

Vědecký výbor výživy zvířat

**Bakteriální rezistence k antibiotikům.
Studium prevalence kolistin-
rezistentních E. coli v kuřecím mase
z české maloobchodní sítě.**

prof. MVDr. Eva Skřivanová, Ph.D.
Ing. Klára Laloučková

Praha, duben 2020



ISBN 978-80-7403-232-5

Obsah

1. Úvod	2
2. Teoretická část studie	3
2.1. <i>Escherichia coli</i> a její význam z hlediska zdraví člověka a drůbeže	3
2.2. Antibiotikum kolistin: charakteristika, mechanismus působení	4
2.3. Rezistence ke kolistinu	5
2.4. Monitoring rezistence ke kolistinu	6
2.4.1. Situace ve světě	7
2.4.2. Situace v České republice	8
2.5. Rezistence ke kolistinu u člověka	9
2.6. Rezistence ke kolistinu ve veterinární sféře	10
3. Experimentální část studie	12
3.1. Materiál a metodika	12
3.1.1. Sběr vzorků	12
3.1.2. Izolace <i>E. coli</i>	12
3.1.3. Testování kolistinové rezistence diagnostickým testem	16
3.1.4. Testování kolistinové rezistence bujónovou mikrodiluční metodou	17
3.2. Výsledky	19
3.3. Diskuze	22
4. Závěr	23
5. Reference	24

1. Úvod

Kolistin je polymyxinové antibiotikum poslední volby pro léčbu humánních infekcí klinicky rezistentních gram-negativních bakterií, jako jsou *Enterobacteriaceae* rezistentní na karbapenemy (Tzouvelekis a kol., 2012). Kolistin se používá k terapeutickým účelům také u zvířat určených k produkci potravin (Pardon a kol., 2012). Až donedávna byla rezistence na kolistin omezena na chromozomální mutace (Landman a kol., 2008). Situace se v roce 2015 změnila objevem plazmidy zprostředkovaného mechanismu rezistence vůči kolistinu, tzv. *mcr-1* genu popsáno u bakterií izolovaných u zvířat, ze syrového masa a hospitalizovaných pacientů v Číně (Liu a kol., 2016). Od té doby je výskyt genu *mcr-1* hlášen po celém světě u lidí, zvířat a ze vzorků životního prostředí (Schwarz a Johnson, 2016). Do roku 2019 bylo postupně popsáno dalších 9 *mcr* genů kódujících kolistinovou rezistenci u enterobakterií jako je *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Acinetobacter baumannii* (Carroll a kol., 2019).

O prevalenci *mcr* genů v potravinách dostupných v České republice existuje pouze omezené množství informací. Proto jsme se v této studii zaměřili na hodnocení míry výskytu *mcr-1* genů u vzorků kuřecího masa z maloobchodní sítě, které majoritně odpovídají za kolistinovou rezistenci.

2. Teoretická část studie

2.1. *Escherichia coli* a její význam z hlediska zdraví člověka a drůbeže

Escherichia coli patří podle Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Scheutz a Strockbine, 2005) do čeledi *Enterobacteriaceae*, řád *Enterobacteriales*. Jedná se o gramnegativní tyčinku 1,1-1,5 x 2,0-6,0 μM , vyskytuje se samostatně, nebo v párech (viz Obrázek 1). Patří mezi oxidáza negativní, chemoorganotrofní bakterie. Má respiratorní i fermentativní metabolismus. Fermentuje většinu sacharidů s tvorbou organických kyselin a plynu. Nefermentuje i-inositol a D-adonitol. Většina kmenů *E. coli* fermentuje laktózu.

Obrázek 1: Elektronová mikrografie *E. coli* O157:H7 (převzato z Scheutz a Strockbine, 2005)



E. coli patří mezi zástupce přirozené mikrobioty trávicího traktu teplokrevných živočichů. Je známo, že kromě nepatogenních kmenů existují i patogenní sérotypy, které mohou u hostitele vyvolat celou řadu onemocnění, v případě drůbeže zejména tzv. „kolibacilózu“. Patogenní sérotypy literatura dělí do minimálně šesti skupin: enteropatogenní *E. coli* (EPEC), v současné době patřící do skupiny „attaching-effacing *E. coli* (A/EEC), enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), difúzně adherentní *E. coli* (DAEC) a shigatoxigenní *E. coli* (STEC), často označované jako verotoxigenní *E. coli* (VTEC). Jako aviární kolibacilózu označujeme onemocnění způsobené sérotypy skupiny APEC, zejména sérotypy O1, O2 a O78 (Dziva a Stevens, 2008). Nejčastější patologicko-anatomický obraz onemocnění zahrnuje

perihepatitis, aerosakulitis, perikarditis. Může se objevit i peritonitis, salpingitis, osteomyelitis/artritis apod. (Barnes a Gross, 1997).

Souvislost výskytu *E. coli* u drůbeže s onemocněním byla zveřejněna v roce 1961 (Sojka a Carnaghan, 1961). Dnes je již notoricky známo, že infekce jsou způsobovány skupinou escherichií označovanou jako APEC. Manifestace onemocnění do značné míry závisí na virulenci daného kmene, zdravotním stavu hostitele a na vnějších podmínkách (např. systém chovu, složení krmné dávky apod.). Onemocnění zpravidla začíná septikémií, po níž následuje náhlý úhyn, nebo celá řada patologií, vyjmenovaných výše v textu (Barnes a Gross, 1997). V předkládané studii je sledována rezistence ke kolistinu u *E. coli* vyizolované z drůbežního masa, konkrétně z masa kura domácího; proto v textu není věnována pozornost dalším druhům drůbeže. Nicméně je třeba upozornit na fakt, že např. u krůt se onemocnění často sdružuje s virovou infekcí a jeho manifestace je pak značně odlišná (Stehling a kol., 2003). Nejčastějšími vstupními branami infekce jsou pochopitelně trávicí a respirační aparát. Bylo zjištěno, že 10 – 15 % všech koliformních bakterií, vstupujících do trávicího traktu drůbeže, je ze skupiny APEC. V trávicím traktu se koliformní bakterie obecně usídlují poměrně ochotně, vlivem oslabení/stresu pak mohou kolonizovat také extraintestinální tkáň. Je zřejmé, že přítomnost APEC v trávicím traktu a ptažmo v trusu představuje hygienické riziko např. v prostředí jatečního zařízení. V trusu se koliformních mikroorganismů vyskytuje značná koncentrace a samotné APEC mohou perzistovat v prostředí v množství až 10^6 KTJ/g (Dziva a Stevensen, 2008).

2.2. Antibiotikum kolistin: charakteristika, mechanismus působení

Kolistin (Polymyxin E) je bazické polypeptidové antibiotikum s baktericidními účinky, působící na gramnegativní bakterie. Původně se jedná o produkt mikroorganismu *Bacillus polymyxa* subsp. *colistinus*. Kolistin patří mezi polypeptidová antibiotika, jež jsou aktivní vůči bakteriím řádu *Enterobacteriales* a dále bakteriím rodů *Pseudomonas* a *Acinetobacter* (Pomorská a kol., 2018). Cílovou strukturou kolistinu je lipopolysacharid (LPS) vnější membrány gramnegativních bakterií. Zde se díky svému kladnému náboji může navázat, způsobit destabilizaci a zvýšení permeability membrány, uvolnění buněčného obsahu z bakteriální buňky a následně i její zánik (Lim a kol., 2010).

Kolistin lze podávat lokálně i systémově při sepsích, pneumoniích, nebo závažných infekcích močových cest a v současné době je jeho hlavním přínosem použití při léčbě infekcí vyvolaných multirezistentními původci, u nichž předchozí antibiotická léčba selhala (Beneš a kol., 2009).

Jedná se tedy o tzv. „antibiotikum poslední volby“. Kolistin je antibiotikem nejen humánní, ale i veterinární medicíny. To podpořilo šíření rezistence k tomuto antibiotiku, zejména u cílových bakterií, tj. bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (Kempf a kol., 2016). Nevýhodou kolistinu je jeho poměrně vysoká toxicita, zejména nefrotoxicita, ale i ototoxicita a neurotoxicita (Trifi a kol., 2016; Dai a kol., 2013).

Citlivost mikroorganismů ke kolistinu se tradičně stanovovala diskovou difúzní metodou, jejíž využití však bylo zpochybněno. Kolistin se, vzhledem ke své chemické struktuře a polykationické povaze, poměrně snadno adhezuje na povrchy laboratorního materiálu, což značně komplikuje jeho *in vitro* analýzy spojené se stanovením inhibičních koncentrací (MIC) (Shibata a kol., 2003). Další nevýhodou výše zmíněné metody je fakt, že přítomnost surfaktantu polysorbát 80 (P-80), který se v dané metodě používá, s výsledky do jisté míry interferuje (Miriagou a kol., 2010). Z těchto důvodů se MIC v současné době doporučuje stanovovat tzv. bujónovou mikrodiluční metodu (CLSI, 2013), jejíž použití tato negativa eliminuje a o níž bude pojednáno dále v textu této studie. Jedná se o značně rozšířenou, standardizovanou metodu, využívanou pro stanovení MIC všech antibiotik.

2.3. Rezistence ke kolistinu

Po období chromozomálně kódované rezistence, která má epidemiologicky omezený potenciál, se v posledních letech, zřejmě vlivem masivního používání kolistinu, začala objevovat rezistence plazmidová. Tento druh rezistence se velmi rychle šíří, jak horizontálně, tak vertikálně, což je v současné době velkým problémem zejména v nemocnicích. Determinanty kolistinové rezistence jsou geny *mcr*, umístěné na plazmidech. Kódují fosfoetanolamin transferázu, která je zodpovědná za přidání fosfoetanolaminu na lipid A vnější membrány gramnegativních bakterií. Dochází tak ke snížení záporného náboje, což znemožňuje navázání pozitivně nabitého kolistinu. Šíření těchto genů představuje závažné epidemiologické riziko, zejména pro pacienty nemocničních zařízení. Bylo dokázáno, že produkce genu *mcr-1* zvyšuje MIC kolistinu 4 – 8krát (Poirel a kol., 2017).

Od roku 2016, kdy byl tento nový mechanismus rezistence poprvé popsán, bylo zjištěno již několik variant těchto genů. Podle dostupných studií je zatím nejvíce rozšířený gen *mcr-1*, který je prokazován u klinických izolátů po celém světě. Tento byl mj. z tohoto důvodu použit i v naší studii.

První záznam o rezistenci ke kolistinu kódované *mcr-1* genem pochází z Číny; jednalo se o rezistenci u bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (Liu a kol., 2016). Do dnešního dne byla

zveřejněna celá řada případů rezistence, zejména u *E. coli* (Skov a kol., 2016; Al-Tawfiq a kol., 2017). Další gen nesoucí rezistenci ke kolistinu je *mcr-2*, jeho přítomnost byla popsána u hospodářských zvířat (prasata a hovězí dobytek) v Belgii (Xavier a kol., 2016). Jeho výskyt v dalších zemích byl zatím sporadický (Zhang a kol., 2018). V roce 2017 byl popsán výskyt genu *mcr-3* u *E. coli* izolované z prasat v Číně (Yin a kol., 2017) a *mcr-4* gen ze salmonel a *E. coli* u prasat z Belgie, Itálie a Španělska (Carattoli a kol., 2017). U drůbeže byl v témže roce detekován gen *mcr-5* v Německu (Borowiak a kol., 2017). Rok poté byla zveřejněna detekce genu *mcr-6* v *Moraxella pluranimalium*, izolované z prasat ve Velké Británii (AbuOun a kol., 2018). Původně se mělo za to, že se jedná o *mcr-2.2* variantu. Dále byl detekován gen *mcr-7* (*Klebsiella pneumoniae*, drůbež) a *mcr-8* (*K. pneumoniae*, drůbež, prasata, člověk) (Wang a kol., 2018; Yang a kol., 2018). V roce 2019 byl popsán gen *mcr-9* (Carroll a kol., 2019) a jako poslední i *mcr-10* (GenBank, accession number MN179494.1).

Může se zdát, že *mcr* rezistence je velmi recentním fenoménem. Nicméně retrospektivní studie ukázaly, že tento typ rezistence se vyskytoval již v 80. letech minulého století (Shen a kol., 2016). V současné době je situace alarmující zejména proto, že se rezistentní bakteriální kmeny často vyskytují i u pacientů s infekcemi způsobenými multirezistentními kmeny bakterií, tedy u pacientů s velmi omezenou možností antibiotické léčby.

2.4. Monitoring rezistence ke kolistinu

Kolistinovou bakteriální rezistenci, sloužící k mapování rozšíření *mcr* genů, monitoruje v rámci tzv. celoevropského průzkumu na karbapenemy a/nebo kolistin rezistentní enterobakterie (Europe-wide survey of carbapenem- and/or colistin-resistant *Enterobacteriaceae*; průzkum CCRE) EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) spolu s EURGen-Net (European Antimicrobial Resistance Genes Surveillance Network), představující mezinárodní síť národních systémů surveillance antibiotické rezistence u nejčastěji se vyskytujících invazivních bakterií na území Evropy, kterou koordinuje Evropské centrum pro prevenci a kontrolu infekčních onemocnění (European Centre for Disease Prevention and Control; ECDC) (ECDC, 2016).

Probíhající průzkum CCRE doplňuje údaje o fenotypové antimikrobiální rezistenci dostupné z EARS-Net o genomické informace. Tyto poznatky dohromady poslouží k identifikaci vysoce rizikových bakteriálních klonů, a pro získání podrobnějšího porozumění přenosovým cestám. Výsledky průzkumu CCRE budou použity na vnitrostátní a evropské úrovni pro hodnocení

rizik, rozhodování a pro lepší zacílení kontrolních opatření. Očekává se, že v průzkumu CCRE bude shromážděno a analyzováno až 6000 izolátů (ECDC, 2020).

Na území Spojených států amerických je rezistence vůči polymyxinům monitorována sítí laboratoří pro antimikrobiální rezistenci hlásící jednotlivé případy Národnímu systému pro sledování antimikrobiální rezistence enterobakterií (National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria; NARMS) (CDC, 2020).

2.4.1. Situace ve světě

Až donedávna byla polymyxinová antibiotika zahrnující kolistin používána pouze omezeně vzhledem k jejich toxicitě, která omezuje jejich dávkování. Nedostatek terapeutických alternativ pro infekce způsobené vysoce rezistentními gramnegativními bakteriemi však vedl ke zvýšenému používání těchto antibiotik (Li a kol., 2019). První hlášená kolistin-rezistentní *K. pneumoniae* byla izolována v Aténách v roce 2004 a kolistin-rezistentní enterobakterie se od té doby rozšířily do celého světa (Antoniadou a kol., 2007).

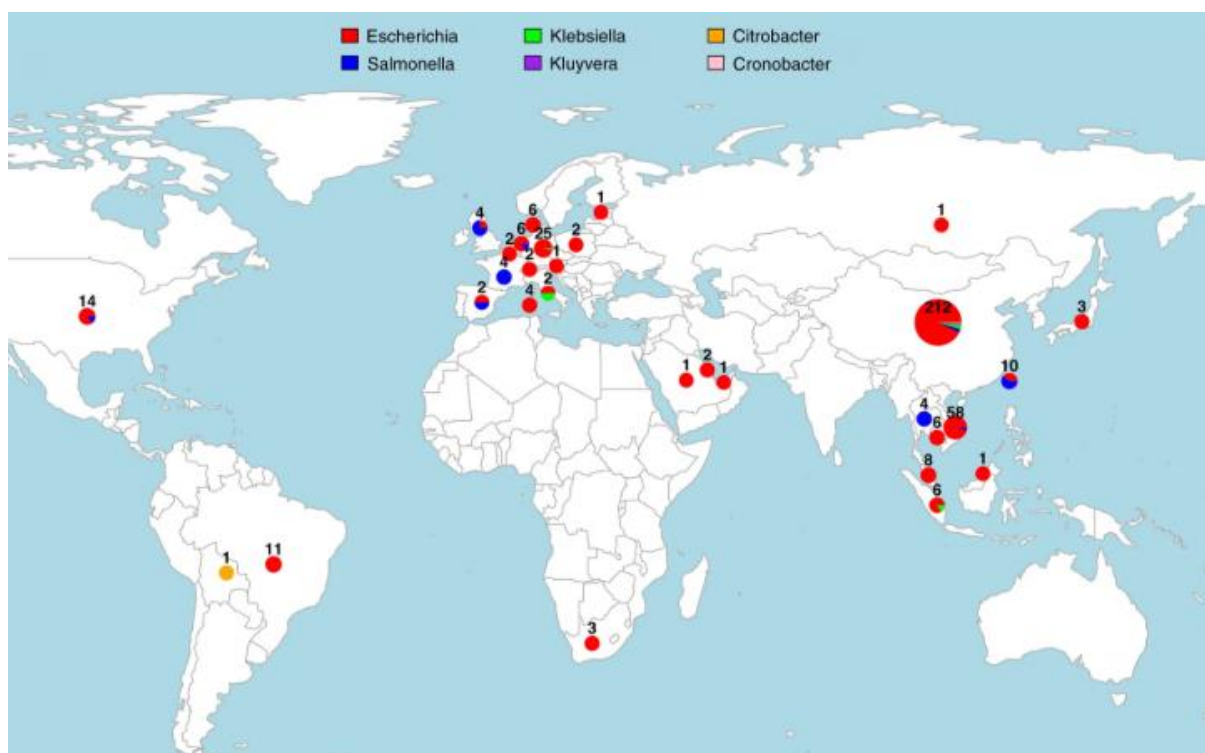
Plazmidová rezistence k polymyxinům nesená genem *mcr-1* byla doposud popsána u několika různých druhů enterobakterií, zejména u izolátů *E. coli*, a dále např. *Salmonella enterica*, *Enterobacter* spp. a *K. pneumoniae*. Dle soudobé literatury zabývající se tímto tématem, gen *mcr-1* je distribuován v bakteriích na všech kontinentech (Skov a Monnet, 2016). Není zatím známo, zda jeho šíření bylo z jednoho původního zdroje (pravděpodobně Čína), či se mobilizoval v různých částech světa nezávisle. Probíhající epidemiologické průzkumy by měly poskytnout důležitá vodítka (Poirel a kol., 2017).

Ještě v roce 2009 byly míry rezistence gramnegativních patogenů (*Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* a *Klebsiella* spp.) k polymyxinům hodnoceny jako nízké (<0,1 % až 1,5 %) (Gales a kol., 2011), avšak oproti předchozím létům se zvyšujícím se trendem, pravděpodobně zapříčiněným rozsáhlým, a/nebo neadekvátním celosvětovým používáním polymyxinů k léčbě infekcí právě gramnegativními multirezistentními bakteriemi (Poirel a kol., 2017). V současnosti Li a kol. (2019) uvádí míru rezistence *E. coli* ke kolistinu u lidí do 1,1 %, u potravinových zvířat však až 21 % (viz Tabulka 1). Nejvyšší rezistence je pak detekována u klinických izolátů *K. pneumoniae* potravinových zvířat, kde dosahuje hodnoty téměř 75 %. Nejčastěji se vyskytující gen (*mcr-1*) kolistinové rezistence je dle Wanga a kol. (2018) možno identifikovat u izolátů *E. coli* s nejvyšší zaznamenanou mírou výskytu v Číně (viz Obrázek 2).

Tabulka 1: Míra rezistence ke kolistinu vybraných mikrobů lidí a potravinových zvířat (převzato z Li a kol., 2019)

	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.
potravinová zvířata	0 – 74,2 %	NA	0,2 – 21 %	0 – 18,2 %
lidé	1,5 – 6,8 %	0 – 6,45 %	0,5 – 1,1 %	1,5 %

Obrázek 2: Globální distribuce a šíření genu mobilní rezistence na kolistin *mcr-1* (převzato z Wang a kol., 2018)



2.4.2. Situace v České republice

Od roku 2018 probíhá studie zaměřená na detekci genů *mcr*, tj. ukazatelů kolistinové rezistence. Studii realizuje Národní referenční laboratoř pro antibiotika (NRL pro ATB) ve spolupráci s Veterinární a farmaceutickou univerzitou (VFU) Brno.

V NRL pro ATB jsou na přítomnost genů *mcr* vyšetřovány gramnegativní bakterie patřící do řádu *Enterobacterales* (i ty přirozeně rezistentní ke kolistinu) a gramnegativní nefermentující bakterie náležící k rodu *Pseudomonas* a *Acinetobacter*. Epidemiologicky závažné geny *mcr* jsou detekovány metodou multiplex PCR. Detailní typizace pozitivních kmenů metodou celogenomového sekvenování následně probíhá v laboratořích VFU Brno.

Kmeny rezistentní ke kolistinu (bez ohledu na druh klinického materiálu) by měly mikrobiologické laboratoře zaslat do NRL pro ATB pro nezbytnou confirmaci rezistence ke kolistinu a průkaz přítomnosti *mcr* genů. Confirmační metoda je pro spolupracující laboratoře

prováděna zdarma a není účtována pojišťovně. Monitorování mechanismů rezistence ke kolistinu slouží k mapování rozšíření *mcr* genů u klinických izolátů v České republice, je také i předmětem výše zmíněné genomové surveillance karbapenem a/nebo kolistin rezistentních enterobakterií.

Rozsáhlou studii zabývající se detekcí rezistence ke kolistinu v drůbežím mase ze zemí EU i mimo EU zveřejnila Gelbíčová a kol. (2019). Bylo zjištěno, že v zemích EU i mimo ni bylo 21 % (18/86) izolátů čeledi *Enterobacteriaceae* pozitivních na gen *mcr-1*. Prevalenci *mcr* pozitivních bakteriálních izolátů u hospitalizovaných pacientů v ČR mezi léty 2008-2018 hodnotila ve své studii Zelendova a kol. (2019) s konstatováním, že míra výskytu těchto genů je zde pouze nízká (0,3 – 1,3 %).

2.5. Rezistence ke kolistinu u člověka

Po svém objevení v roce 1947 byl kolistin v 50. letech používán v Japonsku a Evropě. Poté, co byl schválen americkým úřadem pro potraviny a léčiva (U. S. Food and Drug Administration; FDA) v roce 1959, byl kolistimetát, neaktivní proléčivo kolistinu, nahrazen kolistinem pro parenterální podávání (Bialvaei a Samadi Kafil, 2015). Kolistin a kolistimetát se široce používaly po celá desetiletí k léčbě infekcí způsobených gramnegativními bakteriemi. V 70. letech však bylo jejich použití z důvodu toxicity, zejména nefrotoxicity (Magiorakos a kol., 2012), znovu přehodnoceno. Následně tak byly nahrazeny novými, aktivnějšími a méně toxickými antibiotiky, jakými jsou aminoglykosidy, chinolony a β -laktamy. Poté bylo po dobu 20 let medicínské využití kolistinu omezeno pouze na oční a lokální aplikaci. Systémový kolistin byl používán jen u pacientů s cystickou fibrózou. Rostoucí prevalence gramnegativních multirezistentních bakterií (Biswas a kol., 2012), zejména pak *K. pneumoniae*, *A. baumannii* a *P. aeruginosa*, však přiměla lékaře znovu zavést systémové používání polymyxinů jako terapeutickou možnost (Li a kol., 2006; Falagas a Kasiakou, 2005; Biswas a kol., 2012). Vzhledem k nedostatku nových antibiotik je kolistin v současnosti často jediným účinným antibiotickým činidlem proti multirezistentním mikroorganismům, zejména bakteriím produkujícím karbapenemázu.

V oblasti humánní medicíny se kolistin tedy v současnosti používá k léčbě infekcí způsobených bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae* a je většinou lékem poslední volby u multirezistentních gramnegativních původců (Al-Tawfiq a kol., 2017), což jasně poukazuje na důležitost zachování co nejnižší míry rezistence bakterií na kolistin. K tomu může přispět jedině uvážlivé používání tohoto antibiotika, což se týká i veterinární sféry, jak ukazují výsledky studie z Číny,

kde byla detekována rezistence ke kolistinu u pacientů s nulovou historií kolistinové terapií. Vzhledem k tomu, že polovinu z nich tvořili farmáři, autoři usuzují, že rezidua z veterinární terapie/prevence může hrát signifikantní roli (Luo a kol., 2017).

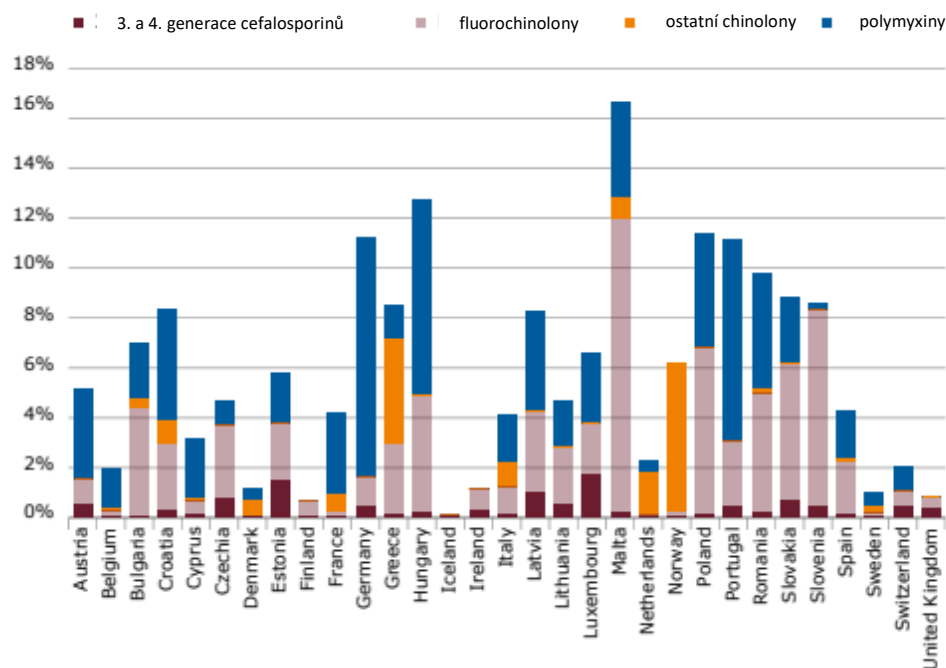
Infekce způsobené multirezistentními bakteriemi, které získaly *mcr* gen vyžadují složitou léčbu a mohou být příčinou vyšší mortality. Je doporučeno rutinně testovat rezistenci ke kolistinu a následně přítomnost *mcr* genů u všech pacientů infikovaných, či kolonizovaných enterobakteriemi rezistentními ke karbapenemům. V případě, že byl u pacientů prokázán kmen (enterobakterie) nesoucí gen *mcr* (a to bez ohledu na další mechanismy rezistence k ostatním antibiotikům) je doporučena jejich kontaktní izolace. U pacientů, kteří jsou infikováni karbapenemáza pozitivními, nebo jinými multirezistentními enterobakteriemi, a přišli do kontaktu s *mcr* pozitivními pacienty, nebo byli ošetřováni stejným nemocničním personálem, je zapotřebí provádět screening kolistinové rezistence.

Na území Evropské unie/Evropského hospodářského prostoru (EU/EHP) nedošlo mezi lety 2012 – 2016 ke statisticky významnému rozdílu u v populaci váženého průměru spotřeby polymyxinů. V roce 2016 činila spotřeba polymyxinů v nemocnicích EU/EHP celkem 0,016 DDD na 1 000 obyvatel za den. U zemí vykazujících srovnatelné údaje za všechny roky během let 2012 – 2016 došlo k nárůstu u devíti zemí (Bulharsko, Dánsko, Řecko, Itálie, Maďarsko, Malta, Rumunsko, Slovensko, Rumunsko a Slovinsko) a k poklesu u dvou zemí (Francie a Irsko) (ECDC, 2017).

2.6. Rezistence ke kolistinu ve veterinární sféře

Na rozdíl od humánní medicíny se ve veterinární medicíně kolistin po desetiletí hojně používal a stále používá k léčbě a prevenci infekčních chorob. Většina spotřeby polymyxinů odpovídá orálně podávaným formám v různých podobách (premix, prášek nebo orální roztoky). Hlavní použití se týká enterobakteriálních infekcí, a zejména gastrointestinálních infekcí způsobených *E. coli* v intenzivních systémech chovu drůbeže a prasat. Kromě tohoto běžného využití pro léčbu infekcí, plní kolistin také funkci antibiotického stimulatoru růstu. V roce 2011 byly polymyxiny pátou nejprodávanější třídou antimikrobiálních látek (7 %) pro léčbu zvířat určených k produkci potravin v Evropě (Catry a kol., 2015). Po zákazu antibiotických stimulatorů růstu klesla v Evropě spotřeba antibiotik u zvířat mezi léty 2011 – 2017 celkově o 32 %, z toho polymyxinů o 66,4 % – viz Graf 1 (EMA, 2019).

Graf 1: Podíl celkového prodeje cefalosporinů 3. a 4. generace, fluorochinolonů, chinolonů a polymyxinů pro potravinová zvířata, v mg/PKJ, v 31 evropských zemích, v roce 2017 (žádný prodej polymyxinů ve Finsku, na Islandu a v Norsku) (převzato z EMA, 2019)



I přes rozsáhlé používání ve veterinární sféře zůstává míra rezistence vůči kolistinu u kmenů *E. coli* získaných ze zdravých zvířat v mnoha evropských zemích nízká (<1 %) (Kempf a kol., 2013). Avšak rezistence na kolistin byla častěji detekována (10 %) mezi patogenními kmeny *E. coli* v Belgii u prasat (Boyen a kol., 2010) a výskyt rezistence byl zaznamenán také u skotu (Kieffer a kol., 2015). Nedávná studie provedená v Asii navíc odhalila možnost horizontálního přenosu z hospodářských zvířat na lidi (Olaitan a kol., 2015). Vzhledem k rostoucí potřebě zachovat účinnost kolistinu při léčbě humánních infekcí způsobených multirezistentními bakteriemi, možnosti šíření kolistin-rezistentních izolátů ze zvířat na člověka a nedávná identifikace kolistin-rezistentních enterobakterií zvířat, u nichž byly zjištěny determinanty kolistinové rezistence, je používání kolistinu ve veterinární medicíně přehodnocováno. Například čínské ministerstvo zemědělství rozhodlo o zákazu kolistinu jako krmného aditiva pro zvířata (Walsh a Wu, 2016).

V červnu 2016 Evropská agentura pro léčivé přípravky rovněž vydala stanovisko, v němž jsou poskytovány aktualizované rady ohledně používání kolistinových produktů u zvířat v EU s doporučením ke snížení používání kolistinu zároveň bez zvýšeného používání (v mg/PKJ) fluorochinolonů, cefalosporinů 3. a 4. generace nebo celkové spotřeby antimikrobiálních látek (EMA, 2016).

3. Experimentální část studie

3.1. Materiál a metodika

3.1.1. Sběr vzorků

Třicet vzorků kuřecího masa bylo v období 1. – 15.3.2020 zakoupeno v maloobchodní síti prodejen potravin v oblasti pražských městských částí Praha 2, Praha 11 a Praha 22. Po zakoupení byly vzorky v původním obalu umístěny do chladicích boxů a transportovány do laboratoře během 2 hodin v den odběru. Vzorky byly skladovány při 4 ± 1 °C v laboratoři do doby zpracování následující den.

3.1.2. Izolace *E. coli*

Zakoupené maso jakostní třídy A bylo v případě 29 vzorků prsních kuřecích řízků pro účely studie kolistinové rezistence přítomných kmenů *E. coli* asepticky rozemleto. Jeden vzorek představovalo již z výroby rozemleté drůbeží maso – viz seznam vzorků (Tabulka 2). Pomnožování a izolace *E. coli* ze vzorků zakoupeného masa bylo provedeno dle metodiky ISO 21528-1: Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*. Stručně, po rozemletí bylo od každého vzorku odebráno 25 g rozemletého masa do 225 ml peptonové vody po sterilizaci při 121 °C po dobu 15 min, která byla připravena smícháním 10 g bakteriologického peptonu (Oxoid, Brno, Česká republika) s 5 g chloridu sodného (Penta, Praha, Česká republika) v 1 l destilované vody. Vzorek v peptonové vodě byl třepán po dobu 10 min při 37 °C a 170 RPM na automatické vyhřívané třepačce Orbital Shaker-Incubator ES-20 (Biosan, Riga, Lotyšsko) a následně inkubován 24 hod při 37 °C v termoboxu. Po 24 hod bylo 25 ml vzorku převedeno do 225 ml Luria bujónu (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) – složení: 10 g/l pepton, 10 g/l chlorid sodný, 5 g/l kvasniční extrakt. Bujón se vzorkem byl poté opět inkubován 24 hod při 37 °C v termoboxu. Následně bylo 20 µl vzorku bakteriologickou kličkou rozetřeno na Petriho misky s T.B.X. agarem (Oxoid, Brno, Česká republika). Jedná se o selektivní, chromogenní médium určené pro detekci a enumeraci *E. coli* v potravinách a krmivech (složení: 20 g/l pepton, 1,5 g/l žlučová sůl č. 3, 15 g/l agar, 0,075 g/l X-glucuronid).

Tabulka 2: Seznam testovaných vzorků a jejich specifikace

číslo vzorku	1	2	3	4	5
název vzorku	Vocílka – kuřecí prsní řízky	Drůbež Dýšina – kuřecí prsní řízek bez kůže a kosti	Dobré maso – kuřecí prsní řízek	Vodňanské kuře – kuřecí prsní medailonky	Vodňanské kuře – kuřecí prsní řízky
typ vzorku	čerstvé kuřecí maso	hluboce zmrazené dělené drůbeží maso	bez kůže, čerstvý	kuřecí prsní řízky krájené, čerstvé	bez kůže, čerstvé
původ vzorku	Česká republika	Polsko	Česká republika	Česká republika	Česká republika
typ balení	ochranná atmosféra	mražené	ochranná atmosféra	ochranná atmosféra	ochranná atmosféra
výrobce	Drůbežářský závod Klatovy a.s.	Drůbež Dýšina MRAŽÍRNY PLZEŇ – DÝŠINA a.s.	Vodňanská drůbež, a.s.	Vodňanská drůbež, a.s.	Vodňanská drůbež, a.s.
kód výrobce	CZ931ES	CZ4288ES	CZ921ES	CZ921ES	CZ921ES
šarže	L:0058	194224	L 1000022600	L 1000022800	L 1000022600
datum spotřeby	5.3.2020	30.4.2021	7.3.2020	5.3.2020	4.3.2020
prodávající	Billa, spol. s.r.o.	Bidfood Czech Republic s.r.o.	Penny Market s.r.o.	NORMA, k.s.	NORMA, k.s.
datum zakoupení	1.3.2020	1.3.2020	1.3.2020	1.3.2020	1.3.2020
číslo vzorku	6	7	8	9	10
název vzorku	Kuřata BD A VL	Kuřecí steak bez kůže mletý	Řezníková čerstvá porce – kuřecí prsní řízky	Kuřecí prsní řízky	Kuřata BD A VL
typ vzorku	kuřecí prsní řízky, čerstvé	polotovary z čerstvého kuřecího masa (99% kuřecí maso, 0,5% jedlá sůl, směs koření: paprika, kurkuma, skořice, extrakty kvasinek)	čerstvé kuřecí maso, bez kůže	čerstvé maso	kuřecí prsní řízky, čerstvé
původ vzorku	Česká republika	neuveďeno	Česká republika	Česká republika	Česká republika
typ balení	pultový prodej	ochranná atmosféra	ochranná atmosféra	ochranná atmosféra	pultový prodej
výrobce	Vodňanská drůbež, a.s.	Drůbežářský závod Klatovy a.s.	Drůbežářský závod Klatovy a.s.	Vodňanská drůbež, a.s.	Vodňanská drůbež, a.s.
kód výrobce	CZ921ES	CZ931ES	CZ931ES	CZ921ES	CZ921ES
šarže	L 1000022600	L:0059	L:0059	L 1000022928	L 1000030600
datum spotřeby	4.3.2020	6.3.2020	10.3.2020	7.3.2020	12.3.2020
prodávající	PMU CZ, a.s.	Albert Česká republika, s.r.o.	Lidl Česká republika v.o.s.	Albert Česká republika, s.r.o.	PMU CZ, a.s.
datum zakoupení	1.3.2020	2.3.2020	2.3.2020	2.3.2020	8.3.2020

Pokračování Tabulky 2

číslo vzorku	11	12	13	14	15
název vzorku	Kuřecí prsní řízky	Kuřecí prsní řízky	Vodňanské kuře – kuřecí prsní medailonky	Drůbež Dýšina – kuřecí prsní řízek bez kůže a kosti	Řezníková čerstvá porce – kuřecí prsní řízky
typ vzorku	čerstvé maso	bez kosti, bez kůže, čerstvé	kuřecí prsní řízky krájené, čerstvé	hluboce zmrazené dělené drůbeží maso	čerstvé kuřecí maso, bez kůže
původ vzorku	Česká republika	Česká republika	Česká republika	Polsko	Česká republika
typ balení	ochranná atmosféra	ochranná atmosféra	ochranná atmosféra	mražené	ochranná atmosféra
výrobce	Vodňanská drůbež, a.s.	Rabbit Trhový Štěpánov a.s.	Vodňanská drůbež, a.s.	Drůbež Dýšina MRAZÍRNY PLZEŇ – DÝŠINA a.s.	Drůbežářský závod Klatovy a.s.
kód výrobce	CZ921ES	CZ993ES	CZ921ES	CZ4288ES	CZ931ES
šarže	L 1000030300	L: 72 2006451	L 1000030600	190942	L:0065
datum spotřeby	10.3.2020	10.3.2020	12.3.2020	27.8.2020	15.3.2020
prodávající	Albert Česká republika, s.r.o.	Tesco Stores ČR a.s.	NORMA, k.s.	Bidfood Czech Republic s.r.o.	Lidl Česká republika v.o.s.
datum zakoupení	8.3.2020	8.3.2020	8.3.2020	8.3.2020	8.3.2020
číslo vzorku	16	17	18	19	20
název vzorku	Vodňanské kuře – kuřecí prsní řízky	Vocílka – kuřecí prsní řízky	Dobré maso – kuřecí prsní filety	Zlaté kuře – prsní řízky	Zlaté kuře – prsní řízky
typ vzorku	bez kůže, čerstvé	čerstvé drůbeží maso	čerstvé drůbeží maso, bez kosti a kůže	bez kůže, čerstvé	bez kůže, čerstvé
původ vzorku	Česká republika	Česká republika	Česká republika	Česká republika	Česká republika
typ balení	ochranná atmosféra	ochranná atmosféra	ochranná atmosféra	ochranná atmosféra	ochranná atmosféra
výrobce	Vodňanská drůbež, a.s.	Drůbežářský závod Klatovy a.s.	Rabbit Trhový Štěpánov a.s.	Vodňanská drůbež, a.s.	Vodňanská drůbež, a.s.
kód výrobce	CZ921ES	CZ931ES	CZ993ES	CZ922ES	CZ922ES
šarže	L 1000030600	L:0065	L 722006329	L 3000030300	L 3000031200
datum spotřeby	13.3.2020	12.3.2020	11.3.2020	13.3.2020	22.3.2020
prodávající	NORMA, k.s.	Billa, spol. s.r.o.	Penny Market s.r.o.	Billa, spol. s.r.o.	Billa, spol. s.r.o.
datum zakoupení	8.3.2020	8.3.2020	8.3.2020	8.3.2020	15.3.2020

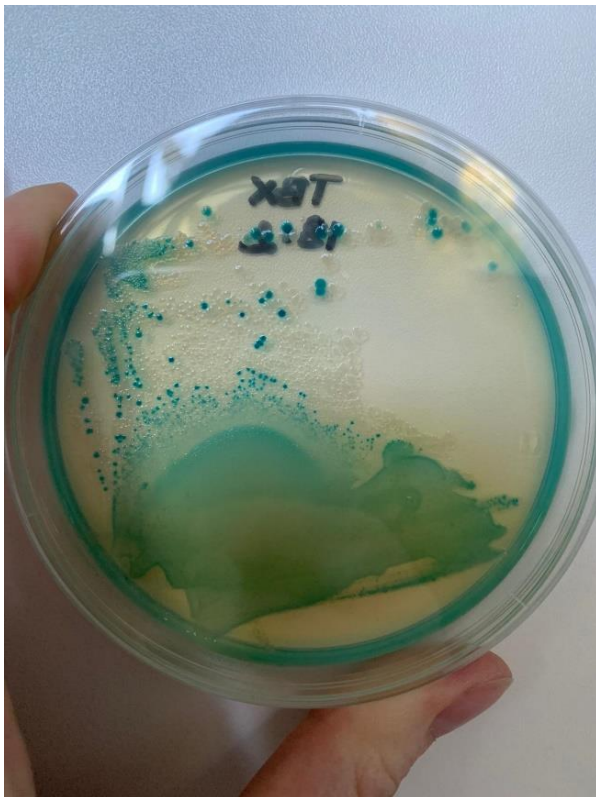
Pokračování Tabulky 2

číslo vzorku	21	22	23	24	25
název vzorku	Drůbež Dýšina – kuřecí prsní řízek bez kůže a kosti	Česká drůbež – kuřecí prsní řízek bez kosti a kůže	Dobré maso – kuřecí prsní filety	Kuřecí prsní řízky VL	Vocílka – kuřecí prsní řízky
typ vzorku	hluboce zmrazené dělené drůbeží maso	dělené drůbeží maso, hluboce zmrazené	čerstvé drůbeží maso, bez kosti a kůže	bez kůže, čerstvý	čerstvé drůbeží maso
původ vzorku	Polsko	Česká republika	Česká republika	Česká republika	Česká republika
typ balení	mražené	mražené	ochranná atmosféra	pultový prodej	ochranná atmosféra
výrobce	Drůbež Dýšina MRAZÍRNY PLZEŇ – DÝŠINA a.s.	VAIGL A SYN spol. s r.o.	Rabbit Trhový Štěpánov a.s.	Vodňanská drůbež, a.s.	Drůbežářský závod Klatovy a.s.
kód výrobce	CZ4288ES	CZ431ES	CZ993ES	CZ921ES	CZ931ES
šarže	190942	20191118	L 72 2007333	L 1000031300	L:0071
datum spotřeby	27.8.2020	18.11.2020	21.3.2020	19.3.2020	19.3.2020
prodávající	Bidfood Czech Republic s.r.o.	Bidfood Czech Republic s.r.o.	Penny Market s.r.o.	PMU CZ, a.s.	Billa, spol. s.r.o.
datum zakoupení	15.3.2020	15.3.2020	15.3.2020	15.3.2020	15.3.2020
číslo vzorku	26	27	28	29	30
název vzorku	Vodňanské kuře – kuřecí prsní medailonky	Vodňanské kuře – kuřecí prsní řízky	Řezníkova čerstvá porce – kuřecí prsní řízky	Řezníkova čerstvá porce – kuřecí prsní řízky – plátky	Řezníkova čerstvá porce – kuřecí medailonky z prsních řízků
typ vzorku	kuřecí prsní řízky krájené, čerstvé	bez kůže, čerstvé	čerstvé kuřecí maso, bez kůže	čerstvé kuřecí maso	čerstvé kuřecí maso
původ vzorku	Česká republika	Česká republika	Česká republika	Česká republika	Česká republika
typ balení	ochranná atmosféra	ochranná atmosféra	ochranná atmosféra	ochranná atmosféra	ochranná atmosféra
výrobce	Vodňanská drůbež, a.s.	Vodňanská drůbež, a.s.	Drůbežářský závod Klatovy a.s.	Drůbežářský závod Klatovy a.s.	Drůbežářský závod Klatovy a.s.
kód výrobce	CZ921ES	CZ921ES	CZ931ES	CZ931ES	CZ931ES
šarže	L 1000031300	L 1000031300	L:0072	L:0072	L:0071
datum spotřeby	19.3.2020	20.3.2020	22.3.2020	21.3.2020	21.3.2020
prodávající	NORMA, k.s.	NORMA, k.s.	Lidl Česká republika v.o.s.	Lidl Česká republika v.o.s.	Lidl Česká republika v.o.s.
datum zakoupení	15.3.2020	15.3.2020	15.3.2020	15.3.2020	15.3.2020

3.1.3. Testování kolistinové rezistence diagnostickým testem

Po 24 hod inkubace byla při pozitivním nárůstu jedna kolonie zeleně zbarvené *E. coli* (viz Obrázek 3) odebrána z T.B.X. agaru pro zjištění míry rezistence ke kolistinu pomocí *in vitro* diagnostického kvalitativního imunologického testu k rychlé detekci enzymu *mcr-1*, NG-Test MCR-1 (NG Biotech, Guipry, Francie). Princip metody spočívá v resuspendaci bakteriální kolonie v extrakčním pufru. Esej se provádí nanesením vzorku do kazetkové jamky. Vzorek migruje směrem ke konjugální podložce a pokud je přítomen, *mcr-1* enzym reaguje se značenými anti-*mcr-1* monoklonálními protilátkami. Tento komplex migruje přes nitrocelulosoovou membránu díky kapilárním silám a interaguje s anti-*mcr-1* myšími monoklonálními protilátkami imobilizovanými na testovací zóně (T). Kontrolní proužek (C) je tvořen značeným streptavidinem a značenými monoklonálními protilátkami. Ty reagují s biotin-BSA a kozími polyklonálními protilátkami imobilizovanými na membráně, které jsou namířené proti myším protilátkám. Pokud je vzorek pozitivní na *mcr-1*, na testovací zóně (T) a na kontrolní zóně membrány se objeví červený proužek (C). Pokud je testovaný vzorek negativní, objeví se pouze jeden červený proužek v kontrolní zóně (C) (viz Obrázek 4).

Obrázek 3: Nárůst *E. coli* po inkubaci na T.B.X. agaru



Obrázek 4: Negativní NG-Test MCR-1



3.1.4. Testování kolistinové rezistence bujónovou mikrodiluční metodou

Kolistinová rezistence izolovaných bakteriálních kolonií *E. coli* bujónovou mikrodiluční metodou byla hodnocena na základě stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) dle pokynů Institutu pro klinické a laboratorní standardy (CLSI, 2013), a na základě laboratorního manuálu ECDC pro detekci a charakterizaci rezistence ke karbapenemům a kolistinu v rámci průzkumu enterobakterií rezistentních na karbapenem a/nebo kolistin (ECDC, 2019). *In vitro* stanovení MIC bylo provedeno v 96jamkových mikrotitračních destičkách – design destičky viz Obrázek 5. Počáteční koncentrace kolistinu pro testování byla 8 µg/ml. Pro určení rezistence/citlivosti izolovaných kmenů *E. coli* ke kolistinu byla použita sulfátová sůl kolistinu (dále pouze „kolistin“) od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Destičky byly inokulovány bakteriální suspenzí o konečné hustotě 5×10^5 KTJ/ml, která byla kontrolována pomocí McFarland Densitometer Biosan DEN 1 (BioTech, Česká republika), a inkubovány při 37 ° C po dobu 24 hod. Bakteriální růst před a po inkubaci byl hodnocen spektrofotometricky pomocí čtečky mikrotitračních destiček Tecan Infinite® 200 PRO (Tecan Group Ltd., Švýcarsko) při vlnové délce 405 nm. MIC byly vyjádřeny jako nejnižší koncentrace kolistinu, které vedly ke snížení bakteriálního růstu o 80 % v porovnání s kontrolou růstu bakterií bez kolistinu. Následná vizualizace bakteriálního růstu byla provedena přidáním 20 µl thiazolylové modři (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) do každé jamky mikrotitrační destičky. Validace metody byla provedena testováním MIC kolistinu pro sbírkovou bakterii *E. coli*, která slouží jako referenční standard pro testování citlivosti bakterií k tomuto antibiotiku. Jedná se o kmen z Americké sbírky typových kultur (American Type Culture Collection; ATCC), *E. coli* ATCC 25922. Všechny bakteriální kmeny izolované ze vzorků byly testovány v triplicátu. Výslednou MIC každého kmene představuje modus získaných hodnot. Na základě tzv. breakpoints, které stanovuje Evropský výbor pro testování citlivosti k antimikrobikům (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; EUCAST), byly jako kolistin rezistentní hodnoceny ty kmeny izolované *E. coli*, jejichž MIC byla > 2 µg/ml, a jako senzitivní ty, jejichž MIC ≤ 2 µg/ml (EUCAST, 2020a).

Obrázek 5: Design mikrotitrační destičky použitý při zjišťování MIC kolistinu u jednotlivých bakteriálních kmenů *E. coli* izolovaných ze vzorků drůbežího masa z maloobchodní sítě

		KMEN 1						KMEN 2					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
koncentrace kolistinu [$\mu\text{g/ml}$]	A		8	8	8	8			8	8	8	8	
	B	kontrola růstu – kmen 1	4	4	4	4	kontrola čistoty	kontrola růstu – kmen 2	4	4	4	4	kontrola čistoty
	C		2	2	2	2			2	2			
	D		1	1	1	1			1	1			
	E		0,5	0,5	0,5	0,5			0,5	0,5			
	F	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25		
	G	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	
	H		0,0625	0,0625	0,0625	0,0625			0,00625	0,0625	0,0625	0,0625	

3.2. Výsledky

Míra prevalence bakteriální kontaminace kmeny *E. coli*, sledována v této studii, odpovídá hodnotě 60 % – pozitivně testováno 18 vzorků namletého masa z celkového počtu 30 testovaných – Tabulka 3. Rezistence/citlivost ke kolistinu všech testovaných kmenů *E. coli* izolovaných ze vzorků kuřecího masa z maloobchodní sítě po pomnožení byla provedena diagnostickým testem NG-Test MCR-1 (NG Biotech, Guipry, Francie) a bujónovou mikrodiluční metodou. Validace bujónové mikrotitrační metody byla provedena ve třech opakováních a v triplikátu zjištěním MIC kolistinu vůči bakteriálnímu kmeni *E. coli* ATCC 25922. Výsledek tohoto testování potvrdil správnost provedení a nastavení experimentu, kdy MIC kolistinu vůči standardnímu kmenu *E. coli* s hodnotou 0,25 µg/ml odpovídá referenčnímu rozmezí EUCAST 0,5 – 1 µg/ml i CLSI 0,25 – 2 µg/ml (EUCAST, 2020b; CLSI, 2019).

Jako kolistin-rezistentní bylo na základě stanovení MIC identifikováno 11 kmenů z 18 testovaných (61 %). Zbýlých 7 kmenů, u kterých byla *E. coli* izolována (39 %), bylo na základě mikrodiluční bujónové metody hodnoceno jako senzitivní a vykazalo MIC v rozmezí 0,25 – 1 µg/ml – viz Obrázek 6. Na základě výsledků uvedených v Tabulce 3 lze konstatovat, že v případě přítomnosti *E.coli* ve vzorku masa, rezistentní kmeny se nacházely v mase z pultového prodeje v obou testovaných vzorcích (2/2; 100 %), v 8 vzorcích masa baleného v ochranné atmosféře (8/14; 57 %) a v 1 vzorku masa zmraženého (1/2; 50 %).

NG-Testem MCR-1 byla detekována rezistence u 10 kmenů izolovaných bakterií (56 %) a 8 kmenů bylo vyhodnoceno jako kolistin-senzitivní (44 %). Na základě výsledků hodnocení MIC byly diagnostickými testy vyhodnoceny 4 vzorky (22 %) jako falešně pozitivní a 5 vzorků (28 %) jako falešně negativní. Shoda mezi diagnostickým testem a bujónovou mikrodiluční metodou byla pozorována tedy v 50 % případů – u 9 testovaných vzorků. Falešná negativita diagnostického testu může být však způsobena přítomností kolistinové rezistence u kmene *E. coli*, u níž je tato indukována jiným než *mcr-1* genem. V tomto případě by bylo možné konstatovat, že zjištěná rezistence ke kolistinu na základě stanovení MIC pěti vzorků, u nichž diagnostický test neodhalil přítomnost *mcr-1*, by byla způsobena jinou variantou *mcr* genu.

Tabulka 3: Výsledky testování rezistence/citlivosti vzorků rozemletého kuřecího masa ke kolistinu bujónovou mikrodiluční metodou a diagnostickým testem NG-Test MCR-1

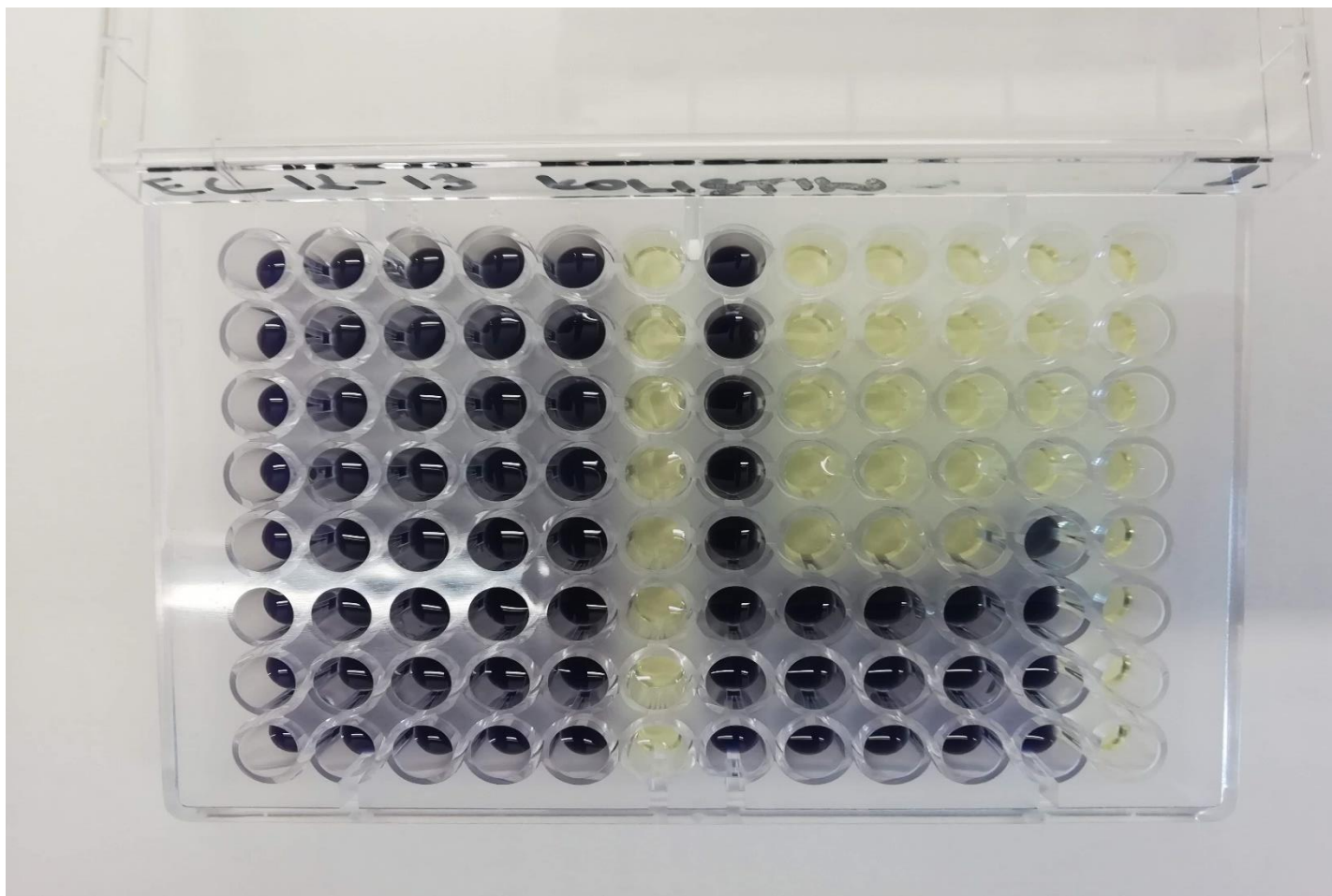
číslo vzorku	MIC [μg/ml]	NG-Test MCR-1	číslo vzorku	MIC [μg/ml]	NG-Test MCR-1	číslo vzorku	MIC [μg/ml]	NG-Test MCR-1
1	>8	pozitivní	11	>8	pozitivní	21	NA	-
2	>8	negativní	12	>8	pozitivní	22	NA	-
3	>8	pozitivní	13	0,25	pozitivní	23	NA	-
4	>8	pozitivní	14	0,5	negativní	24	NA	-
5	>8	negativní	15	1	pozitivní	25	NA	-
6	>8	negativní	16	>8	negativní	26	NA	-
7	>8	negativní	17	1	pozitivní	27	NA	-
8	1	negativní	18	0,25	pozitivní	28	NA	-
9	NA	-	19	0,5	negativní	29	NA	-
10	>8	pozitivní	20	NA	-	30	NA	-

Legenda:

kolistin-senzitivní	kolistin-rezistentní
---------------------	----------------------

NA – nebyla detekována přítomnost *E. coli* ve vzorku

Obrázek 6: Příklad vizualizace výsledků mikrodiluční bujónové metody v 96ti jamkové mikrotitrační destičce se vzorky *E. coli* 12 (kolistin-rezistentní; MIC >8) a 13 (kolistin-senzitivní ; MIC = 0,25 µg/ml) na základě barvení thiazolylovou modří



3.3. Diskuze

Potravinový řetězec může z globálního pohledu velice významně podporovat celosvětové šíření bakteriální antibiotické rezistence a vznik multirezistentních kmenů mikroorganismů. Šíření rezistence bakterií schopných odolávat účinkům kolistinu představuje závažné zdravotní riziko jak v humánní, tak ve veterinární medicíně. Masivní nekontrolované užívání kolistinu ve veterinární medicíně pro kontrolu infekcí a jejich profylaxi přispělo k významnému zvýšení prevalence bakterií rezistentních na kolistin (Kempf a kol., 2016). V humánní medicíně se kolistin používá jako antibiotikum poslední instance u pacientů infikovaných multirezistentními gramnegativními bakteriemi (Al-Tawfiq a kol., 2017). Zurfluh a kol. (2017) ve své studii naznačují, že potravní řetězec může být důležitou cestou přenosu plazmidů nesoících gen *mcr-1*, a že za jeho šíření v potravinovém řetězci mohou být zodpovědné spíše některé „epidemické“ plazmidy než specifické klony *E. coli*. Z těchto důvodů je celosvětově rezistence bakterií ke kolistinu monitorována (ECDC, NARMS aj.).

Obecně lze konstatovat, že v Evropě jsou v porovnání s hovězím a vepřovým masem *mcr* geny kolistinové rezistence častěji detekovány u bakterií ze vzorků drůbežího masa (Zajac a kol., 2019;). El Garch a kol. (2018) ve své studii sledující výskyt *mcr*-pozitivních enterobakterií u hospodářských zvířat v 11 evropských zvířat mezi lety 2002-2014 detekují 1,2 % *mcr-1*-pozitivních *E. coli*. Studie provedená ve švýcarské maloobchodní síti potvrzuje přítomnost *mcr-1* genu u 25,8 % kuřecího a krůtího masa (Zurfluh a kol., 2017). V Brazílii byla přítomnost *E. coli* s *mcr-1* detekována v 19,5 % testovaných maloobchodních vzorků kuřecího masa a jater (Monte et al., 2017).

První *mcr-1*-pozitivní *E. coli* byla v České republice v roce 2017 pozorována Karpíškovou a kol. (2017) v krůtím mase importovaným z Polska. Aktuální prevalenci bakterií s *mcr* geny v krůtím mase prodávaném v České republice hodnotila Gelbíčová a kol. (2020). Její studie prokázala vysokou míru výskytu *mcr-1* zprostředkované kolistinové rezistence enterobakterií (70,6 %), což je výsledek shodný s výsledky této práce, kdy kolistin-rezistentní bakterie *E. coli* byly identifikovány v 60 % testovaných vzorků kuřecího masa z maloobchodní sítě.

Výsledky současných studií prokazují zvyšující se míru výskytu *mcr* pozitivních bakteriálních izolátů enterobakterií u potravinových zvířat a produktů z nich získávaných. Jedním z hlavních zdrojů kolistin-rezistentních mikroorganismů jsou chovy drůbeže a také drůbeží maso. Tento fakt potvrzuje nutnost monitoringu a následných opatření ke zpomalení šíření kolistinové rezistence.

4. Závěr

Kolistinová rezistence bakterií je celosvětově se šířícím a prohlubujícím se problémem jak v humánní a veterinární medicíně, tak v chovech potravinových zvířat vzhledem k tomu, že nejnovější poznatky naznačují možnost horizontálního přenosu. Nejvýznamnějším rezervoárem tohoto negativního fenoménu jsou chovy drůbeže a také drůbeží maso. Z tohoto důvodu byla v této studii hodnocena prevalence kolistinové rezistence u bakterií *E. coli* izolovaných ze vzorků kuřecího masa z maloobchodní sítě v České republice na základě stanovení minimálních inhibičních koncentrací bujónovou mikrodiluční metodou a rychlým diagnostickým testem pro detekci přítomnosti *mcr-1* genů kódujících rezistenci ke kolistinu u bakterií. Naše výsledky ukázaly, že míra výskytu kolistin-rezistentních kmenů *E. coli* ve vzorcích kuřecího masa z maloobchodní sítě v České republice dosahuje 60 %. Tato hodnota představuje vysokou prevalenci kolistin-rezistentní *E. coli*. Velká pozornost by proto měla být věnována nepřetržitému fenotypovému a genotypovému sledování a shromažďování údajů o bakteriální rezistenci ke kolistinu v humánním i veterinárním prostředí, což umožní zásah proti jakémukoli rychlému šíření *mcr*-pozitivní *E. coli*, či jiných enterobakterií.

5. Reference

- AbuOun, M., Stubberfield, E. J., Duggett, N. A., Kirchner, M., Dormer, L., a kol. (2018). *mcr-1* and *mcr-2* variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(10), 2745-2749. doi: 10.1093/jac/dky272
- Al-Tawfiq, J. A., Laxminarayan, R., & Mendelson, M. (2017). How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals? *International Journal of Infectious Diseases*, 54, 77-84. doi: 10.1016/j.ijid.2016.11.415
- Antoniadou, A., Kontopidou, F., Poulakou, G., Koratzanis, E., Galani, I., a kol. (2007). Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(4), 786-790. doi: 10.1093/jac/dkl562
- Barnes, H.J. & Gross, W.B. (1997). Colibacillosis. In: B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald & Y.M. Saif (Eds.), *Diseases of Poultry*, 10th ed. Iowa State University Press, Ames, IA, USA, p. 131-141.
- Beneš, J., a kol. (2009). *Infekční lékařství*. 1. vydání. Galén, Praha, ČR, 651 s. ISBN 978-80-7262-644-1.
- Bialvaei, A. Z., & Samadi Kafil, H. (2015). Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Current medical research and opinion*, 31(4), 707-721. doi:10.1185/03007995.2015.1018989
- Biswas, S., Brunel, J. M., Dubus, J. C., Reynaud-Gaubert, M., & Rolain, J. M. (2012). Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert review of anti-infective therapy*, 10(8), 917-934. doi:10.1586/eri.12.78.
- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J. A., Hendriksen, R. S., Szabo, I., & Malorny, B. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(12), 3317-3324. doi: 10.1093/jac/dkx327
- Boyen, F., Vangroenweghe, F., Butaye, P., De Graef, E., Castryck, F., a kol. (2010). Disk prediffusion is a reliable method for testing colistin susceptibility in porcine *E. coli* strains. *Veterinary microbiology*, 144(3-4), 359-362. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.01.010

- Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., a kol. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*, 22(31). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589
- Carroll, L. M., Gaballa, A., Guldimann, C., Sullivan, G., Henderson, L. O., a kol. (2019). Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate. *MBio*, 10(3), e00853-19. doi: 10.1128/mBio.00853-19
- Catry, B., Cavaleri, M., Baptiste, K., Grave, K., Grein, K., a kol. (2015). Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International journal of antimicrobial agents*, 46(3), 297-306. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.06.005
- CDC. (2020). National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS) [online]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/narms/index.html> [2020-04-13].
- CLSI. (2019). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-ninth informational supplement M100-S29. CLSI, Wayne, PA, USA.
- CLSI. (2013). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement M100-S23. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Dai, C., Zhang, D., Gao, R., Zhang, X., Li, J., a kol. (2013). In vitro toxicity of colistin on primary chick cortex neurons and its potential mechanism. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(2), 659-666. doi: 10.1016/j.etap.2013.06.013
- Dziva, F., & Stevens, M. P. (2008). Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathology*, 37(4), 355-366. doi: 10.1080/03079450802216652
- El Garch, F., de Jong, A., Bertrand, X., Hocquet, D., & Sauget, M. (2018). *mcr-1*-like detection in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from food-producing animals at slaughter in Europe. *Veterinary microbiology*, 213, 42-46. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.11.014

ECDC. (2020). European Antimicrobial Resistance Genes Surveillance Network (EURGen-Net) [online]. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/who-we-work/disease-and-laboratory-networks/EURGen-net> [2020-04-13].

ECDC. (2019). Laboratory manual for carbapenem and colistin resistance detection and characterisation for the survey of carbapenem- and/or colistin-resistant Enterobacteriaceae – Version 2.0. ECDC, Stockholm. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/carbapenem-colistin-resistant-enterobacteriaceae-laboratory-manual.pdf> [2020-04-13].

ECDC. (2017). Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union [online]. ECDC, Stockholm. Dostupné z: https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Final_2017_EAAD_ESAC-Net_Summary-edited%20-%20FINALwith%20erratum.pdf [2020-04-13].

ECDC. (2016). Plasmid-mediated colistin resistance in *Enterobacteriaceae* [online]. ECDC, Stockholm. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/enterobacteriaceae-risk-assessment-diseases-caused-by-antimicrobial-resistant-microorganisms-europe-june-2016.pdf> [2020-04-13].

EMA. (2019). Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2017, EMA/294674/2019 [online]. London, UK. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2017_en.pdf [2020-04-13].

EMA. (2016). Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health, EMA/231573/2016 [online]. London, UK. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/updated-advice-use-colistin-products-animals-within-european-union-development-resistance-possible_en.pdf [2020-04-13].

EUCAST. (2020a). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020 [online]. Dostupné z: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0/Breakpoint_Tables.pdf [2020-04-13].

EUCAST (2020b). Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 10.0, 2020 [online]. Dostupné z: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/QC/v_10.0_EUCAST_QC_tables_routine_and_extended_QC.pdf [2020-04-13].

Falagas, M. E., Kasiakou, S. K., & Saravolatz, L. D. (2005). Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical infectious diseases*, 40(9), 1333-1341. doi: 10.1086/429323

Gales, A. C., Jones, R. N., & Sader, H. S. (2011). Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–09). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(9), 2070-2074. doi:10.1093/jac/dkr239.

Gelbíčová, T., Koláčková, I., Krutová, M., & Karpíšková, R. (2020). The emergence of mcr-1-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in domestic and imported turkey meat in the Czech Republic 2017–2018. *Folia Microbiologica*, 65(1), 211-216.

Gelbíčová, T., Barakova, A., Florianová, M., Jamborova, I., Zelendova, M., a kol. (2019). Dissemination and comparison of genetic determinants of mcr-mediated colistin resistance in Enterobacteriaceae via retailed raw meat products. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2824. doi: 10.3389/fmicb.2019.02824

Karpíšková, R., Koláčková, I., Gelbíčová, T., & Zobaníková, M. (2017). A rare mechanism of resistance to colistin in *Escherichia coli* isolated from raw poultry meat. *Klinicka mikrobiologie a infekcni lekarstvi*, 23(2), 58-60.

Kempf, I., Fleury, M. A., Drider, D., Bruneau, M., Sanders, P., a kol. (2013). What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe?. *International journal of antimicrobial agents*, 42(5), 379-383. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.06.012

Kempf, I., Jouy, E., & Chauvin, C. (2016). Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *International journal of antimicrobial agents*, 48(6), 598-606. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.09.016

- Kieffer, N., Poirel, L., Nordmann, P., Madec, J. Y., & Haenni, M. (2015). Emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from veterinary medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(4), 1265-1267. doi:10.1093/jac/dku485
- Landman, D., Georgescu, C., Martin, D. A., & Quale, J. (2008). Polymyxins revisited. *Clinical microbiology reviews*, 21(3), 449-465. doi: 10.1128/CMR.00006-08.
- Li, Z., Cao, Y., Yi, L., Liu, J. H., & Yang, Q. (2019). Emergent Polymyxin Resistance: End of an Era?. In: *Open forum infectious diseases*, 6(10), p. ofz368. Oxford University Press, US.
- Li, J., Nation, R. L., Turnidge, J. D., Milne, R. W., Coulthard, K., Rayner, C. R., & Paterson, D. L. (2006). Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet infectious diseases*, 6(9), 589-601. doi:10.1016/S1473-3099(06)70580-1
- Lim, L. M., Ly, N., Anderson, D., Yang, J. C., Macander, L., a kol. (2010). Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 30(12), 1279-1291. doi: 10.1592/phco.30.12.1279
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., a kol. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*, 16(2), 161-168. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7
- Luo, Q., Yu, W., Zhou, K., Guo, L., Shen, P., a kol. (2017). Molecular epidemiology and colistin resistant mechanism of mcr-positive and mcr-negative clinical isolated *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 8, 2262. doi: 10.3389/fmicb.2017.02262
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., a kol. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- Miriagou, V., Cornaglia, G., Edelstein, M., Galani, I., Giske, C. G., a kol. (2010). Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clinical microbiology and infection*, 16(2), 112-122. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03116.x

Monte, D. F., Fernandes, M. R., Cerdeira, L., Esposito, F., Galvão, J. A., a kol. (2017). Chicken meat as a reservoir of colistin-resistant *Escherichia coli* strains carrying *mcr-1* genes in South America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(5), e02718-16. doi: 10.1128/AAC.02718-16

Olaitan, A. O., Thongmalayvong, B., Akkhavong, K., Somphavong, S., Paboriboune, P., a kol. (2015). Clonal transmission of a colistin-resistant *Escherichia coli* from a domesticated pig to a human in Laos. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(12), 3402-3404. doi:10.1093/jac/dkv252

Pardon, B., Catry, B., Dewulf, J., Persoons, D., Hostens, M., De Bleecker, K., & Deprez, P. (2012). Prospective study on quantitative and qualitative antimicrobial and anti-inflammatory drug use in white veal calves. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(4), 1027-1038. doi: 10.1093/jac/dkr570

Poirel, L., Jayol, A., & Nordmann, P. (2017). Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clinical microbiology reviews*, 30(2), 557-596. doi: 10.1128/CMR.00064-16

Pomorská K., Jakubů V., Zelendová M., Dolejská M., Žemličková H. (2018). Záchyt plazmidy determinované rezistence ke kolistinu zprostředkované geny *mcr* v České republice. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*; 27(9): 219-222.

Shen, Z., Wang, Y., Shen, Y., Shen, J., & Wu, C. (2016). Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(3), 293. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00061-

Shibata, N., Doi, Y., Yamane, K., Yagi, T., Kurokawa, H., a kol. (2003). PCR typing of genetic determinants for metallo- β -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5407-5413. doi: 10.1128/jcm.41.12.5407-5413.2003

Scheutz F., & Strockbine N. A. (2005). Genus *Escherichia*. In: G.M. Garrity (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*. Springer, New York, NY, USA, p. 638-655. ISBN: 9780387280226.

Schwarz, S., & Johnson, A. P. (2016). Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(8), 2066-2070. doi: 10.1093/jac/dkw274

- Skov, R. L., & Monnet, D. L. (2016). Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Eurosurveillance*, 21(9), 30155. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30155
- Sojka, W. J., & Carnaghan, R. B. A. (1961). *Escherichia coli* infection in poultry. *Research in Veterinary Science*, 2(4), 340-352. doi: 10.1016/S0034-5288(18)34938-5
- Stehling, E.G., Yano, T., Brocchi, M. & da Silveira, W.D. (2003). Characterization of a plasmid-encoded adhesin of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain isolated from a case of swollen head syndrome (SHS). *Veterinary Microbiology*, 95, 111120. doi: 10.1016/s0378-1135(03)00125-1
- Trifi, A., Abdellatif, S., Daly, F., Mahjoub, K., Nasri, R., a kol. (2016). Efficacy and toxicity of high-dose colistin in multidrug-resistant gram-negative bacilli infections: a comparative study of a matched series. *Chemotherapy*, 61(4), 190-196. doi: 10.1159/000442786
- Tzouvelekis, L. S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P. T., & Daikos, G. L. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clinical microbiology reviews*, 25(4), 682-707. doi: 10.1128/CMR.05035-11
- Walsh, T. R., & Wu, Y. (2016). China bans colistin as a feed additive for animals. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(10), 1102. doi:10.1016/S1473-3099(16)30329-2
- Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Li, J., Yin, W., a kol. (2018). Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging microbes & infections*, 7(1), 1-9. doi: 10.1038/s41426-018-0124-z
- Xavier, B. B., Lammens, C., Ruhel, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., a kol. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *EuroSurveillance Monthly*, 21(27), 30280. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280
- Yang, Y. Q., Li, Y. X., Lei, C. W., Zhang, A. Y., & Wang, H. N. (2018). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(7), 1791-1795. doi: 10.1093/jac/dky111

Yin, W., Li, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., a kol. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio*, 8(3), e00543-17. doi: 10.1128/mBio.00543-17

Zajac, M. M., Sztromwasser, P., Bortolaia, V., Leekitcharoenphon, P., Cavaco, L. M., a kol. (2019). Occurrence and characterization of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in Poland, 2011-2016. *Frontiers in microbiology*, 10, 1753. doi: 10.3389/fmicb.2019.01753

Zelendova, M., Jamborova, I., Medvecký, M., Pomorska, K., Jakubu, V., a kol. (2019). National screening of plasmid-determined colistin-resistance mediated by *mcr* genes from human isolates in the Czech Republic. 29th ECCMID Amsterdam.

Zhang, J., Chen, L., Wang, J., Yassin, A. K., Butaye, P., a kol. (2018). Molecular detection of colistin resistance genes (*mcr-1*, *mcr-2* and *mcr-3*) in nasal/oropharyngeal and anal/cloacal swabs. doi: 10.1038/s41598-018-22084-4

Zurfluh, K., Nüesch-Inderbinen, M., Klumpp, J., Poirel, L., Nordmann, P., a kol. (2017). Key features of *mcr-1*-bearing plasmids from *Escherichia coli* isolated from humans and food. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 6(1), 91. doi: 10.1186/s13756-017-0250-8

Práce vznikla za podpory projektu Ministerstva zemědělství České republiky MZE-RO0718.