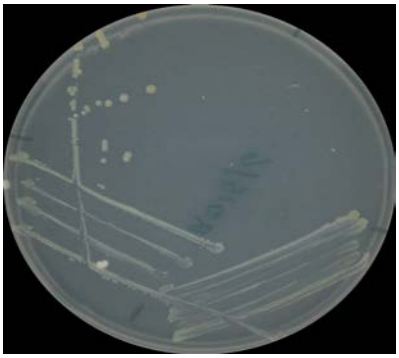
Následně se dají izoláty kultivovat. Běžně se kultivují okolo 18 hodin. Arkobaktery se však kultivují dva dny. Jsou pomalu rostoucí bakterie. Teplota v termostatu, kde se arkobaktery nechají kultivovat, je 30 °C. Všechny misky s izoláty se dávají inkubovat v tzv. zavěšené poloze. Misky se ukládají dnem nahoru. Agar totiž obsahuje významnou složku vody. Ta se v termostatu vypařuje a postupně kondenzuje na víčku. Pokud by se miska uložila víčkem nahoru, voda by skapávala na izolát. Následně by mohla znehodnotit celou izolaci.



Obr. č. 4 – Izolace bakterie *Staphylococcus*

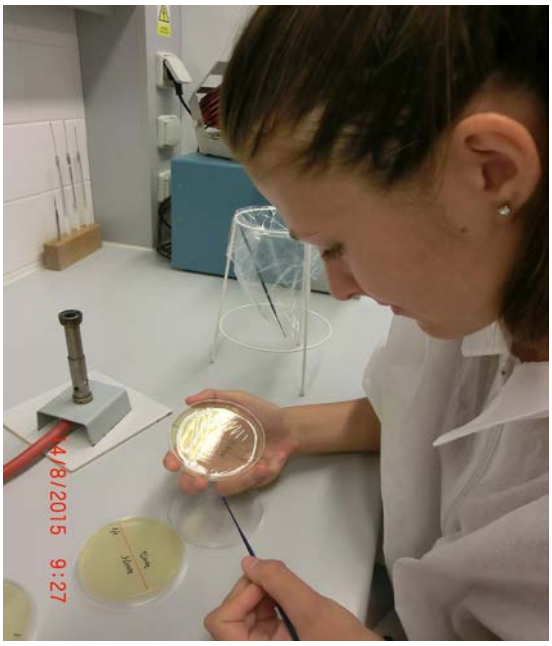


Obr. č. 5 – Izolace bakterie *Micrococcus*



Obr. č. 6 – Izolace arkobaktera

Po uplynutí kultivační doby nám na miskách narostly jednotlivé kolonie. Z jedné počáteční bakteriální buňky se během kultivace vytvořila jedna kolonie. Původně z nízkého počtu rozizolovaných bakterií se bakterie namnoží až na počty milionů na jedné Petriho misce. Cílem je tedy tzv. naředění vysoké density buněk a tím dosažení růstu v jednotlivých koloniích, kdy jedna kolonie představuje jednu původní buňku. Po kultivaci jsem si také všimla, že jednotlivé druhy bakterií se liší tvarem kolonií, zápachem či barvou. Arkobaktery měly mléčné až průhledné zabarvení. *Staphylolococcus* měl bílé a *Micrococcus* oranžové. Bakterie vyskytující se ve vzduchu mají výrazné zbarvení, protože se zbarvením brání před UV zářením. To totiž ničí jejich DNA.



Obr. č. 7 –Získání čisté kultury tzv. „izolací čárkováním“

Po úspěšné přípravě izolátů je na řadě příprava mikrobiální suspenze. Mikrobiální suspenze je směs bujónu nebo destilované vody a testovaných bakteriálních buněk. Bujón či destilovaná voda je látka nahrazující prostředí pro mikroorganismy. V pokusu jsem při prvním měření, kdy jsem připravovala suspenzi pro vzorky 2015/1 - 2015/4, použila destilovanou vodu. Nárůst na miskách byl ale velmi malý. Pro další suspenze jsem tedy zvolila Mülller-Hinton bujón. Tento bujón obsahuje především výtažky z masa. Složením je velmi podobný Müller-Hinton agaru. Neobsahuje pouze agarózu sloužící jako ztužovadlo.

Suspenze je tedy tvořena destilovanou vodou nebo bujónem. Z toho jsem si automatickou pipetou odpipetovala do každé zkumavky 2 ml. Druhou složkou jsou testované bakteriální buňky. Postup je takový, že se inkulační kličkou opatrně dotkneme bakteriální kolonie. Následně vrstvičku bakterií nanesenou na kličce roztíráme o stěnu zkumavky. Postupně ji zanášíme do bujónu. Bakterie nanášíme až do té doby, než suspenze dosáhne zákalu stupně 0,5. Podle McFarlandovy zákalové stupnice víme, že v 1 ml roztoku se nachází $1,5*10^8$ cfu (bakterií tvořících jednotky). U arkobakterů jsem však zvolila zakalení stupně 2, protože jsou nevýrazně zbarvené. Na základě toho vytváří malé zakalení. U stupně čísla 2 se v 1 ml se nachází $6*10^8$ cfu. Během výzkumu jsem použila i zákal čísla 3. Nárůst arkobakterů byl totiž velmi slabý a identifikace inhibičních zón byla obtížná. Pokud máme zákal čísla 3, v 1ml roztoku se nachází $9*10^8$ bakteriálních buněk. Změny ve třetím měření jsem provedla také u množství bakterií v suspenzi. Stupeň zákalu se pohyboval mezi 4-5. Celkem jsem prováděla čtyři měření. Všechny vzorky jsem původně rozdělila mezi tři výroby antibiogramů a následná měření. U druhého měření došlo při výrobě mikrobiální suspenze ke kontaminaci bujónu. Z tohoto důvodu jsem musela antibiogramy daných izolátů následně vytvořit ještě jednou ve čtvrté přípravě. Antibiogramy byly kontaminované a vyhodnocení nebylo možné. Nejúspěšnější poměr, který byl použit, byl poměr třetí. Suspenze měla nejmenší objem, ale zároveň největší obsah bakterií. V 1 ml se vyskytovalo přes $12*10^8$ cfu. Zákal ve zkumavkách se měří pomocí přístroje McFarland Densitometr. Ještě předtím, než se zákal změří, je nutné provést vortexování. Zkumavku vložíme do přístroje Vortex V-1plus. Tento přístroj roztok uvnitř zkumavky promíchá. Při vytvoření roztoku je důležité, abychom zkumavku po každém otevření ožehli v plamenu. Tak nedojde k případné kontaminaci. Čím více bakterií do roztoku naneseme, tím větší má roztok zakalení. Víme, že čím hustší je inokolum, tím menší inhibiční zóny se následně vytvářejí. Čím je inokolum řidší, tím jsou inhibiční zóny větší. Zkumavky se následně uzavřou. V experimentu jsem přidala ještě jeden krok. V něm jsem dala zkumavky na 30-60 minut do termostatu. Bakterie byly tak

povzbuzeny v množení. Podle EUCAST se na výrobu antibiogramů musí použít suspenze vytvořená daný den. Měla by se aplikovat minimálně 15 minut a maximálně 60 minut po vytvoření[34].

Po vytvoření suspenze následuje výroba antibiogramu, který byl výsledkem mé práce. Laboratoř na základě porovnání inhibičních zón na antibiogramu určuje, zda je testovaná bakterie rezistentní, citlivá nebo intermediátní. Antibiogram tvoří Petriho miska. V té je uloženo agarové médium. Na agaru je nanesena mikrobiální suspenze složená z destilované vody či bujónu a daného bakteriálního kmene. Na povrch agaru jsem poté vložila antimikrobiální disky tvořené buničinou s testovaným antibiotikem o určité koncentraci. Jak jsem se již zmínila, arkobaktery jsem testovala na krevním agaru. První měření jsem provedla pouze na krevním agaru. Pro jistotu jsem si ke každému vzorku vytvořila dva antibiogramy. U dalších tří měření jsem zvolila jinou metodu. U každého vzorku jsem vytvořila antibiogram na agaru s krví a antibiogram na agaru bez krve. Na tomto agarovém médiu byl ale nárůst málo viditelný. Výsledky mohla hodnotit pouze podle antibiogramů obsahující agar s krví. Poté, co byla suspenze připravená, jsem ji automatickou pipetou o objemu 1,5 ml aplikovala na agar.

Množství suspenze je velmi důležité, protože se všechna musí vstřebat do agaru[35]. Během experimentu jsem musela objem snížit na 1 ml. Veškerá suspenze se totiž nevstřebala do agaru. Antibiotické disky sjížděly po povrchu. Nevsáklá suspenze se musela odpipetovat. Ani toto množství se mi plně neosvědčilo. Při třetím měření jsem pracovala se suspenzí o objemu 0,9 ml. Je velmi důležité, aby byla přebytečná suspenze odstraněna. Pokud by tomu tak nebylo, mohlo by dojít k přebytku izolované bakterie na miskách. Přebytek suspenze se může odstranit již zmíněným odpipetováním. Používá se také tampón, který přebytek suspenze vsaje. Při této činnosti se musí klást důraz na opatrnost. Nesmí dojít ke kontaminaci. Následně se suspenze rozetřela sterilní L hokejkou, aby byla celá miska pokryta suspenzí.

Poté se Petriho misky daly na 10 - 15 minut na třepačku. Suspenze se tak vstřebá do agaru. Během výzkumu jsem měla čerstvě vyrobené agary. Byly vlhčí a vstřebání bývalo občas obtížné. Dalším krokem bylo nanesení antibiotických disků[36]. Disky jsou tvořeny filtračním papírem z buničiny. Jsou napuštěny konkrétními antibiotiky o jistých koncentracích. Koncentrace u antibiotik jsou velmi důležité. Pokud by se podala menší koncentrace, antibiotikum by nemuselo působit. Kdyby se zase podala větší koncentrace, antibiotikum by mohlo spíše škodit pacientovi. Mnou zkoumaná antibiotika byla ampicilin 10 µg, amoxycillin 30 µg, tetracyklin 30 µg, clindamycin 2µg, erythromycin 15 µg a ciproflxacin 5 µg. Tato antibiotika byla zakoupena od firmy OXOID. Disky se na Petriho misky nanášejí pomocí dispenzoru. Tento přístroj obsahuje šest zásobníčků naplněný testovanými antibiotiky. Na misky se aplikuje maximálně šest antibiotik. Kdyby bylo aplikováno větší množství, inhibiční zóny okolo jednotlivých disků by se mohly překrývat. Výsledek by nemohl být uznán.

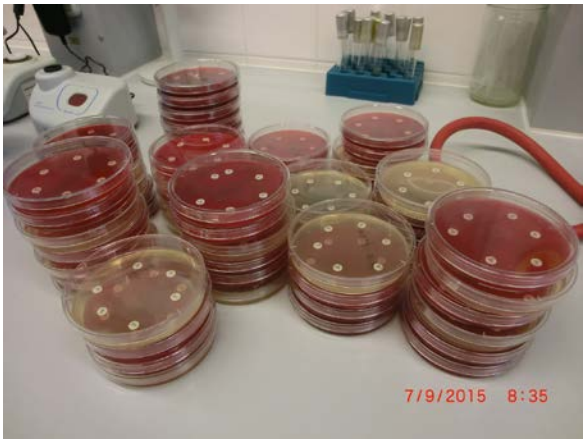
Nakonec se daly antibiogramy na 2 dny do termostatu při teplotě 30 °C.

---

[34]. *Postup při zavádění breakpointů EUCAST do vyšetřování citlivosti* [online]. In: . EUCAST, 2015, 1 - 4 [cit. 2016-01-08]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Zavedeni_diskove_metody_EUCAST.pdf

[35]. EUCAST disková difuzní metoda. *Vyšetření citlivosti k antibiotikům* [online]. 2013, , 1 - 20 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Diskova_metoda/EUCAST_Disk_Manual_v.3.0_2013.pdf

[36]. Testování antibiotik pomocí CLSI/EUCAST – co je nového? *Laboklin aktuell* [online]. 2015, , 1 - 4 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: http://www.laboklin.de/pdf/cz/aktuell/lab_akt_1502_cz.pdf



Obr. č. 8 – Atibiogramy připravené během výzkumu

Po inkubaci následovala identifikace inhibičních zón. Zóny vznikly okolo antibiotických disků. Ještě předtím, než se zóny změří, musí se antibiogramy prohlédnout. Kontroluje se správné rozestření inokula po celé misce. Musí se také zkontrolovat vytvoření souvislého nárůstu. Inhibiční zóny mají mít ostré kraje. Nesmí být přítomna kontaminace. Zóny jsem identifikovala díky nově zakoupenému přístroji BACMED 6iG2. Tento přístroj byl nově vyvinutý podle standardu EUCASTU. Inhibiční zóny se také mohou v laboratořích měřit i díky různým měřícím pomůckám, jako je milimetr pravítko či posuvné měřítko. BACMED 6iG2 byl propojen s počítačem. V počítači se mi vždy uložila fotografie misky vytvořené přístrojem BACMED 6iG2. Tento přístroj byl schopen nejen určit velikost inhibičních zón, ale také určit MIC na základě toho, do jaké míry bylo antibiotikum účinné. Prováděl rychlá a přesná měření inhibičních zón. Petriho misku jsme vložili do přístroje. Inhibiční zóny byly identifikovány díky LED diodám. Následně přístroj uložil fotografii misky. Poté byla provedena analýza do 50 milisekund.

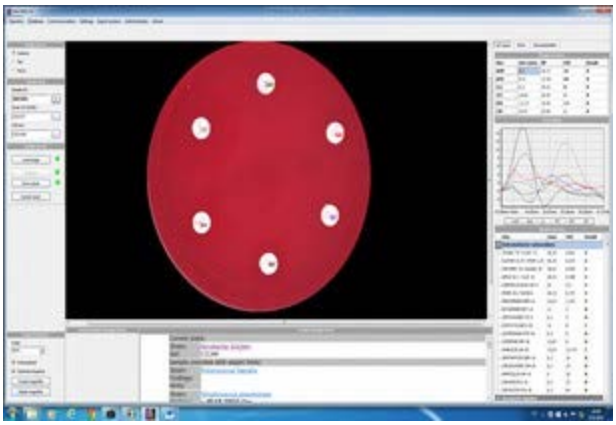
Přístroj porovnával jednotlivé inhibiční zóny s breakpointy. Breakpointy jsou intervaly inhibičních zón a určují se experimentálně. Jejich rozměry jsou měřeny v mm. Někdy se také označují jako mezní hodnoty nebo hraniční koncentrace. Tyto breakpointy určují dva systémy EUCAST a CLSI (Clinical and Laboratory Standarts Institute). Cílem EUCASTU je stanovit shodné breakpointy po celé Evropě a určovat breakpointy pro nově používaná antibiotika. Každý rok EUCAST vydává nové příručky se stanovenými breakpointy. Tyto příručky jsou volně dostupné na internetu.

Breakpointy pro testovaná antibiotika:

Testované antibiotikum	**S ≥**	**R <**
AMP 10 µg	16 mm	17 mm
AMC 30 µg	13 mm	18 mm
CLI 2 µg	25 mm	31 mm
TET 30 µg	29 mm	30 mm
ERY 15 µg	19 mm	20 mm
CIP 5 µg	25 mm	26 mm

S - citlivý, sensitivní
R - rezistentní, odolný

Přístroj tedy díky porovnávání inhibičních zón s breakpointy určil, zda byla testovaná bakterie:
Citlivá (sensitivní) - to znamená, že antibiotikum je pro daný mikroorganismus účinné. Je zde velká pravděpodobnost úspěšné léčby.
Odolná (rezistentní) - bakterie jsou schopny v přítomnosti antibiotika se množit a růst. Je zde velká pravděpodobnost neúčinné léčby.
Intermediátně rezistentní - bakterie není na dané antibitotikum ani odolná, ale ani citlivá. Léčba může být účinná i neúčinná.



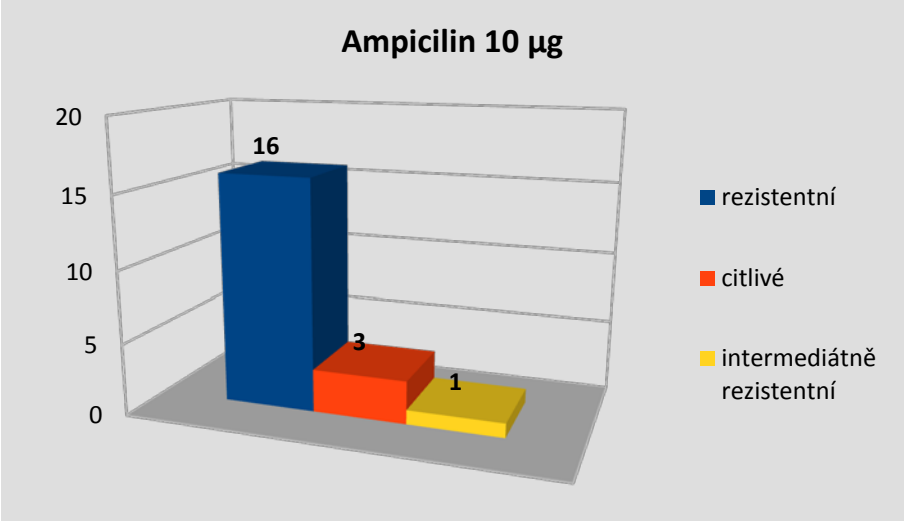
Obr. č. 9 – Vyhodnocování inhibičních zón přístrojem BACMED 6iG2

Obr. č. 10 – Přístroj BACMED 6iG2

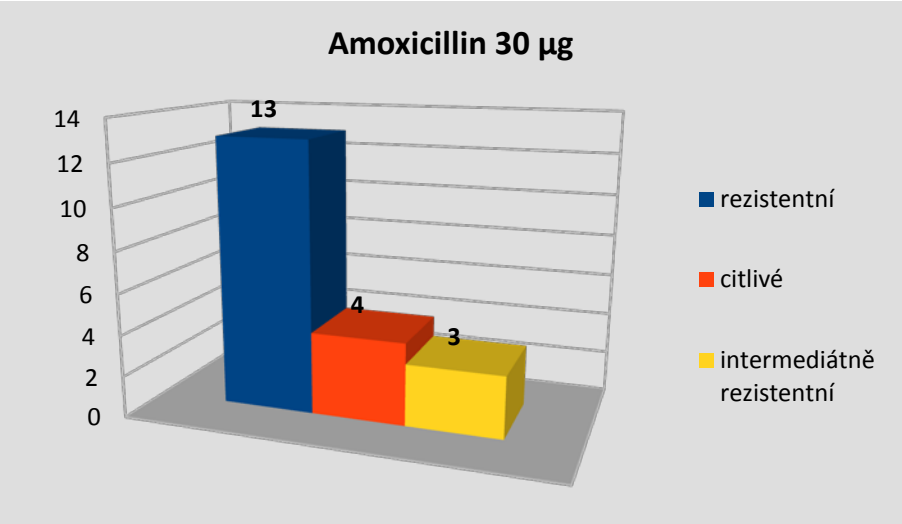
Ve výzkumu jsem při druhém měření použila také modifikovanou diskovou difuzní metodu. Mikrobiální suspenze se nanáší stěrovým tampónem. S jeho pomocí rozetřeme suspenzi po povrchu agaru. Metoda probíhala stejně jako metoda předešlá, kdy antibiotikum sedimentuje do agaru. Takto jsem připravila 8 izolátů. Po inkubaci se však ukázalo, že na všech antibiogramech došlo ke kontaminaci. Při přípravě je nutná rychlost a laborant musí dávat pozor na to, aby nedošlo ke kontaminaci. Vzorky nebylo možné vyhodnotit. Na základě této zkušenosti jsem již tuto metodu nepoužívala.

4. Výsledky

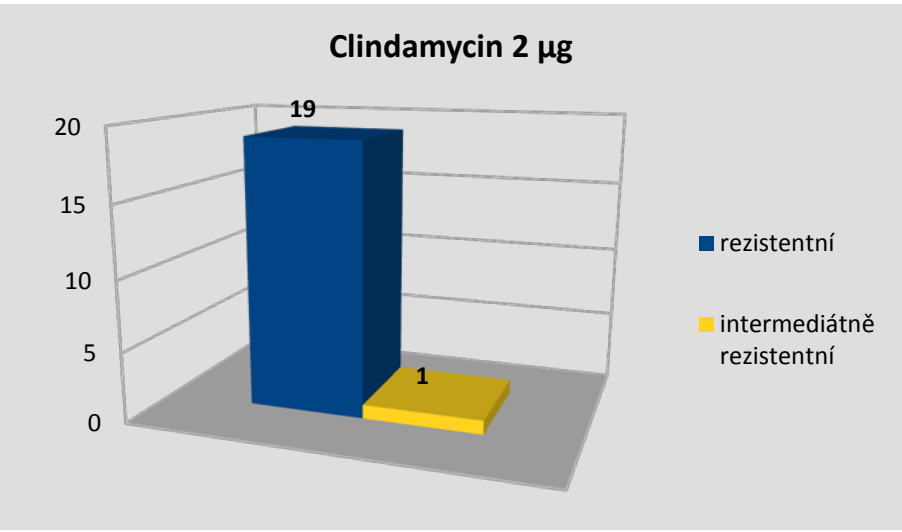
4.1. Výsledky pro jednotlivá antibiotika



Graf č. 1 - Graf pro ampicilin 10 µg znázorňuje, že 16 kmenů bylo rezistentních, 3 citlivé a 1 intermediátní. V mém výzkumu jsem toto antibiotikum vyhodnotila jako třetí nejlépe účinkující. Ampicilin 10 µg měl oproti jiným antibiotikům přijatelné výsledky, ale i jiná studie provedená v roce 2014 ukázala, že toto antibiotikum není zcela účinné pro léčbu infekce způsobené arkobaktery.

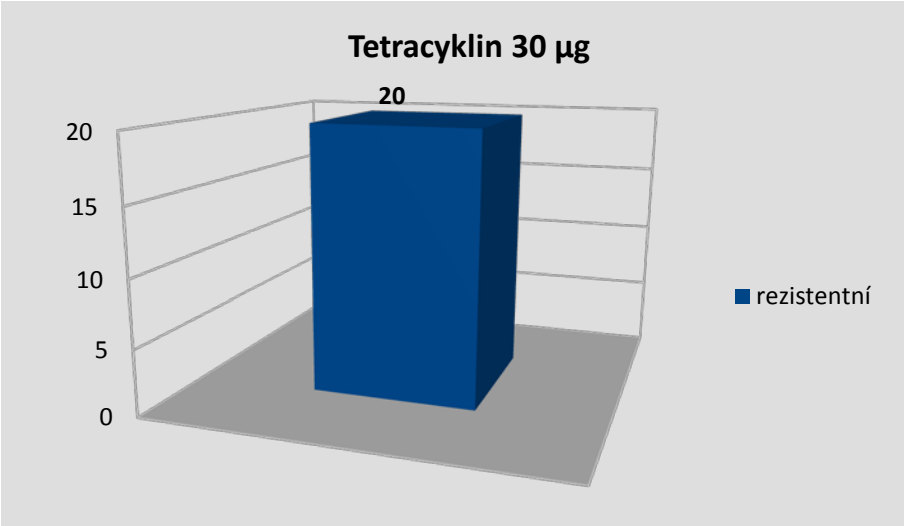


Graf č. 2 – Tento graf pro amoxicillin 30 µg nám znázorňuje, že 13 kmenů bylo rezistentních, tudíž byly odolné vůči této antimikrobiální látce. Dále byly 4 vzorky citlivé a 3 byly intermediátní. Amoxicillin 30 µg bylo druhé nejvíce účinné antibiotikum. Poměr odolných a citlivých bakterií není však stále tak dobrý, aby se toto antibiotikum na základě mého výzkumu mohlo aplikovat pacientovi.

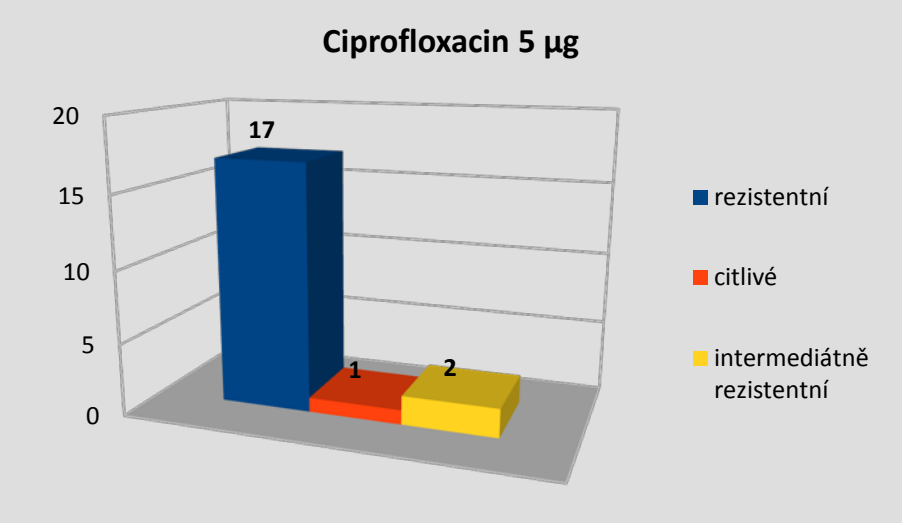


Graf č. 3 – Graf znázorňující účinnost clindamycinu 2 µg ukazuje, že celkem 19 kmenů bylo odolných a 1 byl intermediátně rezistentní. Tato látka je tedy považována jako druhá nejméně

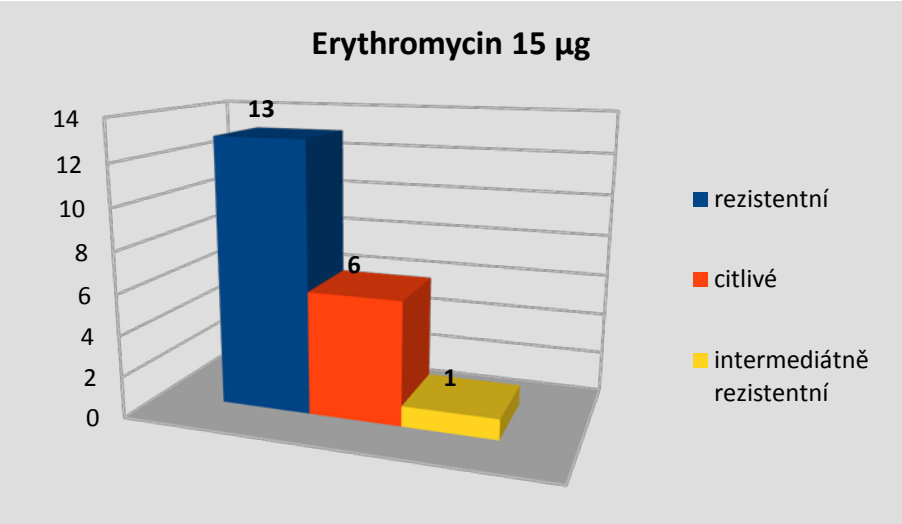
účinná v mém zkoumání. Na základě těchto výsledků mohu clindamycin 2 µg vyhodnotit jako antibiotikum zcela neúčinné pro léčbu infekčních onemocnění způsobených arkobaktery.



Graf č. 4 – Graf pro tetracyklin 30 µg jednoznačně ukazuje, že všech 20 kmenů bylo na toto antibiotikum odolných. V léčbě by bylo toto antibiotikum zcela defektní. Na základě těchto poznatků je tetracyklin 30 µg nejméně účinné antibiotikum. Jiné studie také ukázaly, že tato látka není zcela účinná. Tetracykliny byly v minulosti velmi hojně využívány. Velké množství bakterií se na ně stalo odolnými.



Graf č. 5 – Graf pro ciprofloxacin 5 µg ukazuje, že 17 kmenů bylo odolných, 1 citlivý a 2 intermediátně rezistentní. Výsledky ukázaly, že toto antibiotikum bylo čtvrté nejvíce účinné. Počet rezistentních kmenů je tak vysoký, že použití této látky by bylo na základě mého výzkumu nepřijatelné.



Graf č. 6 – Graf pro erythromycin 15 µg ukazuje, že toto antibiotikum je nejvíce účinné. Odolných bylo 13 kmenů, což není moc dobrý výsledek, ale 6 kmenů bylo citlivých. 1 kmen byl intermediátně rezistentní. Erythromycin 15 µg mohu vyhodnotit na základě mé práce jako nejvíce účinný. Pro lékařské použití by tato látka na základě mého výzkumu nebyla použitelná. I když byl vyhodnocen s nejlepším výsledkem, výzkum studující citlivost kmenů arkobakterů odebraných z mléčných výrobků vyhodnotil toto antibiotikum jako neúčinné.

V minulosti bylo provedeno velmi málo studií zabývajících se těmito bakteriemi. Ty však měly srovnatelné výsledky s mou prací. Studie provedená v Japonsku díky Kabeya et al. (2004) měla podobné výsledky ohledně tetracyklinu a ampicilinu. Nejnovější výzkum provedený v roce 2014, který testoval arkobaktery odebrané z mléčných výrobků měl zcela shodné výsledky jako předešlá studie. Studie Akıncıoğlu (2011) však vyhodnotila, že arkobaktery odebrané z vodního prostředí jsou citlivé na tetracyklin a také na ciprofloxacin.

4.2. Přehled všech izolovaných kmenů a jejich citlivost na testovaná antibiotika

Vysvětlivky:

R - rezistentní, odolný
S - citlivý, sensitivní
I - intermediátně rezistentní

tmavě šedé pole - označení izolovaných kmenů
světle šedé pole - označení izolovaného kmene *A.cryaerophilus*
vínové pole - označení testovaných antibiotik
modré pole - označení izolovaných bakterií, které byly plně rezistentní

4.2.1. Extrémně rezistentní izolované kmeny arkobakterů

2015/1 - izolát odebrán z kuřecího křídla
2015/3 - izolát odebrán z kuřecího křídla
2015/9 - izolát odebrán z vody toku Labe v Pardubicích
2015/10 - izolát odebrán z kuřecího krku
2015/11 - izolát odebrán z kuřecích jater
2015/15 - izolát odebrán z kuřecího prsního řízku
2015/17 - izolát odebrán z kuřecího prsního řízku

Všechny tyto izolované kmeny jsou *A.butzleri.* Výsledky mého experimentu potvrdily, že kontaminovaná voda a drůbež je významným zdrojem těchto bakterií. Právě zde se vyskytují bakterie rodu *Arcobacter* s velmi silnou rezistencí.

2015/16 – izolát odebrán z lososa
Tato izolovaná bakterie byla *A.cryaerophilus.*

5. Závěr

Na základě mého experimentu jsem zjistila, že žádné z mnou testovaných antibiotik by podle výzkumu nemohlo být použito pro léčbu pacienta nakaženého infekcí způsobenou arkobaktery. Testovaná antibiotika nejsou dostatečně účinná. Bakterie rodu *Arcobacter* jsou vysoce rezistentní na značné množství antibiotik. I mnou testovaná antibiotika jako je např. tetracyklin 30µg byla v minulosti velmi často předepisována. Velké množství mikroorganismů je na tyto antimikrobiální látky odolné. Experimentem jsem potvrdila, že v kontaminované vodě a drůbeži se vyskytují arkobaktery se silnou rezistencí.

6. Diskuse

Cílem mé práce bylo zjistit, jak jsou bakterie rodu *Arcobacter* citlivé na vybraná antibiotika běžně používaná při léčbě infekčních onemocnění způsobených arkobaktery. Testovaná antibotika se nazývají apmicilin 10 µg, amoxicillin 30 µg, clindamycin 2 µg, tetracyklin 30 µg, erythromycin 15 µg a ciprofloxacin 5 µg.

Metoda použitá v mém výzkumu se nazývá disková difuzní metoda. Použila jsem postup standardizovaný podle organizace EUCAST. Tento postup se běžně používá při vyšetření citlivosti bakterií v mikrobiologických laboratořích či v nemocničních laboratořích. Diskovou difuzní metodu a daný postup jsem si vybrala proto, abych si zkusila, jak mikrobiologové pracují. Metoda není náročná a nevyžaduje příliš drahé vybavení. Umožňuje i vyšetření citlivosti u slabě rostoucích bakterií jako jsou arkobaktery. Je založena na vytvoření antibiogramu, který tvoří agarové médium s 5% koňské krve a dále mikrobiální suspenze. Suspenze se skládá z bujónu a testovaného bakteriálního kmene.

Během výzkumu jsem místo destilované vody použité v prvním měření v ostatních případech použila bujón. Densitu bakteriálních buněk jsem také změnila. Původně jsem volila zákal čísla 2 podle McFarlandovy zákalové stupnice. Následně jsem stupeň změnila na číslo 3 a v dalším měření jsem volila stupeň 4 – 5. Suspenze se následně nanesla na agar. Poté se na agar aplikovaly antibiotické disky. Tyto disky byly napuštěny různými antibiotiky. Inkubace trvala 2 dny. Po uplynutí této doby se misky vložily do přístroje Bacmed 6iG2. Přístroj změřil vytvořené inhibiční zóny.

Následně se vyhodnotila citlivost izolátu k antibiotikům. Během výzkumu jsem také použila agary bez krve a modifikovanou diskovou difuzní metodu. U této metody se mikrobiální suspenze nanáší pomocí stěrového tampónu. Ani jedna z těchto dvou metod mi nevyhovovala, proto jsem ji již neopakovala. Vzorky nebylo možné vyhodnotit, protože na antibiogramu bez krve arkobaktery málo rostou a inhibiční zóny byly málo viditelné. Při druhé metodě jsem si kontaminovala všechny vzorky.

Použila jsem celkem 20 izolátů odebraných z různých prostředí. Zdrojem těchto bakterií mohou být drůbež, mléčné výrobky, divoká i domácí zvířata, kontaminovaná voda atd.. Potvrdila jsem, že drůbež a kontaminovaná voda jsou zdroji pro arkobaktery s velkou rezistencí.

Nejúčinnější antibiotikum bylo erythromycin 15 µg. Na tuto látku bylo 13 izolátů odolných, 6 citlivých a 1 intermediátně rezistentní. I přesto je toto antibiotikum na arkobaktery málo účinné. Zcela defektní antibiotikum byl tetracyklin 30 µg. Všech 20 izolátů bylo odolných. Bylo potvrzeno zjištění, že arkobaktery jsou silně rezistentní na různé druhy antibiotik. Léčba infekcí způsobená těmito bakteriemi je velmi náročná, protože zatím neexistuje žádné antibiotikum, které by tyto bakterie bez problémů zničilo. Tento experiment je pouze malým příspěvkem do výzkumu zabývajícím se problematikou těchto bakterií. Určitě bych však na tento výzkum mohla navázat. Bylo by možné testování citlivosti arkobakterů na jiná antibiotika. Dále bych mohla testovat jiný kmen arkobakterů, jako je například *A. skirrowii* nebo *A. cryaerophilus*. Můj výzkum mě hodně ovlivnil. Uvažuji o tom, že bych se v budoucnu tomuto oboru věnovala.

7. Seznam zkratek

cfu - bakterie tvořící jednotky
CLSI - Clinical and Laboratory Standarts Institute
EUCAST - Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti
AMP - ampicilin
AMC - amoxicillin
ERY - erythromycin
CLI - clindamycin
TET - tertacyklin
CIP- ciprofloxacin

8. Zdroje

8.1. Použitá literatura

1. LOCHMANN, Otto.*Základy antimikrobiální terapie*. Vyd. 2. Praha: Triton, 1999, 127 s. ISBN 80-725-4005-X

2. JELÍNEK, Jan a Vladimír ZICHÁČEK.*Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. 9. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2007, 575 s., [92] s. barev. obr. příl.:. ISBN 978-80-7182-213-4

3. LEVY, Stuart B. *Antibiotický paradox: jak se nesprávným používáním antibiotik ruší jejich léčebná moc*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2007, 312 s. Galileo. ISBN 978-80-200-1485-6

4. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 80-247-3170-3

5. *SCHINDLER, Jiří. Ze života bakterií*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2008, 143 s., [16] s. obr. příl. Průhledy (Academia). ISBN 978-80-200-1666-9

8.2. Internetové zdroje

1. YESILMEN, Simten, Aydin VURAL, Mehmet Emin ERKAN a Ibrahim Halil YILDIRIM. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Arcobacter species in cow milk, water buffalo milk and fresh village cheese

2. International Journal of Food Microbiology [online]. Elsevier, 2014, 1.10.2014, **1**(188), 11-14 [cit. 2016-01-09]. Dostupné z:http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160514003365

3. COLLADO, Luis a Maria José FIGUERAS. Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus Arcobacter. American Society for Microbiology [online]. 2011, Leden 2011, **24** (1), 174–192 [cit. 2016-01-09]. Dostupné z: http://cmr.asm.org/lens/cmr/24/1/174

4. PHILLIPS, C.A. Arcobacter spp in food: isolation, identification and control.Trends in Food Science & Technology [online]. Elsevier, 2001, Srpen 2001,**12,**(8), 263–275 [cit. 2016-01-09]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224401000905

5. ON, S.L.W, A. STACEY a J. SMYTH. Isolation of Arcobacter butzleri from a neonate with bacteraemia. Journal of Infection [online]. Elsevier, 1995, 7.3.1995, **31** (3), 225-227 [cit. 2016-01-09]. Dostupné z: http://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(95)80031-X/pdf

6. Alimentární onemocnění. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001, 1. 7. 2014. Dostupné také z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Alimentární_onemocnění

7. Antibiotikum. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001, 6. 12. 2015. Dostupné také z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Antibiotikum

8. Probiotikum. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001, 11. 11. 2015. Dostupné také z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Probiotikum

9. Plazmid. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001, 12. 9. 2015. Dostupné také z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Plazmid

10. Antibiotická rezistence. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001, 29. 12. 2015. Dostupné také z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Antibiotická_rezistence

11. Amoxicillin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001, 5. 12. 2014 [cit. 2016-01-07]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Amoxicilin

12. *Postup při zavádění breakpointů EUCAST do vyšetřování citlivosti* [online]. In: . EUCAST, 2015, 1 - 4 [cit. 2016-01-08]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Zavedeni_diskove_metody_EUCAST.pdf

13. HAVLÍK, Jiří. Onemocnění vyvolaná kampylobaktery. In: *Postgraduální medicína* [online]. Česká Republika: Mladá fronta a.s., 2002, 2002 [cit. 2016-01-08]. Dostupné z: http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/onemocneni-vyvolana-kampylobaktery-148673

14. Bakterie v půdě a moři. In: *Osel.cz* [online]. Česká Republika: osel.cz, 2002, 2002 [cit. 2016-01-08]. Dostupné z: http://www.osel.cz/42-bakterie-v-pude-a-v-mori.html

15. Diplokoky. Velký lékařský slovník [online]. Česká Republika: Maxdorf, 2008, 2008 [cit. 2016-01-08]. Dostupné z: http://lekarske.slovniky.cz/pojem/diplokoky

16. Bakteriální infekce. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001, 2014. Dostupné také z:https://cs.wikipedia.org/wiki/Bakteriální_infekce

17. Bakterie patogenní. In: *Leporelo.info* [online]. [cit. 2016-01-08]. Dostupné z: https://leporelo.info/bakterie-patogenni

18. Gramnegativní. Velký lékařský slovník [online]. Česká Republika: Maxdorf, 2008, 2008 [cit. 2016-01-09]. Dostupné z: http://lekarske.slovniky.cz/pojem/gramnegativni

19. Původci alimentárních onemocnění. In: *Eagri.cz* [online]. Česká Republika, 2012, 2012 [cit. 2016-01-09]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/mze/potraviny/bezpecnost-potravin/puvodci-alimentarnich-onemocneni.html

20. Objev penicilinu. In: *Www.ceskebakterie.estranky.cz* [online]. Česká Republika, 2014, 2014 [cit. 2016-01-09]. Dostupné z: http://www.ceskebakterie.estranky.cz/clanky/penicilin.html

21. Významné bakteriální nemoci u člověka. In: *Http://www.bakterie.eu* [online]. Česká Republika, 2010, 2013 [cit. 2016-01-09]. Dostupné z: http://www.bakterie.eu/bakterie-a-lide/bakterialni-nemoci

22. Jaké jsou nejúčinnější přírodní antibiotika? Příroda nás připravila na vše. *Http://svobodnenoviny.eu* [online]. Česká Republika: Natural Society, 2015 [cit. 2016-02-22].

Dostupné z: http://svobodnenoviny.eu/jake-jsou-nejucinnejsi-prirodni-antibiotika-priroda-nas-pripravila-na-vse/

23. Antibiotika: Víte, kdy a jak nám opravdu pomáhají? *Http://www.alphega-lekarna.cz* [online]. Česká Republika: ALLIANCE HEALTHCARE FRANCE SA [cit. 2016-02-22]. Dostupné z: http://www.alphega-lekarna.cz/web/consumer-facing/antibiotika1

24. ČERNOHORSKÁ, Kateřina. Za sníženou funkcí antibiotik stojí enzymy. In: *Http://www.zurnal.upol.cz* online]. Česká Republika: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014 [cit. 2016-02-22]. Dostupné z: http://www.zurnal.upol.cz/zprava/clanek/za-snizenou-funkci-antibiotik-stoji-enzymy/

25. Stanovení citlivosti na ATB kvantitativní metodou – E-test. *Http://ulbld.lf1.cuni.cz* [online]. Česká Republika: GAlén, 2015 [cit. 2016-02-23]. Dostupné z: http://ulbld.lf1.cuni.cz/seznam-lab-vysetreni?vysetreni=1320

26. Diluční metoda. *Http://old.lf3.cuni.cz* [online]. Česká Republika [cit. 2016-02-23]. Dostupné z: http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/mic/mic.htm

27. Vybrané metody a techniky v potravinářské mikrobiologii [online]. 2013, , 1 - 29 [cit. 2016-02-23]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1411/jaro2013/BVMI0221p/um/Mikr.pdf?lang=en

28. Užívání antibiotik a probiotické bakterie.*Http://www.alphega-lekarna.cz* [online]. Česká Republika: Alliance Healthcare Group France [cit. 2016-02-22]. Dostupné z: http://www.alphega-lekarna.cz/uzivani-antibiotik-a-probioticke-bakterie

29. Amoxicillin. In: *Http://lekarske.slovniky.cz* [online]. České Republika: Maxdorf [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: http://lekarske.slovniky.cz/pojem/amoxicilin

30. Amoxicilin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Amoxicilin

31. EUCAST disková difuzní metoda. *Vyšetření citlivosti k antibiotikům* [online]. 2013, , 1 - 20 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Diskova_metoda/EUCAST_Disk_Manual_v.3.0_2013.pdf

32. Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky. *Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky*[online]. Česká Republika, 2015 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: http://ulbld.lf1.cuni.cz/seznam-lab-vysetreni?vysetreni=1320

33. Testování antibiotik pomocí CLSI/EUCAST – co je nového? *Laboklin aktuell* [online]. 2015, , 1 - 4 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: http://www.laboklin.de/pdf/cz/aktuell/lab_akt_1502_cz.pdf

34. Diluční metoda.*Http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/mic/mic.htm* [online]. [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/mic/mic.htm

35. *Biologicky aktivní látky* [online]. , 1 - 10 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: http://is.muni.cz/el/1431/jaro2012/Bi4091c/um/10_Stanoveni_citlivosti_a_koncentrace_antibiotik.pdf

36. *Vybrané metody a techniky v potravinářské mikrobiologii* [online]. , 1 - 29 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1411/jaro2013/BVMI0221p/um/Mikr.pdf?lang=en

37. *Mikrobiologické laboratorní metody* [online]. Brno, 2014, , 1 - 84 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: http://www.vfu.cz/inovace-bc-a-navmgr/realizovane-klicove-aktivity/skripta/ls-2013-2014/mikrobiologicke-laboratorni-metody.pdf

38. *Ciprofloxacin* [online]. In: . Česká Republika, 2012 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: http://pribalove-letaky.cz/ciprofloxacin-teva-tablety

39. Probiotika a lidská imunita. *Http://www.detoxikace-organismu.info*[online]. Česká Republika: NaturalSwiss [cit. 2016-03-06]. Dostupné z: http://www.detoxikace-organismu.info/probiotika-a-lidska-imunita/#cikk_0

40. Jaké jsou nejúčinnější přírodní antibiotika? Příroda nás připravila na vše. In: *Http://svobodnenoviny.eu*[online]. Česká Republika: svobodnenoviny.eu, 2015 [cit. 2016-03-06]. Dostupné z: http://svobodnenoviny.eu/jake-jsou-nejucinnejsi-prirodni-antibiotika-priroda-nas-pripravila-na-vse/

41. Antibiotika? Jen v krajním případě! *Http://www.abecedazdravi.cz*[online]. Česká Republika: Abeceda Zdraví s.r.o., 2015 [cit. 2016-03-06]. Dostupné z: http://www.abecedazdravi.cz/doplnky-stravy/antibiotika-jen-v-krajnim-pripade-1

42. Antibiotika - léčí i škodí - a jak z toho ven. *Http://www.zelene-zdravicko.cz* [online]. Česká Republika: Clear shot s.r.o. [cit. 2016-03-06]. Dostupné z: http://www.zelene-zdravicko.cz/antibiotika.php

43. Žurnál online: Za sníženou funkcí antibiotik stojí enzymy [online]. Univerzita Palackého v Olomouc, 2014 [cit. 2016-03-06]. ISSN 1805-6865. Dostupné z: http://www.zurnal.upol.cz/zprava/clanek/za-snizenou-funkci-antibiotik-stoji-enzymy/

44. Co jsou antibiotika? *Http://www.testcrp.cz* [online]. Česká Republika: 4 Orion Diagnostica [cit. 2016-03-06]. Dostupné z: http://www.testcrp.cz/antibiotika/co-jsou-antibiotika/

45. LOYDOVÁ, Vladimíra. Vliv antibiotik na lidské tělo. [prezentace]. Chrudim : Nemocnice, [cit.2016-03-06]

46. NĚMCOVÁ,Sabina. Problematika bakteriální rezistence, nežádoucí účinky antibiotik.[online prezentace]. [cit.2016-03-06]. Dostupné z: http://slideplayer.cz/slide/3252161/

47. MILOTA, Tomáš. Bakterie. [online textový dokument].[cit.2016-03-13] Dostupné z: www.gymkh.cz/student/Biologie/nemecek/Bakterie/Bakterie.doc

8.3 Obrázky

1. AUTOR NEUVEDEN.http://www.analisisclinicarotger.es[online]. [cit. 22.2.2016]. Dostupný na WWW: https://www.google.cz/search?q=e+test+mikrobiologie&client=opera&hs=M5&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjk-9i47_vJAhVDXBQKHZ-JDfwQ_AUIBygB&biw=1440&bih=790#imgrc=rtp-SQm3FrfOkM%3A.

2. AUTOR NEUVEDEN. http://www.trios.cz[online]. [cit. 23.2.2016]. Dostupný na WWW: https://www.google.cz/search?q=e+test+mikrobiologie&client=opera&hs=M5&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjk-9i47_vJAhVDXBQKHZ-JDfwQ_AUIBygB&biw=1440&bih=790#tbm=isch&q=dilu%C4%8Dn%C3%AD+testy&imgrc=2Y29h5riIz7c1M%3A.