

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Vývoj rezistence na antibiotika *Neisseria gonorrhoeae*
ve FN Brno

diplomová práce

Hradec Králové, 2013

Bc. Brabencová Sylva

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpal/a, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

datum

podpis

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Bc. Sylva Brabencová

Školitel: MUDr. Pavla Paterová

Konzultant: MUDr. Jana Juránková, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj rezistence na antibiotika *Neisseria gonorrhoeae* ve FN Brno

Tato diplomová práce pojednává o bakterii *Neisseria gonorrhoeae* (*N.gonorrhoeae*), původci pohlavně přenosné choroby kapavky. V první části jsou údaje o charakteristice bakterie a jejím růstu, faktorech virulence, mechanismech vzniku rezistence a možnostech diagnostiky, jak bakterie, tak její schopnosti rezistence k antibiotikům, mechanismu vzniku onemocnění, jeho průběhu a příznacích a v neposlední řadě také o možnostech léčby.

V praktické části je postup zpracování materiálu od jeho příjmu, zpracování v laboratoři, kultivaci vzorků, po biochemickou identifikaci a metody testování citlivosti na antibiotika. Statistické údaje byly získány z Oddělení klinické mikrobiologie ve Fakultní nemocnici Brno v letech 1998 – 2012. Byly zpracovány do tabulkové a grafické podoby. Výsledky zobrazují zvýšení výskytu kapavky v populaci, zejména u mužů. Byly zjištěny rozdíly v počtu onemocnění v rámci věkových skupin. Zjišťováním výskytu izolátů *N. gonorrhoeae* v jednotlivých materiálech, byl nejvyšší záchyt v uretře. Studie ukázala nárůst rezistence *N. gonorrhoeae* k různým druhům antibiotik (penicilin 50% rezistentních kmenů v roce 2012, tetracyklin 42%, ciprofloxacin 75%). Zvláště alarmující je objevení se rezistence k cefalosporinům 3. generace, které jsou v současnosti užívány k léčbě. Zvýšení počtu onemocnění a počínající vznik rezistence ke 3. generaci cefalosporinů jsou faktory významně ovlivňující úspěšnost klinické léčby. Nárůst rezistence vytváří z gonorrhoeey velmi obtížně léčitelné onemocnění proto, že dochází celosvětovému šíření rezistentních kmenů.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and medical Sciences

Candidate: Bc. Sylva Brabencová

Supervisor: MUDr. Pavla Paterová

Consultant: MUDr. Jana Juránková, Ph.D.

Title of diploma thesis: The development of antibiotic resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in University Hospital Brno

This thesis deals about the bacteria *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*), agents of sexually transmitted disease gonorrhea. In the first part there are basic characteristics of the bacteria and its growth, virulence factors, mechanisms of resistance and its diagnostic options and also its ability to develop an antibiotic resistance, pathogenesis of disease, its progress and symptoms and, ultimately, treatment options of disease.

Practical part contains a basic process of an income of clinical sample, a laboratory culture, an isolation of strains and possibilities of a biochemical identification and an antibiotic susceptibility testing. There are also the statistical informations obtained from the Department of Clinical Microbiology at the University Hospital Brno since the year 1998 to 2012. They are arranged into a tabular and graphical form, showing increased incidence of disease in the population, especially in men. They shows distribution incidence of disease across age groups and type of clinical sample. During the last 15 years the incidence of gonorrhoea increased and the antibiotic resistance of *N. gonorrhoeae* has change (penicilin has 50 % of resistance strains, tetracyklin 42 % and ciprofloxacin has 75 % in year 2012). The results are alarming because of occurring of the resistance to the third generation cephalosporins, what are nowadays antibiotics of the first choice. The increasing incidence of gonorrhoea and the increasing percentage of resistance are the main factors that may significantly affect the success of the clinical treatment. The increase in resistance makes gonorrhoea difficult to treat disease, because there is a global spread of resistant strains.

Zde bych chtěla poděkovat MUDr. Pavle Paterové a zvláště pak MUDr. Janě Juránkové, Ph.D. za odbornou pomoc při zpracování mé diplomové práce, za trpělivost při řešení problémů, trpělivé vedení, ochotu a umožnění práce v laboratoři v denním provozu.

Zadání diplomové práce - cíl práce:

Cílem mojí diplomové práce je zachytit vývoj rezistence *Neisseria gonorrhoeae* na antibiotika v letech 1998 - 2012 u pacientů vyšetřených ve FN Brno.

Hypotéza: Rezistence na antibiotika *Neisseria gonorrhoeae* má každoročně stále se zvyšující charakter.

Obsah

TEORETICKÁ ČÁST

1. Úvod.....	10
2. Rod <i>Neisseria</i>	11
2.1. Objevení neisserií.....	11
2.2. Klasifikace, výskyt a morfologie neisserií.....	11
2.3. Podmínky růstu a metabolismus neisserií.....	14
2.4. Genom neisserií.....	15
2.5. Obecná charakteristika <i>N.gonorrhoeae</i>	16
3. Faktory patogenity <i>N.gonorrhoeae</i>	17
3.1. Antigenní struktura.....	17
3.1.1. Pili.....	17
3.1.2. Póry.....	18
3.1.3. Rmp.....	19
3.1.4. OPA proteiny.....	19
3.1.5. Povrchové proteiny zapojené do získávání železa.....	21
3.1.6. Další povrchové a sekretované antigeny, polysacharidy.....	22
3.1.7. Lipopolysacharidy.....	23
3.2. Mechanismus průniku <i>N. gonorrhoeae</i> do organismu.....	24
4. Onemocnění způsobená infekcí <i>N. gonorrhoeae</i>	25
4.1. Gonorrhoea – kapavka.....	25
4.1.1. Kapavka u ženy.....	25
4.1.2. Kapavka u muže.....	27
4.2. Další onemocnění způsobená <i>N. gonorrhoeae</i>	29
5. Rezistence na antibiotika.....	30
5.1. Pojem a typy rezistence.....	30
5.2. Vznik a vývoj rezistence.....	36
5.3. Rezistence <i>N. gonorrhoeae</i>	38
5.4. Metody stanovení rezistence <i>N. gonorrhoeae</i>	40
5.4.1. Kvantitativní metoda.....	40
5.4.2. Kvalitativní metoda.....	41
5.4.3. Stanovení produkce betalaktamáz.....	41
6. Diagnostika.....	43

6.1. Odběr a transport materiálu.....	43
6.2. Barvení dle Grama.....	44
6.3. Kultivace na pevných půdách.....	45
6.4. Identifikace <i>N. gonorrhoeae</i>	47
6.5. Stanovení <i>N. gonorrhoeae</i> metodou real-time PCR.....	48
6.6. MALDI – TOF.....	51
7. Léčba.....	53
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	
8. Materiál.....	59
8.1. Zpracování klinického materiálu metodika.....	59
8.2. Identifikace kmenů.....	60
8.3. Stanovení citlivosti.....	60
8.4. Vyšetření produkce betalaktamázy pomocí nitrocefínového testu.....	61
9. Výsledky.....	62
9.1. Počet vyšetření.....	62
9.2. Rozdělení dle vykultivovaných klinických materiálů.....	63
9.3. Záchyt <i>N. gonorrhoeae</i> v jednotlivých letech.....	64
9.4. Zastoupení mužů a žen.....	66
9.5. Rezistence na ATB.....	67
9.5.1. Penicilin.....	67
9.5.2. Cefuroxim.....	68
9.5.3. Tetracyklin.....	69
9.5.4. Ciprofloxacín.....	70
9.5.5. Cefotaxim.....	71
9.5.6. Azitromycin.....	72
9.5.7. Spektinomycin.....	73
9.6. Souhrný vývoj rezistence <i>N. gonorrhoeae</i>	73
9.7. Minimální inhibiční koncentrace.....	74
9.7.1. Penicilin.....	74
9.7.2. Cefotaxim.....	75
10. Diskuze.....	76
11. Závěr.....	82
Přílohy.....	83

Seznam zkratek.....	86
Seznam elektronických zdrojů.....	90
Seznam použité literatury.....	99
Seznam zdrojů obrázků.....	101

1. Úvod

Bakterii *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) řadíme do rodu *Neisseria*, čeledi Neisseriaceae, řádu Neisseriales, třídy Beta Proteobacteria, kmene Proteobacteria a domény Bacteria. Její základní charakteristika je gram negativní diplokok (také je udáván tvar kávového zrna), nesporulující, aerobní a nepohyblivá. *N. gonorrhoeae* patří spolu s *Neisseria meningitidis* k nejvýznamějším lidským patogenům tohoto rodu. Samozřejmě existují i nepatogenní druhy, které můžeme najít jako součást přirozené flóry v dutině ústní a nosohltanu např. *Neisseria flava* aj. *N. gonorrhoeae* je ovšem obligátní patogen, dojde-li k průniku bakterie do organismu člověka, dochází ke vzniku projevů nemoci, kterou *N. gonorrhoeae* vyvolává, tedy ke vzniku pohlavně přenosné choroby kapavky nebo-li gonorrhoe. Tím se dostáváme k nejčastější cestě přenosu, kterou je sexuální přenos. Neisserie jsou velmi citlivé k okolnímu prostředí, bez vhodných kultivačních a teplotních podmínek rychle hynou.

N. gonorrhoeae, je-li podezření na infekci touto bakterií, je identifikována klasickými mikrobiologickými metodami. Základní technikou, která nás nasměruje k tomuto rodu je barvení dle Grama přímo z klinického materiálu, kterým odhalíme gram negativního diplokoka, dále pak podle tohoto nálezu zvolíme vhodné kultivační půdy a z narostlých kolonií provedeme biochemické dourčení bakterie. Také je možný průkaz bakteriální DNA ve vzorku metodou polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR). Následně stanovíme citlivost bakterie k antibiotikům, nejčastěji diskovou difúzní metodou nebo stanovením minimální inhibiční koncentrace – MIC, dle výsledku pak lékař může zvolit vhodné antibiotikum k léčbě. *N. gonorrhoeae* se však stává rezistentní k mnoha preparátům k nimž byla v minulosti citlivá, a proto se stanovením míry rezistence ve své práci detailně zabývám, neboť se jedná o závažný problém, komplikující léčbu a vyskytující se nejen v České republice, ale i v mnoha státech světa.

V praktické části práce zpracovávám vzorky pacientů, sleduji rezistenci neisserie a z výsledků vytvořím statistiku výskytu *N. gonorrhoeae* a také statistiku vývoje rezistence *N. gonorrhoeae*.

2. Rod Neisseria

2.1. Objevení neisserií

První objevenou neisserií byla díky své asociaci s nemocí *N. gonorrhoeae* a to roku 1879 lékařem Albertem Ludwigem Sigismundem Neisserem. K objevení mikroba využil mikroskopie, kde tento organismus našel v uretrálním exudátu pacientů s kapavkou spolu v velkém množství leukocytů.¹¹

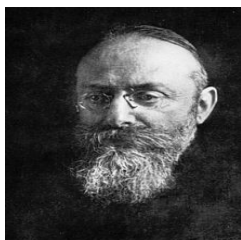
Další izolovanou neisserií byla *Neisseria meningitidis* v roce 1887 Antonem Weichselbaumem z mozkomíšního moku pacientů s akutní meningitidou.

V roce 1906 von Lingelsheim našel množství nepatogenních neisserií v materiálu z nosohltanu, jak od nemocných tak zdravých pacientů, patřily sem *Micrococcus pharynges siccus* (dnes *Neisseria sicca*), *Micrococcus cinereus* (dnes *Neisseria cinerea*), *Micrococcus pharynges flavus* skupiny I,II,III (dnes *Neisseria subflava* biovary).

Byly identifikovány také oportunní druhy a to v roce 1930 *Neisseria flavescens* Branhamem a *Neisseria lactamica* Hollisem a spol. v roce 1969. Oba druhy byly nalezeny v mozkomíšním moku a způsobují příležitostné meningitidy.

N. gonorrhoeae ssp. *kochii* byla izolována ze spojivek obyvatel egyptského venkova v roce 1986. Jako poslední byla identifikována *Neisseria weavari* roku 1993 Andersenem, dříve označovaná jako CDC skupina M-5 a byla izolována ze zranění způsobených psím kousnutím.

Mnoho neisserií a zejména ty patogenní již byly objeveny. Ovšem otázkou zůstává kolik jich je třeba ještě objevit.⁷⁵



Obr 1. Albert Ludwig Sigismund

Zdroj: 92



Obr 2. Anton Weichselbaum

Zdroj: 93

2.2. Klasifikace, výskyt a morfologie neisserií

Kmeny, patřící k rodu *neisseria* můžeme identifikovat pomocí fenotypových charakteristik na 15 různých druhů, poddruhů a biovarů u lidí a šest u zvířat. Mezi tyto fenotypové charakteristiky řadíme produkci pigmentu, tvorbu kyseliny

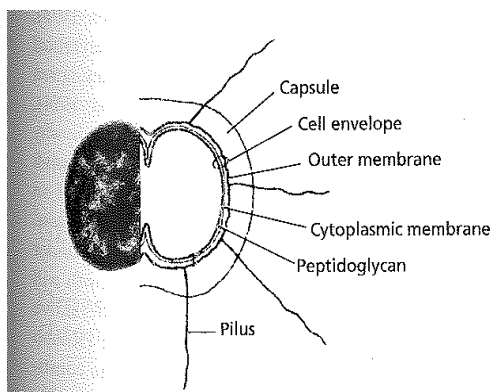
z uhlovodíků, tvorbu polysacharidů ze sukrózy a redukci dusičnanů a dusitanů.⁷¹ Hlavní lidské druhy jsou řazeny do dvou hlavních skupin. Do první skupiny patří *N. gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria polysaccharea*, *N. gonorrhoeae* ssp. *Kochii*, tato skupina roste na pevných půdách v nepigmentovaných, průsvitných koloniích. Druhá skupina zahrnuje *Neisseria mucosa*, *Neisseria sicca*, *Neisseria subflava* s biovary *subflava*, *perflava* a *flava*, a ty se označují jako sacharolytické druhy, rostoucí v opaleskujících, žlutě pigmentovaných koloniích.²³

Pomocí sekvenční analýzy 16S rRNA a DNA hybridizace bylo prokázáno, že spolu s neisseriemi se do čeledi *Neisseriaceae* mohou zařadit i rody *Eikenella*, *Simonsiella*, *Alysiella* a CDC skupiny EF-4, M-5 a M-6. CDC skupina M-5 je klasifikována jako *Neisseria weaverii* a CDC skupina M-6 jako *Neisseria elongata* ssp. *nitroreducens*. Podobná analýza 16S rRNA zase naopak z této čeledi vyloučila rody *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Kingella indologenes* a *Branhamella*. Proto byly podány návrhy na zařazení *Branhamella catarrhalis* (dříve *Neisseria catarrhalis*) do rodu *Moraxella* nebo *Branhamella*.⁷⁵

Výskyt *N. gonorrhoeae* a *Neisseria meningitidis* není u člověka běžný (nejedná-li se o probíhající onemocnění), ale mnoho nepatogenních neisserií je součástí přirozené mikroflóry horních cest dýchacích. Někdy může dojít k výskytu těchto neisserií i na jiných mukózních površích organismu a zde potom mohou být příčinou různých infekcí od meningitidy, endocarditidy, cellulitidy, osteomyelitidy, artritidy až po pneumonie. Více ohrožení jsou, samozřejmě, imunodeficitní osoby (osoby s leukémií, AIDS, aj.).⁶

Morfologicky řadíme neisserie ke gramnegativním diplokokům. Jejich morfologie se liší v závislosti na vnějším prostředí, můžeme pozorovat rozdíl mezi buňkami narostlými in vitro a těmi, které získáme přímo z infikovaného pacienta. Pozorováním tenkého úseku získaného z *N.gonorrhoeae* elektronovým mikroskopem se ukázala výrazná podobnost s ostatními gramnegativními bakteriemi. Vnější vlnitá membrána o tloušťce 7,5-8,5 nm⁷⁵ je tvořena dvojrůstvou a obsahuje lipopolysacharidy, proteiny, fosfolipidy. Oblast mezi vnější a cytoplasmatickou membránou, periplasmatický prostor a obsahuje proteiny.⁸¹ Mezi tyto proteiny patří cytochrom c, homolog elongačního faktoru Tu

a protein vázající železo. Elektronově denzní vrstva silná 6 nm odpovídá vrstvě peptidoglykanu, tvořící bakteriální obal, tato vrstva se nachází v periplazmatickém prostoru.



Obr 3. Struktura buněčné stěny *Neisseria* ssp. buněčného

a grafické znázornění struktury na základě údajů z elektronového mikroskopu Zdroj: 75



Obr 4. Elektronový snímek dělení *Neisseria* ssp.

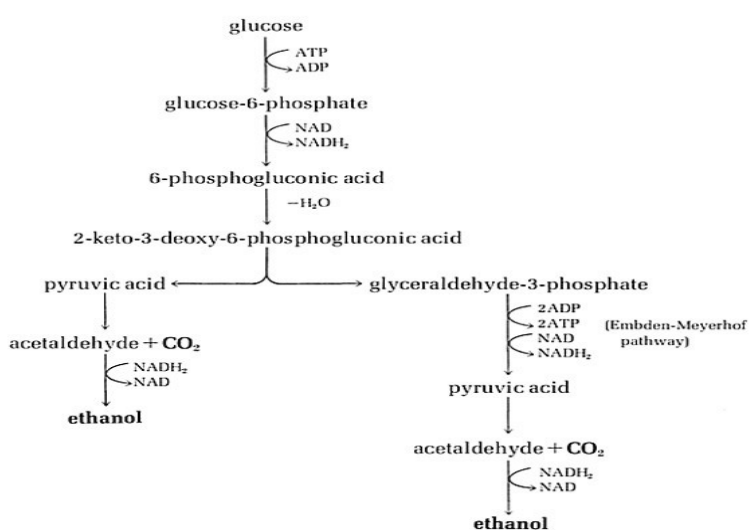
Zdroj: 75

Tato struktura buněk je podobná u všech neisserií, existují i výjimky a to *Neisseria elongata* a *weaveri*. U nich probíhá rozčlenění vnitřní struktury tvorbou sept zahájené vrstev cytoplasmatické membrány a zakončené záhyby peptidoglykanu, tedy ne konstrikcí. Septa jsou tvořena postupně a navzájem jsou k sobě postaveny v pravém úhlu, což vytváří obraz tetradové formace. Buňky nejprve, během jednoho buněčného cyklu, rostou v jedné rovině a teprve ke konci tohoto cyklu dochází k zahájení růstu v rovině druhé. Tato změna ve směru růstu umožňuje organismům zabránit vzniku tvaru kokotyčky a výkyvům ve vnitřní tlaku, který by nastal při jednorovinném růstu.⁷⁵ Za tvorbu struktury buněk a biosyntézy buněčné stěny je u gonokoků (*N.gonorrhoeae*) zodpovědný klastér genů označený *dcw*, ten obsahuje 17 genů velmi podobných genům gram negativních tyček, zejména pak *Escherichia coli* a *Haemophilus influenzae*.^{42x} Jedním z těchto genů je *ftsZ*, jehož produktem je protein s centrální úlohou ve strukturizaci buňky a tvorbě kontraktálního prstence. U kolonií v lag fázi, získaných růstem na agaru nebo v bujónu, dochází k tvorbě bublinek či dutinek v buněčné stěně, a ty obsahují součásti vnější membrány, jako lipopolysacharidy a proteiny. Bublinky produkované *N.gonorrhoeae* obsahují jak kruhovou, tak lineární DNA a mohou usnadnit mezibuněčný přenos plasmidů nebo chromosómalní DNA.⁷⁵

2.3. Podmínky růstu a metabolismus neisserií

Růstové podmínky se liší v závislosti na patogenitě neisserií. Zatímco většina nepatogenních neisserií nevyžaduje speciální nároky na kultivaci, kultivace patogenní *N. gonorrhoeae* a *N. meningitidis* vyžaduje dodržení specifických podmínek pro úspěšný nárůst kolonií. Optimální teplota pro růst neisserií je 35 – 37 °C.²³ Dalším důležitým růstovým faktorem je optimální pH. To hraje roli jak v růstu. Např. *N. gonorrhoeae* roste na médiu s glukózou v rozpětí pH 6.0-8.0 s krátkým generačním časem. Výhodná je pro růst také relativní vlhkost, ta dosahuje hodnoty až 50%.⁵⁰

Hlavní metabolickou drahou *N. gonorrhoeae* a *N. meningitidis* je Entner-Doudoroff v kombinaci s pentóza fosfátovým cyklem, při které dochází k disimilaci glukózy na glycerinaldehyd-3-fosfát, ten je přeměněn na glukóza-6-fosfát až je nakonec uvolněn oxid uhličitý a acetát. Glukóza-6-fosfát dehydrogenázy používají nikotinamidadeninukleotidfosfáty nebo nikotinamidadeninukleotidy jako akceptor elektronů. Nahromaděný acetát je utilizován pomocí cyklu trikarboxylových kyselin.³²



Obr 5. Metabolická dráha Entner – Doudoroff, zdroj: 94

Všechny druhy neisserií obsahují enzym karboanhydrázu a zvýšený obsah oxidu uhličitého je podmínkou pro růst *N. gonorrhoeae*. Zvýšenou koncentraci oxidu uhličitého můžeme nahradit přidáním uhličitánových iontů, protože jak oxid uhličitý, tak uhličitany zlepšují růst Neisserií zkrácením lag fáze. Byly provedeny studie používající uhličitany značené ¹⁴C a které odhalily, že

majoritní část uhličitánů je použita na tvorbu nukleových kyselin a proteinů během lag fáze. Tento výsledek byl očekáván, protože požadavek na oxid uhličitý může být částečně splněn přidáním uracilu a oxalacetátu. Uracil je totiž přímým prekurzorem vzniku RNA a následně může být použit jako prekursor pyrimidinů nebo proteinů.⁷⁵

2.4. Genom neisserií

Jako první byly zcela sekvenovány genomy *N. meningitidis* kmenů MC58-skupina A a *N. gonorrhoeae* kmene FA1090. Složení kódujících genů u patogenních neisserií je téměř z 90% homologní. Například *N. meningitidis* obsahuje okolo 2158 kódujících regionů, z toho 1158 má biologickou funkci. Má 3 hlavní ostrovy horizontálním DNA transferu, dva obsahují geny pro proteiny zapojené do patogenity a jeden obsahuje geny pro proteiny, které zatím neznáme. Také obsahuje mnoho genů podléhajících fázové variaci, mechanismus pro kontrolu exprese a přispívá k vyhnutí se imunitnímu systému hostitele.⁶⁵ U *N. gonorrhoeae* je to podobné, případné rozdíly jak v genomice, tak v proteomice vycházejí z rozdílů prostředí, ve kterém žijí a jejich patofyziologii.

Chromozom neisserií je kruhovitá molekula dvouvláknové DNA, krom této molekuly existují i extrachromozomální úseky zvané plazmidy, jsou uloženy v cytoplasmě a množí se autonomně.⁸⁹

Jedním z mechanismů antigenní diverzity je fázová variace, která dává vzniknout velkému repertoáru fenotypů a usnadňuje přežití v měnících se prostředích. Delece nebo inserce, opakující se sekvence ve čtecím rámci naruší translační čtecí rámec a výsledkem je nesmyslný protein. Genomová sekvenční analýza odhalila více než 100 genů s těmito opakováními, což naznačuje, že až 16 % neisseriálních genů podléhá fázové variaci. Změny v délce repetice v promotoru změny pozici promotorových komponent a mohou tím ovlivnit transkripci daného proteinu. Antigenní diverzita může také probíhat jiným mechanismem a to horizontálním genovým přenosem. Dochází k přenosu genetické informace mezi kmeny Neisserií zprostředkovaných mechanismy transformace, konjugace a méně transdukce, takto mohou být získány výhody jako rezistence k ATB nebo antigenní mozaicismus.⁷⁵

2.5. Obecná charakteristika *N.gonorrhoeae*

N. gonorrhoeae je gram negativní diplokok, tvaru kávového zrna, nepohyblivý, aerobní a netvořící pouzdra. Tato bakterie je velmi citlivá na vnější podmínky, bez vhodných podmínek, které jí poskytuje hostitel, nepřežívá. Proto je i kultivace bakterie náročná a vyžaduje přesné dodržení stanovených podmínek.⁸⁹ Přenáší se pohlavním, análním stykem, stejně tak je možný přenos stykem orálním, případně při porodu z matky na dítě.²⁸ Po přenosu do organismu uplatňuje své adhezenční a invazivní mechanismy a napadá buňky příslušného traktu, proniká do nich, množí se a způsobuje zánětlivou reakci organismu s tvorbou vazkého exudátu, ve kterém pak gonokoky nalézáme. Tento exudát je velmi infekční a není-li onemocnění rozpoznáno včas a včas zahájena léčba, dochází k dalšímu šíření infekce mezi hostiteli. Léčba je další důležitý faktor ve výskytu tohoto onemocnění. V posledních letech narůstá rezistence gonokoků ke stále většímu počtu antibiotik a léčba se tak stává, vzhledem k nutnosti velmi pečlivě vybírat antibiotika, poměrně obtížnou.

3. Faktory patogenity *N. gonorrhoeae*

3.1. Antigenní struktura

Buněčná stavba *N.gonorrhoeae*, podobně jako u ostatních gram negativních bakterií, je složena z cytoplasmatické membrány oddělené od vnější membrány periplasmatickým prostorem. Externí list vnější membrány je strategicky umístěn na rozhraní mezi hostitelem a bakterií a právě molekuly asociované s tímto povrchem jsou zdrojem patologie u hostitele nebo představují cíle imunitní odpovědi hostitele. Externí list je složen ze směsi fosfolipidů, proteinů a lipopolysacharidů.

3.1.1. Pili

Pili (fimbrie) jsou vláknité proteiny podobné vlasům, složené z opakujících se peptidových podjednotek, které sahají několik mikrometrů nad povrch bakteriální stěny. Zjistilo se, že pili jsou zapojeny do mnoha různých funkcí, jako přenos DNA, intrabakteriální adheze, pohyb bakterií, přichycení bakterie k hostitelské buňce, aj. „Vazba pilů je významná především v uretře: ať postižená osoba močí, jakým tlakem chce, gonokok se udrží, na rozdíl od jiných bakterií.“(Votava a kol., 2003) ⁸⁹

Kellog s kolegy v roce 1963 zjistil, že klinický materiál čerstvě vykultivovaný na pevných médiích může růst ve dvou odlišných morfologických typech kolonií, ty označil jako T₁ a T₂, dnes jsou označovány jako P+. Na základě nespecifické pasáže in vitro se objevily další dva typy kolonií, ty označil T3 a T4, dnes P-. Gonokoky exprimují typ 4 definovaný řízenou sestavou opakujících se podjednotek polypeptidu zvaného pilin a kódovaného lokusem *pilE*. Pilinový prekurzor je modifikován pomocí PilD prepilin peptidázy/transmetylázy. Výsledkem je zralá podjednotka pilinu s metylovaným fenylalaninovým zbytkem na N-konci.⁷⁵

Protein značený PilQ byl objeven jako jeden z mnoha proteinových produktů spojených s funkcí a biogenezí pilů. Předpokládá se, že jeho funkcí je vytvoření multimerního kanálu vnější membrány, také váže DNA pro její přenos přes vnější membránu, lépe váže ssDNA než dsDNA.³⁶

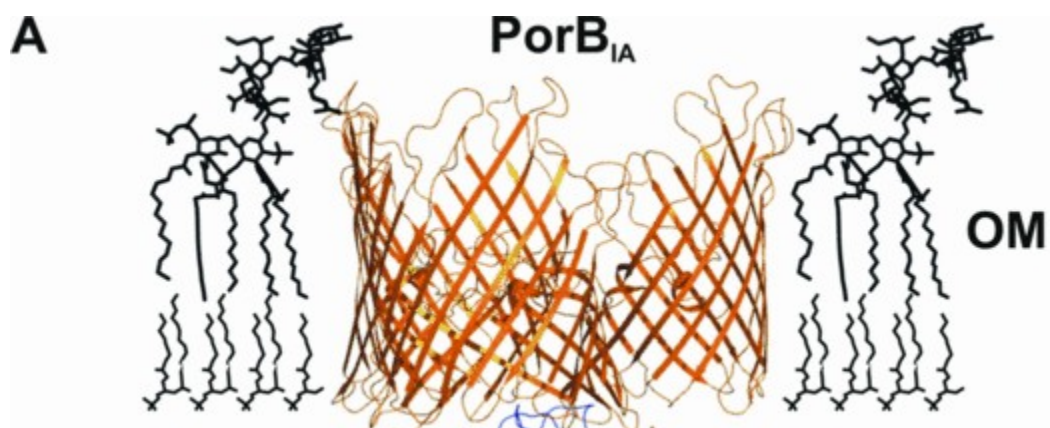
Genem odpovědným za fázovou variaci, tedy změnu v pokynu k vytvoření či nevytvoření pilů je gen *pilE*.⁷⁵ Antigenní variace pomocí *pilE* probíhá po rekombinaci exprimovaného lokusu pro *pilE* s jedním nebo více tichými lokusy

pilS. Dojde-li k rekombinaci s kopií genu pilS, probíhá DNA výměna tak, že se různé pilové genové segmenty převádějí za přispění RecA proteinu z pilS na pilE.⁴³ Jedním z důvodů, proč nemusí na gonokoky působit protilátky je jejich schopnost genové konverze, čili v případě napadení vytvoří jiný serotyp pilů.⁸⁹

3.1.2. Póry

Vnější membrána gonokoků obsahuje integrální membránové proteiny tvořící póry. Funkce pórů je nezbytná pro přežití, přenos živin přes vnější membránu do buňky a odstranění odpadních produktů z buňky.⁸⁹ Proteiny společně tvoří kanál, který propouští malé molekuly skrz vnější membránu. Jsou schopny se přemístit do eukaryotické buněčné membrány a vytvořit napěťově řízený kanál modulovaný pomocí ATP a GTP hostitelské buňky.⁴¹

N. gonorrhoeae má ve svém genomu dva geny kódující tvorbu pórů, jsou to geny *porA* a *porB*. U gonokoků dochází k mutaci v promotoru a k rámcovému posunu v oblasti kódující gen *porA*, tento lokus je tedy u *N. gonorrhoeae* tichý. Gonokok tak produkuje jen protein Por B, došlo-li by k delecím v *porB* bude to mít pro bakterii letální následky. PorB tvoří trimerní komplex ve vnější membráně. Podle odhadu tvoří PorB až 60% váhy z celé škály proteinů vnější membrány gonokoků. Velikost vytvořeného póru je 2.5 nm a bylo prokázáno, že jde o anion selektivní kanál nezbytný pro difuzi rozpuštěných látek s molekulární hmotností menší než 1 kDa do periplasmatického prostoru a difuzi malých hydrofóbních molekul ven z periplasmy.⁷⁵



Obr. 6 Struktura PorB *N. gonorrhoeae*, zdroj: 97

Póry se také mohou podílet na apoptóze iniciované influxem vápníku. Tento fakt byl prokázán infikováním HeLa buněk gonokoky. Póry se translokovaly do membrány mitochondrií a po influxu vápníku dojde zahájení kalpainové

a kaspázové aktivity. Ovšem na buňkách mužského uretrálního epitelu k tomu nedochází, předpokládá se, že je to proto, že přežívají-li uretrální buňky umožňují gonokokům proliferovat v ochranném prostředí a tak zároveň podporují gonokokovou kolonizaci.⁴¹

Protein PorB také hraje roli při vzniku vlastního onemocnění způsobené *N. gonorrhoeae*. PoB výrazně přispívá k přežití gonokoků v hostitelských buňkách. Že je PorB faktorem virulence napovídá i epidemiologická pozorování, svědčící o silném vztahu některých variantních forem s diseminovanou gonokokovou infekcí (např. PorBIA). Translokují-li se PorB do membrány hostitelské buňky ovlivňuje aktivitu polymorfonukleárů, iniciuje změny membránového potenciálu, inhibici granulí a inhibici polymerace aktinu.⁵¹

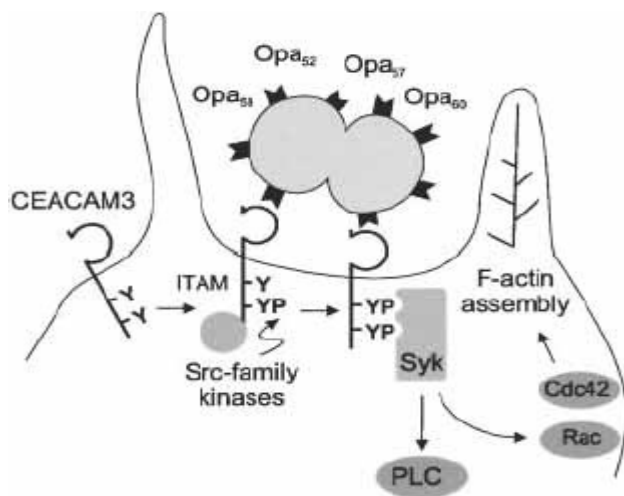
3.1.3. Rmp

Rmp je vysoce zakonzervovaný povrchově exponovaný protein vnější membrány, exprimovaný patogenními neisseriemi. Rmp má molekulovou hmotnost okolo 31 kDa. U *N. meningitidis* je to proteinová třída 4. Genom *N. gonorrhoeae* obsahuje jednu kopii tohoto genu. Tento protein není esenciální pro buněčný růst. Rmp nepodléhá antigenní variaci.⁷⁵ Některé blokuující protilátky se váží na povrchové oblasti Rmp⁵⁴ a interferují s baktericidními účinky protilátek namířených proti jiným povrchovým antigenům jako protein PorB nebo lipopolysacharidy. Protilátky proti Rmp korelují se vzrůstající vnímavostí ke gonokokové infekci. Tyto protilátky můžeme nacházet v séru nebo vaginálním sekretu pacientů zotavujících se z kapavky, ačkoli je Rmp obecně méně imunogenní než jiné povrchově exponované gonokokové antigeny.⁵⁷

3.1.4. OPA proteiny

OPA proteiny jsou skupina povrchově exponovaných proteinů (dříve proteiny II) spojených s neprůhledností kolonií. Pojmenování vychází z pozorování gonokokových kolonií, kultivovaných na průhledných médiích a pozorovaných stereomikroskopem. Neprůhlednost je výsledkem interakce mezi OPA a LOS, sousedících bakterií.⁴¹ Více OPA proteinů se nachází u *N. gonorrhoeae*, která má 12 i více genů pro tyto proteiny ve svém genomu. OPA zahrnuje rodinu povrchově exponovaných proteinů vnější membrány s podjednotkami

o molekulové hmotnosti mezi 24 a 30 kDa.⁷⁵ OPA dělíme do dvou tříd podle schopnosti rozpoznat molekuly na povrchu hostitelské buňky a to na OPA 50 (rozeznávají heparan sulfát proteoglykany - HSPG) a OPA 52 (rozpoznávají karcioembryonální antigen – CEA). Vazba na HSPG receptory zprostředkovaná OPA proteiny (umocněná přemostěním vitronektinem či fibronektinem) způsobí stimulaci intracelulární signální dráhy a aktivaci sfingomyelináz s výsledným uvolněním ceramidu.⁴¹ „OPA zodpovídá za endocytózu, která vede ke smrti hostitelské buňky. Využívá se přitom změny jejího cytoskeletu.“(Votava a kol, 2003).

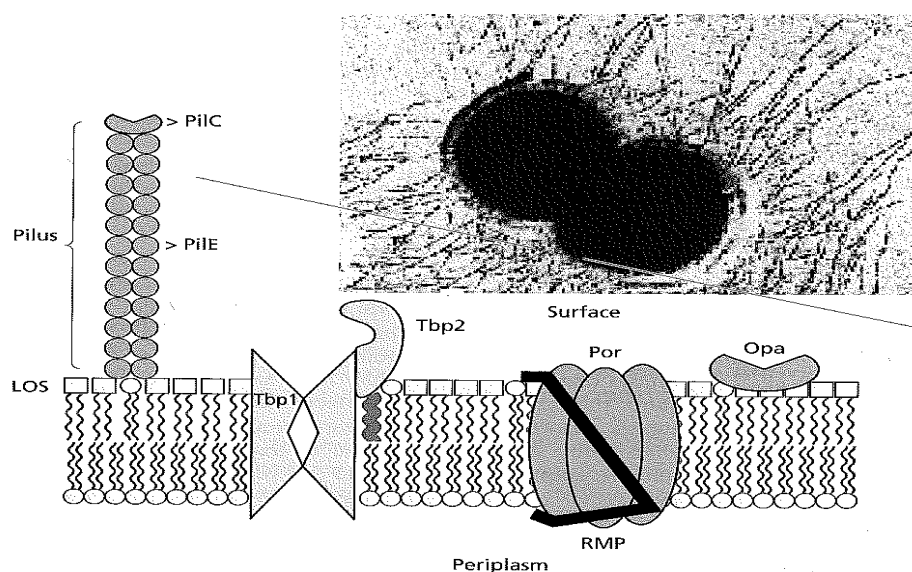


Obr. 7. Úloha CEACAM při spuštění signální dráhy, zdroj: 98

Druhým cílem OPA proteinů je CEACAM. Tyto povrchové buněčné antigeny jsou zastupovány četnými isoformami, přičemž každá má různou expresi na různých epiteliálních buňkách.⁴¹ Stejně jako v případě vazby na HSPG receptory i vazba na receptorovou rodinu CEACAM způsobí aktivaci intracelulární signální dráhy s aktivací sfingomyelináz, protein – tyrosin kináz a cytoskeletální přestavbou. Novější studie ukázaly, že vazbou gonokokových OPA proteinů na receptory CEACAM1, které se nachází na T-lymfocytech (CD4+), a na CEACAM3, které jsou na B lymfocytech a neutrofilech, může dojít k potlačení imunitní odpovědi hostitele. Aminokyselinové sekvence OPA obsahují konzervativní, semivariabilní oblast blízko N-konce molekuly a dvě hypervariabilní oblasti, které se výrazně liší v sekvenci aminokyselin a délce. Obě hypervariabilní oblasti přispívají k antigenním a funkčním vlastnostem OPA proteinů. Exprese OPA je variabilní a silně koreluje s klinickou manifestací kapavky. U žen se zánětem endocervixu je znovuobjevení neprůhledných

variant kolonií maximální v polovině cyklu. U mužů jsou neprůhledné varianty kolonií asociované s nekomplikovanou uretritidou, faryngitidou a proktitidou. Na druhou stranu transparentní kolonie jsou asociovány s diseminovanou gonokokovou infekcí, s zánětlivou nemocí pánve a endocervicitidou během menstruace.⁷⁵

Protilátky proti OPA proteinům jsou tvořeny jako odpověď hostitele na infekci gonokoky. Využívána je odpověď jak pomocí slizničních IgA, tak pomocí sérové hladiny IgG, přičemž převládá IgG3. Odpověď proti OPA proteinům je velmi silná.³³ Bylo prokázáno, že protilátky proti OPA snižují riziko vzniku salpingitidy, tyto protilátky se tedy jeví jako ochranné před vznikem vzestupné infekce.⁵⁸



Obr 8. Elektronový snímek – produkce pilů, diagram – různé povrchové proteiny, zdroj: 75

3.1.5. Povrchové proteiny zapojené do získávání železa

Mnoho studií se zaměřilo na vliv železa na molekulové složení gonokoků. Lidský hostitel disponuje malým množstvím volného železa, ale většina je zabudována do laktoferinu a transferinu. Železo ve formě hemu se zase může vázat na proteiny jako hemoglobin, hemopexin nebo haptoglobin, a tyto hostitelské proteiny jsou potenciálním zdrojem železa nezbytného pro růst patogenů. Klíčovým požadavkem pro vyvolání infekce daným patogenem je jeho schopnost vychytat toto železo v hostitelském prostředí a inkorporovat jej do svých proteinů. Mnoho patogenů disponuje rozpustnými nízkomolekulárními siderofory, které soupeří o tento zdroj železa nebo mají přímo proteinové receptory vážící extracelulární proteiny jako transferin a laktoferin.⁶¹

Bylo zjištěno, že se vazebný receptorový komplex lidského transferinu nachází na povrchu patogenních neisserií. Všechny kmeny *N. gonorrhoeae* izolované od infikovaných pacientů jsou schopny využít železo z lidského transferinu, některé podjednotky gonokokových kmenů jsou schopny využít železo i z laktoferinu a hemoglobinu. Klíčem k tomuto procesu je exprese specifických receptorů, které váží lidský transferin, laktoferin nebo hemoglobin k bakteriálnímu povrchu.⁷⁵ Jedním z dalších zdrojů železa je receptor vnější membrány, který nese označení FrpB. Běžnou vlastností patogenních neisserií je využití endogenního hostitelského zdroje železa jako laktoferinu, transferinu, hemoglobinu, hemu, hemopexinu nebo sideroforů. Siderofory nejsou produkovány patogenními neisseriemi, ale jsou produkovány bakteriemi v prostředí slizničního povrchu. Jejich přijetím přes sideroforové receptory získá neisserie železo.

Transferinový receptor *N. gonorrhoeae* je tvořen dvěma proteiny, značenými TbpA a TbpB. Gonokokový transferinový receptor exprimovaný na povrchu je nezbytný pro získání železa a je exprimován po celou dobu trvání infekce. Receptory pro získávání železa z laktoferinu jsou označeny LbpA a LbpB. Jsou na povrchu sliznic a jsou preferovaným zdrojem železa. Zásobu železa z hemu a hemoglobinu získávají neisserie pomocí receptoru HmbR. Receptory získávající železo z hemoglobinu a komplexu hemoglobin-hemopexin jsou HpuA a HpuB.⁶¹

3.1.6. Další povrchové a sekretované proteinové antigeny, polysacharidy

Hlavním proteinem, který je indukován v anaerobním prostředí je povrchově exponovaný protein označený PanI, o molekulové hmotnosti 54 kDa.³⁰ Novější studie odhalily, že ribosomální protein L12 je vystaven na povrchu *N. gonorrhoeae* a je zapojen do invaze buněk ženského genitálního traktu a to tak, že exprimuje lutropinový receptor. Mnoho proteinů vnější membrány může být popsáno u obou patogenních neisserií. Mohou to být např. H8 (lipoprotein s neznámou funkcí), Laz (lipid spojený s azurinem) a glykolipidy vážící adheziny o molekulové hmotnosti 36 kDa.⁷⁵

Neisseriální IgA1 proteáza je aktivně sekretována živými *N. gonorrhoeae*. IgA1 proteáza napadá klíčovou oblast IgA. IgA je imunoglobulin přítomný na sliznicích ve dvou odlišných třídách. IgA1 a IgA2, které se od sebe liší v cílové

oblasti. IgA1 má duplikovanou oktamerní aminokyselinovou sekvenci, zatímco IgA2 ji nemá.³¹ IgA proteáza se tvoří jako prekurzor a je upravena na konečný enzym s molekulovou hmotností 106 000. Tento proces probíhá po průchodu celého prekurzorů přes vnější membránu za přispění pomocné oblasti, od které se proteolyticky odštěpí proteáza, která dále vyzává.⁵⁹ Funkční proteáza štěpí IgA1 na sliznicích urogenitálního traktu, a tak napomáhá rozvoji infekce gonokoků.

Několik neisseriálních kmenů syntetizuje polysacharidové pouzdro a exopolysacharidy. *N. gonorrhoeae* chybí konvenční polysacharidové pouzdro. Morfologické důkazy ukazují, že gonokoků mohou exprimovat nekonvenční pouzdro tvořené polyfosfátem.⁷⁵

3.1.7. Lipopolysacharidy

Lipopolysacharidy jsou hlavní glykolipidovou složkou vnější membrány gram negativních bakterií. Gonokokové a meningokokové LPS homology jsou označovány jako LOS. Oligosacharidová složka gonokokových a meningokokových LOS obsahuje relativně krátké větvené glykany, chybí O – antigen tvořící postranní řetězec.³⁵

Některé LOS slouží jako akceptor pro sialovou kyselinu. Sialylace LOS vyžaduje sialyltransferázu a substrát hostitele CMP-NANA, který se nachází ve všech lidských tkáních ve vysoké koncentraci. Gonokoková získaná rezistence k běžné sérové antiinfekční aktivitě po vystavení bakterie krvi či sekretům, je připsána sialylaci některých druhů 4,2 kDa LOS, zároveň sialylace narušuje vstup do buněčných linií řízený OPA proteiny. Předpokládá se, že antigenní variace umožňuje gonokokům přepínat mezi invazivním a sérum rezistentním fenotypem.⁴¹ Sialylace je výraznější během růstu v prostředí s laktátem ve srovnání s růstem v prostředí glukózy. To může být usnadněno generováním laktátu z granulocytů, které tvoří při kapavce exudát a mohou vysvětlit proč jsou organismy získané stěrem z uretrálního exudátu vysoce sialylované.⁷⁵

LOS obsahují hlavní antigenní determinantu rozpoznávanou přirozenými baktericidními protilátkami třídy IgM, které v kombinaci s komplementem zprostředkují eliminaci sérum senzitivních kmenů. LOS často slouží jako cílové antigeny pro baktericidní protilátky přítomné v séru zdravých lidí

či rekonvalescentů.³⁹ LOS podporují poškození mukózy a mohou být zodpovědné za ztrátu řasinkové aktivity a zničení řasinek epiteliálních buněk způsobené zánětlivými cytokiny, TNF- α (tumor necrosis factor alfa). To, jak se zjistilo, významně přispívá k rozvoji gonokokové salpingitidy a může dojít až k neplodnosti a mimoděložnímu těhotenství.

Tzv. molekulární mimikry neisseriálních LOS (napodobení předchůdce lidských antigenů krevních skupin) s hostitelskou buňkou může přinést mnoho výhod pro vypuknutí infekce. Nejčastější mimikry: LOS mohou připomínat vlastní antigeny hostitele (glykosfingolipidy) a snižovat jejich imunogenicitu.⁴⁹

3.2. Mechanismus průniku *N. gonorrhoeae* do organismu

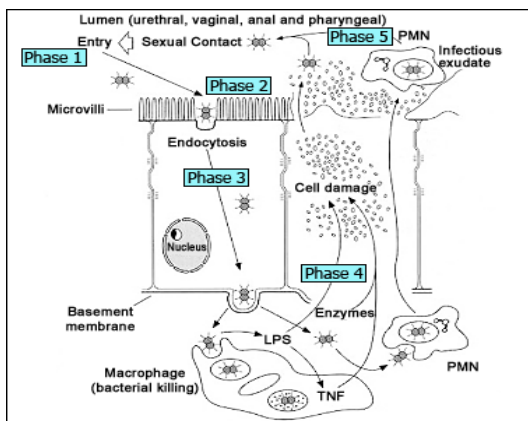
Mechanismus vzniku onemocnění je založen na změnách, které vyvolá přítomnost póru značeného PorB. Tento pór je zapojen do specifické odpovědi hostitelských epiteliálních a fagocytárních buněk. PorB interferuje s degranulací neutrofilů, to může hrát roli v řízení zánětlivé odpovědi na gonokokovou infekci. Při spojení tohoto póru s monocyty dochází k influxu vápenatých iontů, to souvisí s faktem, že aktivace makrofágů a granulocytů začíná hyperpolarizací jejich plasmatických membrán. Po proniknutí gonokoků do makrofágů nedojde ke splynutí fagozomového a lysozomového granula, protože je v membráně vložen PorB, který tomu brání.⁷

4. Onemocnění způsobená infekcí *N. gonorrhoeae*

4.1. Gonorrhoea – kapavka

4.1.1. Kapavka u ženy

Toto onemocnění je způsobeno přenosem původce *N. gonorrhoeae* cestou pohlavního, orálního, análního styku a přenesením z matky na dítě. Je vytvořeno kombinací řeckých slov goné – semeno a rhoia – tok. Při styku se původce dostává do organismu zdravého jedince, přichytí se pomocí svých antigenních struktur na povrch buněk vrstevnatého dlaždicového epitelu urogenitálního traktu, sliznice dutiny ústní, ánu nebo membrány buněk placenty. Pomocí porů spustí mechanismus průniku do buněk, kde získává živiny z buňky a množí se. Tímto krokem dochází k aktivaci zánětlivé odpovědi organismu. Vyplaví se cytokiny a dojde k migraci neutrofilů do místa invaze. Nahromadění neutrofilů nakonec vede k tvorbě hnisavého výtoku.



Obr. 9. Molekulární mechanismus průniku *N. gonorrhoeae* do buněk, zdroj: 96

Projevy většinou nacházíme při infekci vyšších etáží ženského genitálu, u infekce nižších etáží a uretry se příznaky nemusí projevit. Na rozdíl od mužů až 80 % žen má asymptomatický průběh infekce. Gonokoky jsou schopny rozvrátit alternativní cestu aktivace komplementu. Při této cestě aktivace jsou komplementové složky produkovány a uvolněny cervikálním epitelem. Gonokokové pili se váží na I-doménu komplementového receptoru 3. Dojde k přiblížení gonokoka k buňkám cervixu, C3b vytvoří kovalentní spojení s lipidem A (součást gonokokových LOS) a je inaktivována na iC3b. Umocnit inaktivaci

může výrazná afinita póru k faktoru H. Přiblíží se póry a LOS vnější membrány, mezi iC3b a pórem s navázanou I-doménou CR3 dojde ke spojení. Zapojení CR3 spustí kompletní signální kaskádu. Vylučovaná fosfolipáza D upravuje signál cervikálních buněk k transdukci. Mutanti, postrádající funkční fosfolipázu D zároveň postrádají i schopnost asociovat s buňkami cervixu. Sialylované gonokoky jsou nakonec uvolněny z cervikálních buněk a mohou napadat další buňky.⁴¹

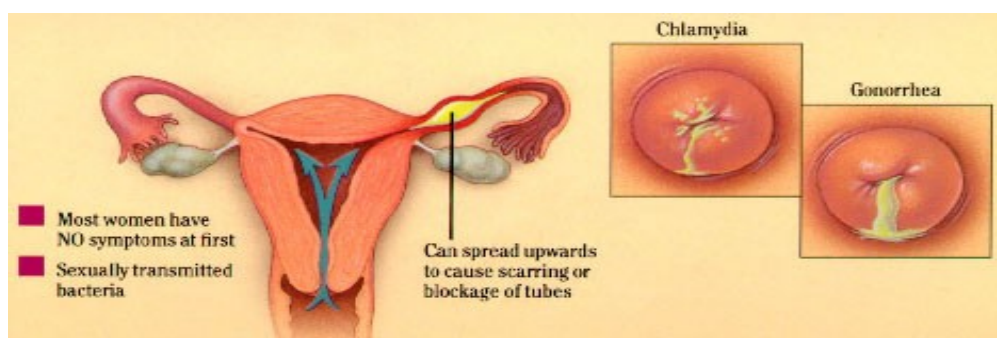
Velká část žen má při infekci gonokoky komplikace v podobě zánětlivého onemocnění pánve (PID). Gonokoky napadají buňky vejcovodů (bez řasinek), vaječnicků, dělohy a jiných částí reprodukčního systému. Hlavní bariérou přestupu infekce z pochvy do dělohy je děložní čípek, je-li jeho epitel napaden gonokoky, jeho bariérová schopnost se oslabuje a gonokoky se šíří do vyšších etází. Intracelulárně pak mohou být sialylovány, a to zvyšuje jejich schopnost vyvolat diseminovanou infekci.²⁹ Mohou způsobit infekci endometria, krvácení ukazuje na endometritis gonorrhoea, akutní a vážné onemocnění představuje salpingitis gonorrhoea provázené nevolností meteorismem, bolestmi břicha, febrilií a leukocytózou. Pokračuje-li infekce výše, může dojít k rozvoji perihepatitis acuta gonorrhoea, ta se projevuje bolestmi v pravé horní části břicha, horší se při dýchání, pohybu, kašli.

Infekce při graviditě probíhá stejně jako infekce uretry a cervixu, je zde ovšem riziko komplikací jako ruptura plodových blan, předčasný porod či potrat, chorioamnionitida. Musí být zahájena včasná léčba, jinak dochází k rozvoji ophtalmia neonatorum a orofaryngeální infekce. Ophtalmia neonatorum vzniká u dětí až 50 % infikovaných žen, první projevy jsou do několika hodin a do 5 dní vznikají příznaky akutní konjunktivitidy jako tuhost víček, hnisavý sekret, bolestivost očí, není-li zahájena léčba může dojít i k ulceracím rohovky, vzniku glaukomu až oslepnutí.

Infekce může probíhat i u prepubertálních dívek, jejichž alkalické pH vagíny vytváří ideální prostředí pro rozvoj vulvovaginitis gonorrhoea infantum s hnisavým fluorem, svěděním a dysurií, ale může probíhat i asymptomaticky.³⁹

Symptomy u žen:

1	poševní výtok
2	pálení a bolest při močení
3	zvýšená frekvence močení
4	bolest v krku při faryngeální formě kapavky
5	bolest při pohlavním styku
6	při rozšíření na vejcovody a oblast žaludku – bolest v dolní části břicha
7	horečka – opět při rozšíření na vejcovody a oblast žaludku



Obr 10. Kapavka u ženy, zdroj: 95

4.1.2. Kapavka u muže

Invaze mužského uretrálního epitelu je zprostředkována interakcí mezi terminální galaktózou LOS a terminální lakto-N-neotetralózou asialoglykoproteinového receptoru (LNnT ASGP-R). U mužů se infekce nejčastěji projevuje jako akutní uretritida přední nebo zadní stěny uretry – urethritis gonorrhoeica anterior nebo posterior, přesto, že dochází k zánětlivé odpovědi na infikující gonokoky, může infekce probíhat i asymptomaticky. Infekci u muže provází hnisavý výtok, který je způsoben influxem polymorfonukleárních buněk (PMN) a vylučováním uretrálních buněk. Od nákazy po první příznaky probíhá inkubační doba. Z toho vyplývá, že gonokoky jsou schopné zahájit proces, který je na počátku onemocnění chrání a mohou tak přežít a replikovat se. K blízkému spojení dochází mezi

gonokoky a uretrální buněčnou membránou tzv. zipovým mechanismem invaze. ASGP-R je přijat do uretrálního buněčného povrchu a spojení ASGP-R s gonokokovými LOS spouští buněčnou odpověď vedoucí k aktivaci transkripčních faktorů a produkci zánětlivých cytokinů IL-6, IL-8 a TNF- α IL-1 β . Tyto působky přitahují do místa infekce PMN a zahajují tak zánětlivou reakci. Interakci gonokoků a PMN zprostředkovávají OPA proteiny. Podobnou roli při adhezi a internalizaci mohou mít i receptory CEACAM, FC γ , HSPG a integrinové receptory na povrchu PMN. Spojení OPA a CEACAM by tedy mělo relativně zvyšovat přežití gonokoků v buňkách. OPA také podporují intracelulární přežití sekvestrací pyruvát kinázy pro získání pyruvátu jako živiny. Infekčnost gonokoků je obnovena, je-li sialová kyselina odstraněna neuraminidázou. Ta je přítomna na profesionálních fagocytujících buňkách, kterých je v močové trubici při infekci velké množství a spolu s ASGP-R i na spermích. Sialylované gonokoky jsou pak desialylovány.⁴¹

Stejně jako u žen může u mužů dojít k vzestupné infekci, projevující se jako akutní prostatitida nebo epididymitida.

Akutní prostatitida je doprovázena třesavkou, teplotou, retencí moče, bolestmi při vyšetření a zduřením. Při retenci sekretu se může vytvořit absces.

Epididymitida je častější, projevuje se bolestmi ve slabinách a silnými bolestmi scrota, které je na pohmat oteklé a zduřelé nejprve v oblasti dolního pólu a pak v oblasti horního pólu u cauda epididymis. Může vést k oligospermii, při postižení obou k azoospermii.

Symptomy u muže:

1	pálení a bolest při močení
2	zvýšená nálehavost nebo četnost močení
3	výtok z penisu (žlutý, zelený nebo bílý)
4	červené nebo oteklé ústí močové trubice
5	citlivá nebo oteklá varlata

Příznaky mohou být mírné až nespecifické, dostane-li se infekce do krevního řečiště objevují se příznaky jako horečka, vyrážka a potíže podobné artritidě.¹⁸



Obr. 11. Kapavčitý výtok u muže, zdroj: 95

4.2. Další onemocnění způsobená *N. gonorrhoeae*

Další druhy kapavky jsou rektální a faryngeální kapavka a kapavčitá konjunktivitida a DGI – diseminovaná kapavčitá infekce.

Rektální kapavka je často důsledkem sekundární infekce při kontaminaci genitálním sekretem, ke vzniku také dochází análním stykem u žen z 5 % a u mužů až ze 40 %. Potíže jako anální pruritus, proktitida, hemoroidální potíže, obstrukce se objevují spíše u mužů, u žen je rektální infekce převážně asymptomatická.

Faryngeální kapavka bývá nejčastěji spojena s urogenitální a to u 8 – 22 % žen, 11 – 25 % homosexuálních mužů a 3 – 7 % mužů. Onemocnění je téměř vždy asymptomatické, provádíme stěry ze zadní stěny hltanu a tonzil.

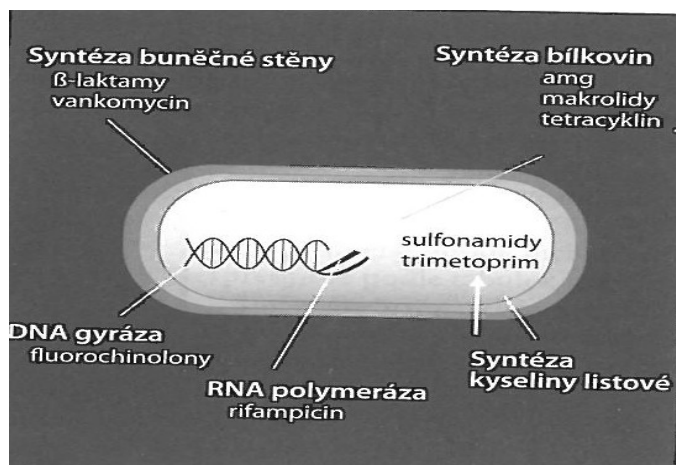
Konjunktivitida dospělých vzniká autopřenosem z urogenitálního traktu. Většinou bývá postiženo jedno oko, které slzí, pálí, svědí a je světloplaché, mohou nastat i komplikace, častěji než u dětí.

Ojedinele se může vyskytnout DGI a to častěji u žen. Projevuje se nárazovou febrilií, kožními projevy a polyartritidou. Dochází k bolestem kloubů a tendosynovitidám, pak se mohou rozvinout příznaky artritidy. Až u ¾ pacientů nacházíme projevy na kůži vypadající jako poštipání od blechy, febrilii a leukocytózu. Někdy se tato infekce můž projevit pouze jako monoartritida s postižením jednoho velkého kloubu, nejčastěji kolene. Kloub je na pohmat teplý, oteklý a bolestivý, naplněný exudátem a lze prokázat přímé osídlení gonokoky.³⁹

5. Rezistence na antibiotika

5.1. Pojem a typy rezistence

Rezistence na antibiotika je schopnost bakterií chránit se před účinkem podaných antibiotik na jejich růst a přežití. Mechanismů, kterými působí antibiotika je více a každé má svoji cílovou strukturu. Některé, jako betalaktamy, působí na syntézu buněčné stěny tak, že zablokují peptidoglykan a tím dojde k lýze bakterie. Makrolidy, tetracykliny, aminoglykosidy aj. působí na syntézu proteinů interferencí s m-RNA nebo t-RNA. Syntézu nukleových kyselin vazbou na topoizomerázu a gyrázu působí chinolony a fluorochinolony. Další cílovou strukturou je dráha syntézy folátu, a to zablokováním enzymů důležitých k její syntéze substráty, které kompetují s přirozenými substráty, takto působí sulfometoxazol a trimetoprim. Nakonec ovlivněním transkripce DNA do RNA působí Rifampin.⁷⁹



Obr 12. Vybrané cílové struktury na něž působí antibiotika, zdroj: 85

Rezistence může být přirozená, chromozomální nebo kódovaná plasmidy.

Přirozená rezistence vychází ze struktury bakterie, např. bakterie nemá cílovou strukturu, na kterou by se antibiotikum vázalo nebo nemá transportní systém pro propuštění antibiotika do buňky.

Chromozomální rezistence vzniká mutacemi v bakteriální DNA, kdy bodová mutace genu kódujícího cílovou strukturu pro antibiotikum způsobí změnu této struktury, díky čemuž již antibiotikum není schopno se na tuto

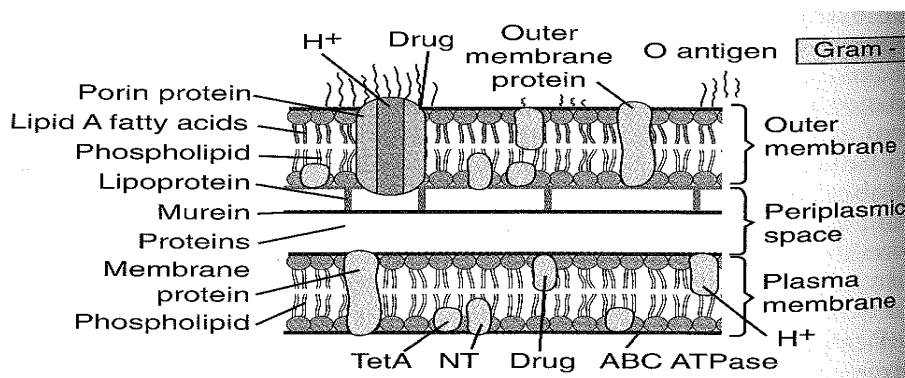
strukturu vázat a eliminovat bakterii. Např. takto může vznikat rezistence k fluorochinolonům.⁸⁵ „Chinolony inhibují syntézu DNA svým účinkem na DNA-gyrázu. Gen *gyrA* pro tvorbu jedné části tohoto enzymu ale snadno mutuje: vzniká změněná subjednotka enzymu a na ni se chinolony vázat nedovedou“(Votava a kol., 2010). Chromozomální rezistence se může projevit ovlivněním propustnosti bakteriální buňky, tvorbou biofilmu, efluxem a enzymatickou inaktivací antibiotik.

Ovlivnění propustnosti je významným mechanismem rezistence, protože přechod přes buněčnou stěnu je základ pro působení antibiotika na cílovou strukturu. Proniknutí antibiotika závisí na chemické skladbě antibiotika a složení bakteriální stěny. Existují dvě hlavní buněčné struktury ovlivňující propustnost a sice lipopolysacharidy a struktura a exprese proteinů vnější membrány – pórů. V případě antibiotik omezují póry jejich influx a udržují nízkou intracelulární koncentraci. Kromě toho změny ve snížení produkce nebo ve struktuře pórů snižují jejich afinitu k antibiotikům a mohou změnit fenotyp rezistence. Molekulární analýza gram negativních bakterií ukázala, že silně záporně nabitě jádrové oblasti lipopolysacharidů fungují jako selektivní permeabilní bariéra pro negativně nabitá antibiotika, výsledkem je snížená citlivost k těmto složkám. Mutace v postranním řetězci O-antigenů lipopolysacharidů mění tvar a náboj buněčné stěny, což snižuje vazebnou účinnost kationických antibiotik, a tyto mutace bývají také v souvislosti s rostoucím antibiotickým selekčním tlakem. Nejvíce se tento typ rezistence uplatňuje v kombinaci s ostatními.⁹¹

Tvorbu biofilmu může vyvolat jeden nebo více bakteriálních druhů, jde o komunitu bakterií připojenou k substrátu a obalenou exopolysacharidy. Biofilm je velmi rezistentní k působení antibiotika a ztěžuje léčbu. Mechanismus tohoto druhu rezistence zahrnuje komplexní systém buněčné chemické komunikace, která se liší v závislosti na druhu organismu. Rezistence biofilmu je dána jeho chemickým a fyzikálním složením. Jsou dva genetické mechanismy rezistence biofilmu, vrozené faktory rezistence a indukované faktory rezistence. Vrozené faktory jsou aktivovány jako součást vývojové cesty, stávají se součástí struktury a fyziologie biofilmu (snižují penetraci antibiotika skrz matrix).

Indukované faktory zahrnují ty vycházející z indukce samotným antimikrobiálním preparátem, vedoucím k různé expresi fenů rezistence. Na tuto rezistenci může být nahlíženo jako na kombinaci vrozeného anabolického metabolismu a indukovaných genetických mechanismů. Kvůli extrémní odolnosti biofilmu se mnoho vědců zaměřuje na vývoj anti biofilmové terapie zaměřenou na disrupci biofilmu.⁷⁹

Aktivita efluxového (výtokového) systému a nepropustnost vysvětluje vnitřní rezistenci k určitým antibiotikům. Efluxové pumpy nacházíme u gram pozitivních i negativních bakterií a fungují jako transportní proteiny, odstraňující odpadní látky z buněk. Mechanismus efluxu může poskytnout rezistenci nejen k jednomu nebo jedné třídě antibiotik, ale k velkému počtu různých antibiotik.⁹¹ Rezistenci způsobuje pět rodin proteinových efluxových pump, jsou to MFS (major facilitator subfamily), rodina RND (resistance nodulation cell division), rodina SMR (small multidrug regulator), rodina ABC (adenosin triphosphate binding cassette) a rodina MATE (multidrug and toxic effects).⁷⁹ Tyto pumpy využívají protiproudu protonů ke svému výkonu. Vnitřní mechanismus rezistence je aktivován podněty z prostředí nebo mutací v regulačních genech. Takovou mutací (u *P. aeruginosa*) může například dojít ke zvýšení počtu odvodných portálů pro mnoho antibiotik jako tertacykliny, betalaktamy, chinolony, makrolidy aj.⁹¹ U gram negativních bakterií byla identifikována efluxem mediovaná rezistence k oxazolidinu a streptograminu. Mnoho bakterií má efluxové pumpy, ale jen několik druhů umí tuto rezistenci využít.⁷⁹



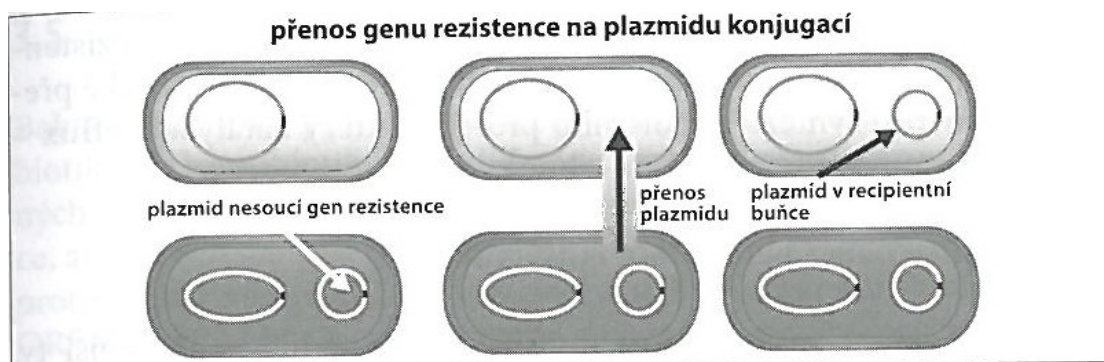
Obr. 13. Aktivní efluxový systém gramnegativních bakterií, zdroj: 79

Enzymatická inaktivace se nejvýznaměji projevuje u betalaktamových antibiotik

penicilinu, monobaktamu, cefalosporinu a karbapenemu. Společným znakem těchto antibiotik je čtyř členný betalaktamový kruh s betalaktamovou strukturou citlivou k hydrolýze betalaktamázi. Hydrolýza betalaktamů probíhá dvěma způsoby, mechanismem založeným na metalickém a na serinovém základu. Tyto mechanismy rozdělují betalaktamázy do čtyř tříd, třídy A, C, D zahrnují aktivní serinové enzymy, třída B metalický základ.⁹¹ Betalaktamázy se váží na PBP (penicillin binding proteins), bifunkční transglykosilázy/transpeptidázy odpovědné za křížovou vazbu glykanových řetězců a páteřových peptidových řetězců. Podobnost A, C, D betalaktamáz se strukturou PBP, že se na serinu založené enzymy vyvinuly z PBP a slouží jako receptory pro betalaktamová antibiotika. Bylo objeveno, že betalaktamázy soutěží s PBP o antibiotika z čehož vyplývá, že rozvoj strukturálních analogů laktamů vážících betalaktamázy zvýší aktivitu betalaktamových antibiotik a právě toto vedlo k rozvoji inhibitorů betalaktamáz jako jsou kyselina klavulanová, tazo a sulbaktam, které jsou funkčními substráty betalaktamáz a redukuje škodlivý efekt na betalaktamová antibiotika.⁷⁹ U gram negativních bakterií jsou betalaktamázy v periplasmatickém prostoru, u gram pozitivních jsou vylučovány jako exoenzymy.⁹¹ Většina gram negativních bakterií zprostředkuje chromosomální rezistenci enzymatickou inaktivací penicilinové třídy antibiotik, zejména C třídou. Třída B metalo dependentních enzymů jsou chromosomálně kódované cefalosporinázy a jejich exprese může být buď konstitutivní nebo inducibilní. Tyto betalaktamázy bývají exprimovány u klinicky významných nozokomiálních patogenů. Tyto enzymy nalezneme na chromozomu, ale mohou se uvolnit do plasmidů a přenášet se.⁷⁹

Dalším způsobem vzniku rezistence je přenos plasmidů mezi bakteriemi. Plasmidy jsou malé kruhové úseky DNA existující nezávisle na chromozomu. Nesou několik genů a jsou schopny se replikovat, některé jsou součástí chromosomu – episomální plazmid, jiné se mohou přenášet mezi bakteriemi (i jiného druhu) pomocí konjugace – konjugativní plasmidy, takovými jsou F a R plasmidy a právě R – plasmidy kódují geny pro tvorbu enzymů, které modifikují nebo rozkládají antibiotika a jsou příčinou vzniku rezistence na antibiotika. Přenos DNA z jedné bakterie do druhé může probíhat třemi způsoby.

Prvním již zmíněným je konjugace. Jedná se o přímý styk bakterií pomocí tzv. sex-pilu. Přenáší se tak nejen R-plazmidy, ale i některé faktory virulence, konjugace nejvíce probíhá u gram negativních bakterií. Další způsob je transformace, kdy bakterie převezme a včlení část DNA do svého chromozomu. Opět se tak mohou přenášet faktory virulence, transpozony obsahující geny rezistence i plazmidy. A nakonec transdukce, kdy jsou bakteriální geny přenášeny bakteriofágem. A i tímto způsobem mohou být přenášeny R-plazmidy, častěji se tento způsob uplatňuje u gram pozitivních bakterií.⁸⁸



Obr 14. Přenos genů rezistence plasmidem, zdroj: 85

Tyto tři typy přenosu DNA se označují jako přenos horizontální. Pokud jde o přenos vertikální, ten je způsoben, když antibiotikum vytváří selekční tlak a potlačuje citlivé buňky, zatímco rezistentní se množí až převládnu a přenesou tuto rezistenci na potomstvo. Stejně jako u chromozomální rezistence se plasmidová může projevit efluxem, změnou cílových struktur, enzymatickou inaktivací a vytvořením nových struktur.⁸⁵

Efluxové pumpy mohou být přeneseny do plazmidů, které jsou pak předány při horizontální genové výměně. Takovým příkladem může být efluxová pumpa kódovaná genem *mefA* u *Streptococcus pneumoniae* způsobující rezistenci k makrolidům, může se přenášet i do jiných druhů streptokoků. Mají-li streptokoky *mef* fenotyp stávají se rezistentní (oproti běžnému standardu) na erytromycin.⁷⁹

Pod pojmem změna cílových struktur si můžeme představit např. plasmidy mediovaný přenos genů chinolonové rezistence *qnr*, primárním mechanismem rezistence k této třídě antibiotik je modifikace pomocí mutace kódující změnu

jedné aminokyseliny v genu kódující DNA topoizomerázu.⁸⁵ Tato mutace způsobuje rezistenci k nalidixové kyselině a spolu s dalšími mutacemi dochází k rezistenci k fluorochinolonům. Rezistence k betalaktamovým antibiotikům je mediována horizontální výměnou DNA fragmentů transformací a homologní rekombinací, takto dojde k mutaci v PBP a tato změna v cílové struktuře zvýší rezistenci k betalaktamům.⁷⁹ Změna cílové struktury může nastat i vlivem působení enzymů. Příklad makrolidy váží 50S podjednotku ribosomu v místě peptidyltransferázového místa, v blízkosti 23S rRNA.⁸⁵ Methylace skupiny aminokyselin v adeninovém reziduu 23S rRNA snižuje afinitu makrolidů k tomuto cíli. Enzym způsobující metylaci se nazývá erytromycin ribosom metyláza (ERM) a geny, které ji kódují jsou přenášeny plasmidy a transpozony. Navíc metylace způsobuje zkříženou rezistenci i k streptograminu a linkosamidům.⁹¹

Vytvořením nových struktur se proti účinku antibiotik chrání *Staphylococcus aureus* a to proti meticilinu. Tato rezistence se objevila brzy po zavedení meticilinu do klinické praxe v roce 1960, došlo k vytvoření nové cílové struktury řešící expozici toxickým účinkům antibiotik. K tomu slouží mobilní elementy nesoucí stafylokokovou sadu chromozomů *mec*. Tyto elementy přenáší trojici genů, ovšem jen *mecA* je odpovědný za rezistenci na meticilin a kóduje PBP (jejich změnou vzniká rezistence). Podobně funguje rezistence k antibiotikům inhibující syntézu folátu, kde je vytvořen nový enzym, který není napadán antibiotiky.⁷⁹

Posledním zmiňovaným mechanismem plasmidové rezistence je enzymatická inaktivace antibiotik. Pomocí plazmidů jsou přenášeny betalaktamázy třídy A, zejména TEM-1, typicky nalézaná u gram negativních bakterií.⁴⁶ Se vznikem plasmidové rezistence na betalaktamy se zvýšily i obavy z možného rozšíření přenosu tohoto mechanismu rezistence a to vedlo k vývoji nových oxyimino betalaktamových antibiotik odolných k hydrolýze třídou A betalaktamů. Tato nová antibiotika jsou excelentní terapií, jejich užití však musí být uváženo, aby nedocházelo k vytváření selekčního tlaku na ostatní varianty betalaktamáz, a ty nezačaly nová antibiotika hydrolyzovat.⁷⁹ Tyto ESBL (extended – spectrum betalactamases) jsou derivovány z běžných

betalaktamáz (TEM – 1 a SHV – 1 u *E.coli*). Rozšířené spektrum ESBL vytváří lepší substráty pro inhibitory betalaktamáz, jako kys. Klavulanová.⁴⁶ Nedávno byl objeven příklad enzymatické alterace antibiotik plasmidy přenášenou variantou aminoglykozidové acetyltransferázy, která acetyluje fluorochinolony a redukuje tak jejich aktivitu. Tato varianta enzymu působí proti některým fluorochinolonom a jako účinná rezistence k aminoglykozidům, zvyšující se implikace těchto plasmidy nesených genů může přispívat k multi rezistenci.⁷⁹

5.2. Vznik a vývoj rezistence

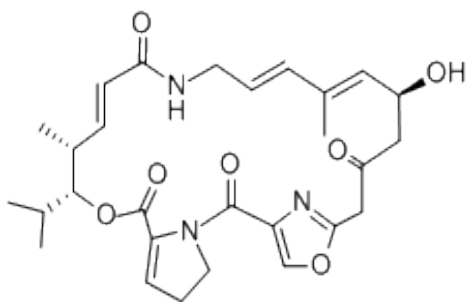
První klinické užití antibiotika se datuje do roku 1941, kdy profesor Howard Florey poprvé použil penicilin k léčbě dobrovolníků. Jedním z prvních byl konstábl Albert Alexandr, který byl po poškrábání růží nakažen stafylokoky a streptokoky. Po podání penicilinu se jeho stav výrazně zlepšil. Tímto se zrodil antibiotický věk a penicilin byl v zápětí následován streptomycinem (1944), chloramfenikolem (1947), cefalosporiny (1948) aj. V roce 1946, rok po plošném rozšíření penicilinu, se začaly objevovat kmeny rezistentních stafylokoků. Další rezistentní bakterie se objevila v roce 1970, a to penicilin rezistentní *N. gonorrhoeae* a betalaktamázu produkující *Haemophilus influenzae*. Později v tom samém roce se objevily methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* a multi rezistentní *Mycobacterium tuberculosis*. V 80. a 90. letech se rozvinula rezistence u kmenů běžných enterických a non – enterických gram negativních bakterií jako *Shigella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Vibrio cholerae* aj.⁴²

Bakterie mohou disponovat geny zajišťující jim multirezistenci. Jedná-li se o strukturně podobná antibiotika, jedná se o zkříženou rezistenci, jedná-li se o různá antibiotika, dochází ke kumulaci. Existuje specifický mechanismus, při jehož použití se bakterie stávají multirezistentní, jedná se o přenos jednoho genu, zajišťujícího multirezistenci, zvaný *mar*. Produktem tohoto genu jsou proteiny schopné vypudit antibiotikum z buňky, např. tetracyklin.⁸⁵ V roce 2008 byl studován další velmi rezistentní kmen, a to *Klebsiella pneumoniae* (poprvé se objevil 1996), obsahoval gen rezistence tvořený klebsiellou a způsobil rezistenci k hlavní léčebné skupině – karbapenemům.⁴² Rezistence je zde na základě enzymu kódovaném oním genem exprimujícím se jako

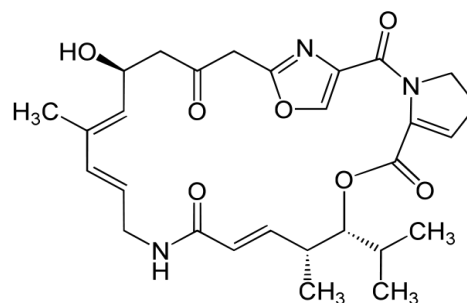
metalo betalaktamáza označená NDM 1(New Delhi). Kritické u tohoto kmene je, že je enzym unikátní, součástí integronu 1 třídy⁷¹ a nemohou jej atakovat betalaktamázové inhibitory, a tak zatím nemáme na tento kmen účinné léky. Gen pro tuto rezistenci je nesen plazmidem, který se může předávat mezi různými bakteriálními druhy horizontálním genovým transferem.⁴²

Z dat předložených ECDC v roce 2011 vyplývá, že každý rok zemře v Evropě v důsledku rezistentních infekcí až 25 000 lidí a náklady na léčbu těchto infekcí přesahují 1,5 miliardy EUR ročně. (Zpráva SZU).⁷³ K rozvoji rezistence přispívají klinické podněty, ty vyplývají ze zneužívání antibiotik, často jsou antibiotika podávána nevhodnou dobu (ať dlouho nebo příliš krátce), v nedostatečných dávkách nebo jsou nevhodně zvolena vzhledem k povaze nemoci (např. virový původce), a to vše zlepšuje šance na přežití rezistentních bakterií.⁵³

Dalším potenciálním zdrojem rezistentních bakterií jsou hospitalizovaní pacienti. Velmi výrazně také k rozvoji rezistence přispívá fakt, že země jako Británie nebo USA podávají antibiotika zvířatům, a to ne jen z léčebných důvodů. V zemědělství je tento problém obdobný, podávání antibiotik zvířatům do krmných směsí k zabránění jejich onemocnění. Problémem je i značná strukturální podobnost antibiotik pro zvířata a lidských antibiotik, kupříkladu krocanům podávaný virginiamycin podněcuje bakteriální rezistenci ke strukturně podobným antibiotikům streptograminu, dalfopristinu a quinupristinu.¹ nebo třeba suplement přidávaný do krmení tylosin vede k rozvoji rezistence na erytromycin.¹⁹ Dá se tedy říci, že kombinace klinického a agrikulturního využití antibiotik urychlilo proces přirozeného selektivního tlaku.



Obr 15 Virginiamycin, zdroj: 98



Obr 16 Streptogramin, zdroj:99

5.3. Rezistence *N. gonorrhoeae*

N. gonorrhoeae je etiologickým agens, mezi léčitelnými STD (sexually transmitted diseases) vyniká zejména proto, že její rezistence k antibiotikům ohrožuje léčbu jednotlivých případů. Ke vzniku a šíření rezistence u *N. gonorrhoeae* došlo především přijetím nové DNA konjugací a transformací.⁶⁴ Chromozomální změny ovlivňují permeabilitu bakteriální stěny a mohou tak redukovat citlivost k betalaktamům, tetracyklinům a makrolidům, plazmidy (přenesené konjugací) často nesou determinanty jak pro rezistenci k penicilinům, tak pro těžkou rezistenci k tetracyklinům, protože však ne všechny kmeny mají konjugační plasmidy, tak může být rychlost šíření rezistence do určité míry omezena.⁷⁰

Penicilin byl přitom velmi rozšířeným prostředkem pro léčbu kapavky. *N.gonorrhoeae* byla původně značně citlivá a léčba úspěšná, ale došlo ke snížení citlivosti a k léčebným neúspěchům. Z počátku se tyto neúspěchy řešily zvýšením dávky penicilinu, což ale nevyhnutelně vedlo ke zvýšení rezistence a zvýšení dávky již nevedlo k vyléčení, toto byl příklad postupného nárůstu vlivem chromozomálních změn.⁶⁴ Cílovým místem pro vazbu penicilinu jsou PBP a jejich alterací dochází ke snížení afinity penicilinů k vazebným místům. PBP – 2 je kódován lokusem penA, doplňující účinky pak mají změny např. v penB nebo mtr. Mtr lokus zajišťuje rezistenci k široké škále antibiotik prostřednictvím efluxového systému. Mutace v penB ovlivňující póry redukuje permeabilitu pro hydrofilní antibiotika.⁶³

Efekt penA mutace a zvyšující se exprese mtr vede ke zvýšení MIC penicilinu a gonokoky vystavené těmto změnám jsou označeny jako CMRNG (chromosomally resistant *N. gonorrhoeae*).⁶⁴ Penicilinázu, produkující *N.gonorrhoeae* (PPNG) byly poprvé identifikovány v USA a UK, o rok později v Africe. První izoláty obsahovaly typ TEM – 1 betalaktamázových plazmidů, nazvaných Afrika a Asie kódovaných transpozonem TnA, který je důležitý pro přenos a šíření rezistence na penicilin na vysoké úrovni mezi gonokoky.⁵⁵ PPNG a CMRNG mohou koexistovat ve stejném izolátu, to je důležité pro užití betalaktamů v kombinaci s inhibitory např, amoxicilin s klavulanátem nebo

ampicilin se sulbaktamem. Jejich užití může teoreticky pomoci u samotných PPNG, ale při kombinaci obou mechanismů rezistence selhává. U cefalosporinů, existuje zkřížená rezistence s peniciliny, neplatí to pro cefalosporiny 3. generace. Některé cefalosporiny mohou být použity k léčbě PPNG, protože nejsou hydrolyzovány TEM - 1typem betalaktamázy. Ostatní betalaktamázy exprimované gram negativními bakteriemi nebyly dosud přeneseny do patogenních neisserií.⁶⁴

Chinolonová antibiotika jsou velmi rozšířená pro léčbu kapavky. Účinek chinolonů hlavně snižují změny buněčné permeability a mechanismus efluxu a způsobují lehkou rezistenci. Cílem chinolonů u gonokoka jsou topoizomerázy a rezistence je způsobena mutací v *gyrA* genu, to změní cílovou strukturu. Sekundárním cílem těchto antibiotik je topoizomeráza IV (gen *parC*). Chinolony 4. generace jsou odolnější proti změnám v *parC*, ale méně v *gyrA*.^{37,64}

Tetracykliny se k léčbě kapavky nedoporučují, používají se však i přesto, že byly u gonokoků nalezeny jak plazmidové, tak chromozmální mechanismy rezistence. Chromozmální rezistence je spojena s alterací *mtr* a *penB*. Vysoká úroveň rezistence u gonokoků (TRNG) vychází ze získání *tetM* determinant. Existují 2 odlišné typy holandský a americký izolované z plazmidu.⁶³

Sulfometoxazol a trimetoprim byly spojeny do formulace užívané k více dávkové léčbě kapavky. Obě složky blokují syntézu tetrahydrofolátu zablokováním základních funkcí. Rezistence vzniká buď snížením propustnosti membrán nebo zvýšenou syntézou dihydrofolát reduktázy.

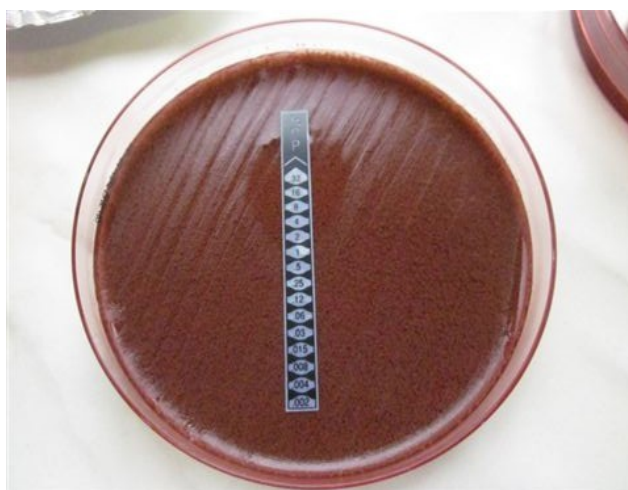
Vlivem bodové mutace, ovlivňující ribozomální cílová místa, může pravděpodobně dojít k těžké rezistenci na spektinomycin a aminoglykozidy. Poněkud zvýšené MIC u gentamicinu u některých izolátů souvisí s mechanismem rezistence zprostředkovaným póry.⁶⁴

Účinky makrolidů (azitromycin) mohou být ovlivněny chromozomální rezistencí mutací v *mtr*. Ribozomální mutace mohou způsobit rezistenci *N. gonorrhoeae*.⁵

5.4. Metody stanovení citlivosti *N. gonorrhoeae* na ATB

5.4.1. Kvantitativní metoda

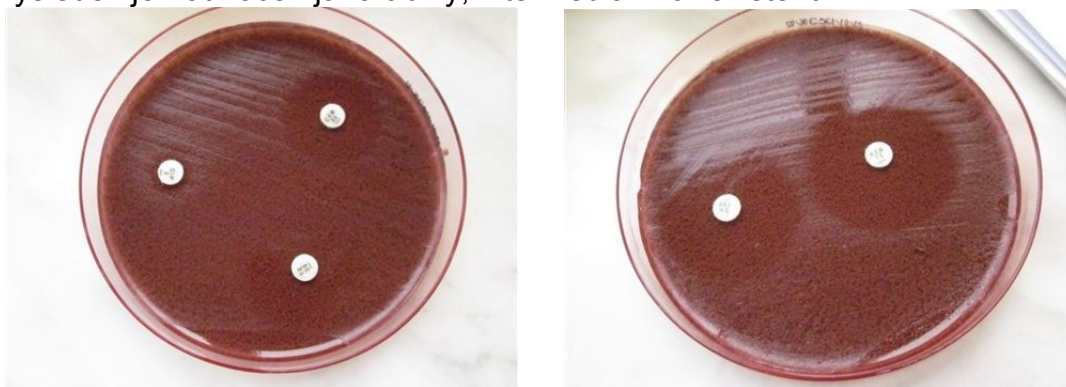
Kvantitativní metodu představuje stanovení MIC – minimální inhibiční koncentrace, tedy nejnižší koncentrace podaného antibiotika, která je ještě schopna zastavit růst bakterií. V současnosti se nejvíce využívá novější metody tzv. E-testů. E-test je diagnostický proužek napuštěný exponenciálním gradientem koncentrací antibiotika, tento proužek se položí na kultivační médium, které bylo hustě naočkováno testovaným kmenem bakterie, inokulum by mělo odpovídat 0,2 – 0,5 stupně dle McFarlandova zákalového standardu. Médium pro E-test volíme dle požadavků mikroba, proto citlivost *N. gonorrhoeae* testujeme na čokoládovém agaru Č3. Pro růstově nenáročné bakterie se používá Müller-Hinton agar, pro dobrou viditelnost zóny nebo agar s 5 % defibrinované koňské krve či GC agar. V tomto médiu proužek vytvoří stejný gradient koncentrací antibiotika, jakým je napuštěn. Toto médium kultivujeme přes noc. Antibiotikum vytvoří po difúzi do média inhibiční zónu ve tvaru kapky, v zóně inhibice bakterie nerostou, mimo ni ano. V místě, kde se protíná inhibiční zóna s proužkem odečítáme hodnotu MIC pomocí stupnice na proužku E-testu odpovídající gradientu koncentrací antibiotika. Výsledek je hodnocen vysokoškolským pracovníkem a výsledky předány i s komentářem zadávajícímu lékaři.⁸⁶



Obr 17 E-test firmy OXOID pro stanovení MIC penicilinu na Č3 agaru (Columbia agar Merck), kultivace 24 hodin v atmosféře 5 % CO₂ 35 ± 2 °C , zdroj: foto autor

5.4.2. Kvalitativní metoda

Kvalitativní metodu představuje diskový difuzní test. Tento test stejně jako E-test se nejčastěji provádí na Müller-Hinton agaru, ale pro náročné bakterie jako *N. gonorrhoeae* použijeme čokoládový agar Č3 nebo agar s 5 % defibrinované koňské krve či GC agar. Očkujeme hustě tamponem inokulum odpovídající 0,2-0,5 stupni McFarlandova zákalového standardu. Poté se na misku kladou disky filtračního papíru napuštěné různými druhy antibiotik. U *N. gonorrhoeae* jsou to disky s penicilinem (PEN), cefuroximem (CRX), tetracyklinem (TET), ciprofloxacinem (CIP), cefotaximem (CTX), azitromycinem (AZI) a spektinomycinem (SPE). Disky se kladou jehlou nebo dispenzorem ve směru hodinových ručiček do kruhu. Na jednu Petriho misku se běžně umísťuje 6 disků. *N. gonorrhoeae* však vytváří velké inhibiční zóny, proto na 1 misku klademe pouze 3 (max. 4) disky. Kultivujeme 18 – 24 hodin v termostatu při 35 ± 2 °C se zvýšenou tenzí CO₂ a poté hodnotíme velikost inhibiční zóny. Pravítkem se změří průměr kruhové zóny v mm, srovnává se standardem. Výsledek je hodnocen jako citlivý, intermediální a rezistentní.⁸⁷



Obr 18, 19 Disková difuzní metoda na Č3 agaru (Columbia agar Merck), levý obrázek disky cefotaxim, tetracyclin a ciprofloxacin; pravý obrázek disky azitromycin a spektinomycin. Zdroj: foto autor

5.4.3. Stanovení produkce betalaktamáz

Betalaktamázy jsou enzymy, které hydrolyzují betalaktamový kruh, jednu ze základních funkčních jednotek betalaktamových antibiotik penicilinu a cefalosporinu. Jeho hydrolyzou inhibují bakterie jeho baktericidní účinek, spočívající v inhibici syntézy buněčné stěny.^{46,52}

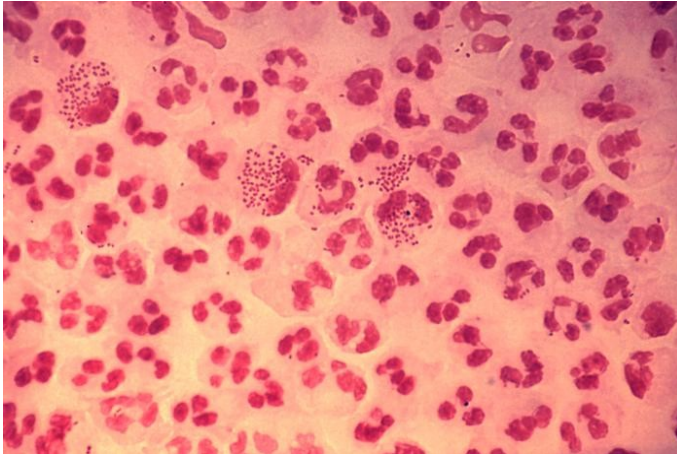
6. Diagnostika

6.1. Odběr a transport materiálu

Při podezření na gonorrhoeu provádí ošetřující lékař odběr z uretry. Odebírá se hnisavý výtok na tampon nebo lékař provede odběr přímo vsunutím tamponu 2 – 3 cm hluboko do močové trubice. Odběr provádíme ráno před vymočením. U žen provádí gynekolog stěr z cervixu. Vaginální stěr se neprovádí, protože při nákaze nevzniká kolpitida – pochva tedy není vhodným místem pro odběr. Při jiných formách kapavky nebo u pacientů v kontaktu s kapavkou provede lékař stěr z rekta, faryngu a spojivky. Stěr provádíme tamponem na špejli či drátku. Tampon následně zanoříme do transportního média (např. Amies, Stuartovo transportní médium), zajišťující přežití i citlivých bakterií jako je právě *N. gonorrhoeae*. Odběr na suchý tampon bez užití transportního média je akceptován pouze pro metodu PCR a průkaz některých antigenů.⁶⁰ Pro odběr je možno užit výtěrové soupravy různých výrobců. Nejvíce používanou je souprava s obsahem aktivního uhlí – Amiesovo transportní médium, které má universální použití pro odběr materiálu na bakteriologickou kultivaci včetně kapavky a anaerobů. Dalšími soupravami jsou např. C.A.T. médium pro houby a trichomonády, Fungi Quick, souprava na chlamydie atd.

Při provedení stěru z cervixu a uretry je nezbytné zhotovení nátěrů na mikroskopická podložní sklíčka, standardně se provádí nátěr na 2 mikroskopická podložní sklíčka, preparáty jsou pak obarvena dle Grama a dle Giemsy a hodnotí se jako MOP – mikrobiální obraz poševní, kapavka je hodnocena jako MOP IV.⁸⁰

Provedení nátěru na sklo klinickým lékařem je pro diagnostiku kapavky velmi důležité. Poskytuje ucelený obraz o stavu sliznice, přítomnosti leukocytů, u žen o přítomnosti laktobacilů. Poskytují obraz o množství diplokoků, jejich případné fagocytóze leukocyty, což nám umožní poznat i fázi onemocnění. Neméně důležité je i poznání další doprovodné mikroflóry.



Obr 21 Mikroskopický preparát barvený dle Grama, gonokoky v leukocytech, MOP IV, zdroj: 100

Nezbytnou součástí preanalytické fáze vyšetření musí být i správné označení vzorku a řádné vyplnění průvodky. Na zkumavku se zanořeným tamponem je nalepen štítek, popř. ručně napsáno jméno pacienta, rodné číslo, popř. typ materiálu. Na žádance musí být vyplněny identifikační údaje pacienta – jméno, rodné číslo, bydliště, typ pojišťovny, číslo diagnózy, dále typ materiálu, místo odběru, požadované vyšetření, údaje o léčbě pacienta, jméno odebírajícího lékaře či sestry, datum a čas odběru, fáze menstruačního cyklu. Správně vyplněná žádanka je vodítkem, jak postupovat s dodaným materiálem dále.⁶⁰ Vzor žádanky - příloha 1.

Transport materiálu by měl být co nejrychlejší, aby nedošlo k poškození vzorku vycházející z teploty transportu, mechanické vlivy, převržení a vylití vzorku apod. Pro transport je tolerována pokojová nebo chladničková teplota 4 – 8 °C, sníží se tím metabolismus bakterií a nedojde k jejich úhynu. Transport se proto provádí pod přísnou kontrolou teploty a ve speciálních transportních nádobách, bránících otřesům i poškození. Provádí se pravidelné kontroly přepravních podmínek.⁷⁶

6.2. Barvení dle Grama, oxidázový a katalázový test

Gramovo barvení je základní součástí vyšetření klinického materiálu. Slouží k rychlé orientaci v diagnostice kapavky. Jde o jednoduchou barvicí techniku členící bakterie do dvou základních skupin. Gram pozitivní koky a tyčky a gram negativní koky a tyčky.

Barvíme-li metodou dle Grama je nejprve nutné zhotovit kvalitní preparát, který následně barvíme. Preparát bývá často zhotoven a zasílán lékařem,

který provádí odběr, takto zhotovený preparát pouze fixujeme a barvíme. Provádíme-li mikroskopii z narostlých kolonií, je třeba vyžíhanou sterilní kličkou nabrat narostlou kolonii a rozetřít ji v kapce fyziologického roztoku, nechat uschnout a poté fixovat. Fixujeme nejčastěji plamenem, a to trojím protažením sklíčka plamenem, přičemž kontrolujeme teplotu na předloktí. Pokud po přiložení sklíčko nepálí, je fixace provedena správně.⁶² Je možné využít i fixace chemické pomocí metanolu, ta se využívá pro citlivější bakterie jakou je právě *N. gonorrhoeae*. Po fixaci je možné ihned zahájit barvicí proces.

Podstata rozdělení bakterií spočívá ve stavbě jejich stěny. Gram pozitivní bakterie mají stěnu větší tloušťky, složenou ze silné vrstvy peptidoglykanu, peptidů a kyseliny teichoové. Gram negativní bakterie mají stěnu tenší, ale složitější. Skládá se z tenké vrstvy peptidoglykanu a vnější membrány, kterou tvoří dvojvrstva fosfolipidů, peptidy, lipoproteiny a lipopolysacharidy.^{74,90} Při barvení nejprve dojde k vytvoření komplexu krystalové violeti s Lugolem, který se silně váže do struktury gram pozitivních bakterií, nelze jej již odbarvit alkoholem, zatímco ve stěně gram negativních se tento komplex váže jen slabě a alkoholem je zcela odbarven. Při posledním kroku, se gram negativní bakterie (v této době bezbarvé) obarví červeně, gram pozitivní bakterie barvivo nepřijímají a zůstávají modrofialové.¹²

6.3. Kultivace na pevných půdách

Všechny materiály, ve kterých by mohla být *N. gonorrhoeae* přítomna (odběry z uretry, cervixu, výtěr ze spojivkového vaku novorozenců, eventuelně synoviální tekutina a také všechny materiály určené ke screeningu *N. gonorrhoeae* – výtěry z krku, rekta) očkujeme na půdy určené pro růst neisserií. Pro kultivaci *N. gonorrhoeae* se nejčastěji používá GC agar, čokoládový agar nebo obohacené krevní agary jako BHI agar.

Krevní agar je základní diagnostická půda. Na tomto agaru rostou jak gram pozitivní tak gram negativní bakterie, neroste na něm *N. gonorrhoeae*, očkuje se kvůli záchytu původce onemocnění jiného než *N. gonorrhoeae*.

Další půdou je čokoládový agar, což je v podstatě modifikovaný krevní agar, kdy jsou beraní erythrocyty přidány k agaru zahřátém na 80°C. Při této teplotě dochází k hemolýze erythrocytů. Díky hemolýze je tato půda obohacená o složky obsažené v erythrocytech jako hemin či NAD a je tak vhodná pro kultivaci

náročnějších bakterií jako např. *N. gonorrhoeae*.

Třetí základní bakteriologickou půdou je MacConkey agar. Tato půda je označována jako selektivně diagnostická. Obsahuje žlučové soli a krystalovou violet a potlačuje tak růst gram pozitivních bakterií. *N. gonorrhoeae* ne něm neroste.

Základní půdou využívanou při očkování materiálu s podezřením na kapavku je GC agar, tedy selektivní půda pro neisserie a hemofily. Jedná se o modifikaci čokoládového agaru, protože působky, (NAD, hemin), uvolněné při přípravě čokoládového agaru podporují růst neisserií.

Součástí GC agaru bez přidaných suplementů je směs peptonů, která opět slouží jako zdroj živin, kukuřičný škrob absorbující toxické produkty, hydrogen a dihydrogen fosforečnan draselný jsou pufrý, NaCl udržuje osmotickou rovnováhu a dodává elektrolyty a nakonec bakteriologický agar pro lepší tuhnutí.²⁵ Opět se může složení lišit dle výrobce, zde uvádím složení firmy Conda.

Příklad složení GC agaru:

Směs peptonů	15,0 g/l
Hydrogenfosforečnan draselný	4,0 g/l
Dihydrogenfosforečna draselný	1,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
Kukuřičný škrob	1,0 g/l
Bakteriologický agar	10,0 g/l

výsledné pH: 7,2 ± 0,2 při 25°C

Přidáním různých druhů suplementů dojde ke zvýšení selektivity. Příklad suplementu je VCAT (Vankomycin, Colistin sulfát, Amfotericin B, Trimetoprim), VCNT (Vankomycin, Colistin sulfát, Nystatin, Trimetoprim) suplement se přidávají pro izolaci neisserií, LCAT (Linkomycin, Colistin sulfát, Amfotericin B, Trimetoprim) suplement se používá pro izolaci patogenních neisserií, ale přidává se koňská krev místo hemoglobinu. Modifikací GC agaru přidáním VCN (Vankomycin, Colistin sulfát, Nystatin) suplementu je Thayer Martin Medium, na kterém může vlivem antimikrobiálních látek docházet k inhibici některých kmenů *N. gonorrhoeae*. Je tedy vhodné přidat čokoládový agar, kde k inhibici nedochází a nedejde k falešně negativním výsledkům kultivace.

6.4. Identifikace *N. gonorrhoeae*

Na pevných půdách, zejména čokoládovém a GC agaru, vyrostou kolonie, u nichž je podezření, že se jedná o *N. gonorrhoeae*, a které mají charakteristickou morfologii buněk v mikroskopii. *N. gonorrhoeae* vyrůstá v šedých, lesklých, drobných koloniích, které je nutné blíže identifikovat dalšími testy. V dalším kroku provedeme identifikaci a to biochemickým testem k rozlišení především *N. gonorrhoeae* od *N. meningitidis*, tímto testem můžeme také určit některé nepatogenní neisserie či branhamely. Nejčastěji užívaným je Neisseria test komerčně vyráběný produkt. Jedná se o mikrotitrační destičku se sedmi biochemickými testy (štěpení glukózy, maltózy, fruktózy, sacharózy, produkce γ -glutamyl-transferáza, štěpení tributyrinu, syntéza polysacharidů). Tyto chemikálie jsou v lyofilizované formě na dně mikrotitračních jamek a po přidání suspenze zkoumaných bakterií dojde k jejich rozpuštění a smísení s koloniemi a po 18 – 24 hodinové inkubaci v termostatu při 35 +/- 2 °C a zvýšené tenzi CO₂ odečítáme barevný výsledek. ²⁷

Jednoduchou pomůckou pro biochemii cukrů patogenních neisserií je jejich název. *N. gonorrhoeae* – **g** – glukóza, *N. meningitidis* – **m** – maltóza a glukóza. Biochemické testy pomocí mikrotitračních setů jsou jednoduché, rychlé a spolehlivě rozlišující.

Tabulka č. 1 Biochemické aktivita různých druhů z rodu *Neisseria*

Jamka:	H	G	F	E	D	C	B	A
Test:	NEC	GLU	MLT	FRU	SUC	GGT	TRB	SPS
<i>N. gonorrhoeae</i>	–	+	–	–	–	–	–	–
<i>N. meningitidis</i>	–	+	+	–	–	+	–	–
<i>N. lactamica</i>	–	+	+	–	–	–	–	–
<i>N. polysaccharea</i>	–	+	+	–	d	–	–	+
<i>N. sicca</i> +	–	+	+	+	+	d	–	+
<i>N. mucosa</i> +	–	+	+	d	d	d	–	d
<i>N. flavescens</i>	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>N. cinerea</i> ++	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>N. elongata</i> ++	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>M. (B.) catarrhalis</i>	–	–	–	–	–	–	+	–

Vysvětlivky: + = 75–100 % pozitivních reakcí

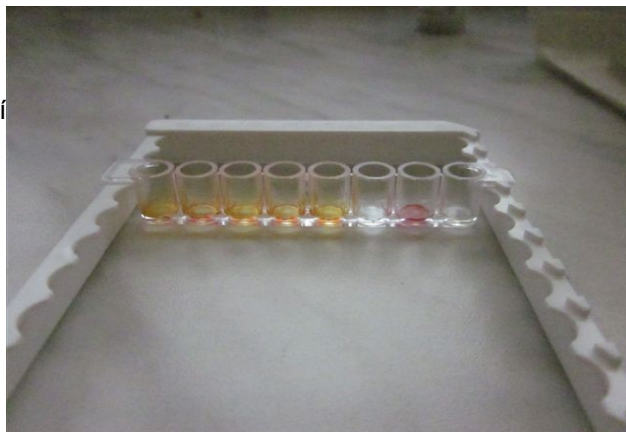
d = 26–74 % pozitivních reakcí

– = 0–25 % pozitivních reakcí

NEC = negativní kontrola

Obr 22 Znárodnění stripů pro stanovení biochemické aktivity *N.gonorrhoeae*,

zdroj: foto autor



Doplňujícími biochemickými testy, jsou testy oxidázové a katalázové aktivity. Stanovení těchto enzymů je u gonokoka pozitivní. Cytochrom oxidáza, enzym nezbytný při posledním kroku dýchacího řetězce,²⁰ se stanovuje reakcí ethyloxethylparafenylendiaminu s α -naftolem za vzniku indofenolové modři, kterou katalyzuje.¹³ Kataláza je enzym, rozkládající peroxid vodíku na vodu a kyslík. Těto vlastnosti se využívá při jejím stanovení, kdy se kolonie vloží do kapky peroxidu vodíku. Pozitivní reakce se projeví tvorbou bublinek kyslíku, které kataláza uvolňuje z peroxidu.^{17,20}

6.5. Stanovení *N. gonorrhoeae* metodou PCR

PCR vyšetření se provádí ze stěrů u pacientů s nejasnou diagnosou, v případě např. neadekvátní léčby, která však již ovlivní životaschopnost bakterií a tím i jejich schopnost nárůstu na kultivačních půdách. O způsobu vyšetření pacienta rozhoduje ošetřující lékař. DNA izolujeme dle SOP. K analýze neisseriální DNA metodou real-time PCR je ve FN Brno využíván tento materiál:

Stěry – uretra, cervix, spojivka – tampony vložíme do zkumavky, přidáme 200 μ l transportního média, vortexujeme 15 – 20 s.

Močový sediment – po 30 min centrifugace slijeme supernatant, použijeme přibližně 200 μ l resuspendovaného sedimentu.

Sperma – 30 μ l spermatu + 70 μ l sterilního fyziologického roztoku, extrahujeme ze 100 μ l

Sekret z prostaty uchováváme ve zkumavce eppendorf.⁸²

Je to jedna z nejpřesnějších metod stanovení přítomnosti *N. gonorrhoeae* ve vzorku průkazem její DNA metodou polymerázové řetězové reakce – PCR resp. jednou z jejích modifikací real-time PCR. Jedná se o metodu amplifikace vybraného úseku DNA. Amplifikace je nutná, protože DNA může být ve vzorku málo a nebylo by možné ji detekovat, proto zmnožíme vybraný úsek DNA na takový počet kopií vhodný k detekci.

Úsek je denaturován a pomocí specifických primerů jsou dotvořena vlákna k původnímu úseku a znovu nám vzniká dvoušroubovice, ale již ve dvou exemplářích. V tomto místě je však jeden aspekt, který nám právě odlišuje klasickou PCR od real-time. Kromě primerů nasedají totiž na tento denaturovaný úsek ještě specifické komplementární sondy. Rozlišujeme hydrolyzační – jedná se o jeden oligonukleotidový řetězec, který má na jednom konci fluorofor (enhancer) a na druhém zhášec (quencher), při prodlužování řetězce DNA-polymeráza tento řetězec štěpí uvolní se enhancer a emituje světlo, které zachytí detektor. Sondy hybridizační pracují na podobném principu, jen zde máme dva řetězce hybridizující na amplifikovaný úsek těsně vedle sebe, na jedné je opět quencher (5'konec) a na druhé enhancer (3'konec). Quencher potlačuje záření fluoroforu. Jakmile DNA-polymeráza dojde při syntéze k první části sondy rozštěpí ji a tím přestane quencher zhaset enhancer. Vzniká signál, který je detekován.⁸

Novějším typem sondy je tzv. molecular beacons. Jde o sondu, která má díky své sekundární struktuře potlačenu fluorescenci zhášecem, pokud dojde k jejímu navázání na amplifikovaný úsek, změní se její sekundární struktura a dojde k uvolnění fluoroforu a detekci signálu. Existují i nespecifické sondy, které svítí v přítomnosti PCR produktu (např. Syber green, aj.), ale při detekci mikroorganismů se používají méně.⁸³

S každým cyklem dochází k exponenciálnímu nárůstu počtu kopií původní sekvence DNA. Cyklů bývá mezi 30 - 35, což je dostačující počet kopií pro následnou detekci. K provedení real-time PCR je ovšem zapotřebí mnohem více než jen vzorek s přítomnou DNA bakterie.³ K provedení reakce je třeba namíchat tzv. master mix, který obsahuje vše potřebné, aby reakce probíhala

optimálně a vedla ke kýženým výsledkům. Příprava master mixu i samotná PCR v termocyleru probíhají v oddělených prostorách, pracujeme v laminárních boxech, abychom zabránili možné kontaminaci, veškeré nástroje i pracovní místnost se vysvítí UVC zářením, aby došlo k zneškodnění veškerých fragmentů DNA a endonukleáz běžně přítomných v prostředí.

Součástí master mixu jsou:

1. primery – specifické oligonukleotidové úseky komplementární k 3'konci každého vlákna bakteriální DNA a od kterých je následně syntetizováno nové vlákno, bez primerů by DNA-polymeráza nerozpoznala amplifikovaný úsek a reakce by neproběhla,
2. DNA polymeráza – také zvaná Taq polymeráza (odvozená z bakterie *Thermus aquaticus*), po přečtení primeru syntetizuje nové vlákno podle zákona komplementarity bazí,
3. deoxynukleotidy – základní baze ze kterých se skládá DNA (dATP, dGTP, dTTP a dCTP), polymeráza připojuje tyto „stavební kameny“ k sobě a syntetizuje tak nové vlákno,
4. sondy – dle našeho výběru hybridizační, hydrolyzační, molecular beacons nebo nespecifické,
5. pufr – slouží k udržení optimálního pH při reakci a stabilizaci DNA-polymerázy,
6. Mg²⁺ ionty – slouží jako kofaktor polymeráza, málo iontů vede k nízké výtěžnosti reakce, vysoký obsah vede k tvorbě nespecifických produktů,
7. DNA bakterie – potenciálně obsažená ve zkoumaném vzorku, bez přidání vzorku nemá reakce smysl.⁸⁴

S připravenou směsí master mixu můžeme zahájit vlastní real-time PCR. Mikrozkušavky s master mixem vkládáme do přístroje termocyler, který pracuje ve třech základních teplotních krocích.

Teplotní fáze cyklu termocycleru:

1. denaturace – v první fázi cyklu dochází k vzestupu teploty na hodnotu, při které dochází k rozpletení komplementárních řetězců bakteriální DNA za vzniku dvou samostatných vláken, teplota se pohybuje v rozmezí 94 – 96 °C a trvá 20 - 30 s,
2. annealing - druhá fáze, trvající 20 - 40 s, je zahájena ochlazením reakční směsi na 50 – 64 °C, to je teplota při které nasedají primery na 3'konce jednotlivých vláken a také sondy, na primery pak nasedá DNA-polymeráza, ta je nyní připravena k poslednímu kroku,
3. elongace – třetí a nejdelší fází je započata vlastní syntéza nového řetězce komplementárního k původnímu vlákně, DNA-polymeráza připojuje jednotlivé deoxynukleotidy na příslušná místa a v místě navázání sondy ji štěpí a oddělí tak quencer a enhancer a je detekován signál, počet signálů odpovídá množství produktu, celá fáze trvá 5 - 15 min při teplotě 70 – 74 °C.³

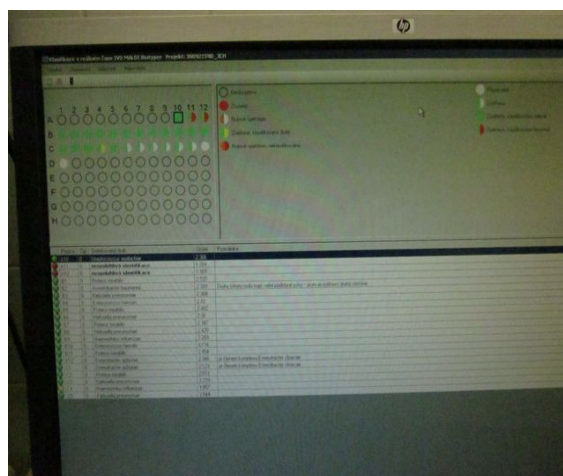
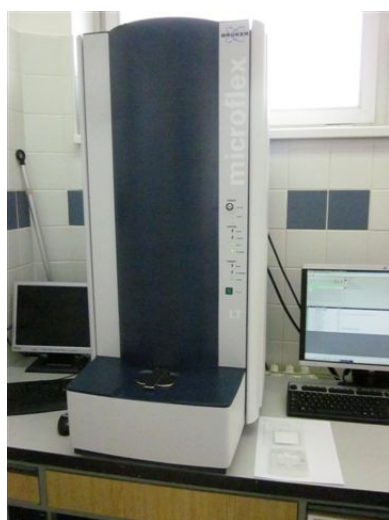
Celá real-time PCR reakce probíhá ve 30 - 35 cyklech, výhodou je, že na rozdíl od klasické PCR můžeme sledovat množství vznikajícího produktu. Záznamem této PCR je amplifikační křivka, jejíž exponenciální část slouží k přesné kvantifikaci. Výsledky tedy známe okamžitě a není nutné provádět následnou detekci PCR produktu.

6.6. MALDI – TOF

MALDI-TOF je metoda hmotnostní spektrometrie, která spojuje měkkou techniku ionizace MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization) s detektorem doby letu TOF (Time Of Flight).^{4,22} Prvním krokem při hmotnostní spektrometrii je ionizace. Rozlišujeme tvrdé a měkké techniky ionizace. Měkké techniky zahrnují např. elektronspray (ESI), chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI), MALDI. Měkké ionizační techniky mají nízkou ionizační energii a vytváří ion-molekulární a molekulární addukty. Mezi tvrdé techniky patří elektronová ionizace, kdy je vzorek ionizován elektrony

emitovanými z wolframového vlákna. MALDI je metoda při níž se vzorek rozpustí a smísí s vhodnou matricí, tato směs je pak ozářena krátkým pulsem laseru, dojde k ionizaci a odpaření matrice, která předá energii analyzovanému vzorku a tím dojde k ionizaci a desorpci iontů, které jsou zachyceny analyzátozem.²¹ Ve spojení s MALDI se využívá analyzátor TOF, protože při desorpci získají vzniklé ionty určitou rychlost, která závisí na poměru jejich hmotnosti k jejich náboji m/z . Ionty s menším poměrem m/z , ale stejnou kinetickou energií se budou v analyzátoru pohybovat rychleji, než ionty s vyšším poměrem m/z , doletí tedy k analyzátoru dříve. Podle doby, která uběhne od laserového výboje (za 10-100ns než dojde k předání energie), po fázi, kdy ion doletí k detektoru. Existují samozřejmě i další typy analyzátorů, např. kvadrupól, iontová past, aj., ale tyto se nehodí ke spojení s MALDI.¹⁴

Další součástí navazující na analyzátor je detektor. Nejčastěji užívaným je elektronový násobič, kdy ionty po dopadu na elektrodu vyrazí elektrony, a ty jsou dále znásobeny systémem dynod, celkově může dojít k zesílení až 10^8 . Dalším typem detektoru je fotonásobič, kdy ionty dopadají tentokrát na fosforovou destičku a tím vyrazí fotony, které jsou opět zesíleny systémem dynod ve finálním množství 10^5 . Třetím typem detektoru je Faradayova klec, zde se ionty vybíjí na sběrné elektrodě, a to vybíjí kondenzátor, což je úměrné počtu dopadajících iontů, tento typ je vhodný pro izotopy.⁷⁷ Poslední je počítač, který zpracuje data získaná ve formě hmotnostního spektra. MALDI – příloha 3



Obr 23 MALDI, zdroj obou obrázků: foto autor Obr 24 Záznam probíhajícího měření MALDI

7. Léčba

Cefalosporiny jsou pro léčbu kapavky antibiotiky první volby, řadíme je do skupiny betalaktamových ATB a ve své podstatě jsou velmi podobné penicilinům. Působí na syntézu bakteriální stěny. K léčbě kapavky využíváme II. a III. generaci. Zástupcem II. generace je cefuroxim, jehož výhodou je perorální podání v tabletách a III. generace cefotaxim, ten je podáván intravenózně, pacient tak musí docházet do nemocnice.¹⁵ Další možností je podání cefiximu, který se stejně jako cefuroxim podává perorálně.

Druhou skupinou hojně užívanou k léčbě gonorrhoe jsou fluorchinolony. Jsou to baktericidní antibiotika působící jako inhibitor DNA-gyrázy. Dělíme je do čtyř generací. K léčbě kapavky jsou využívány zejména fluorchinolony II. generace, jejímž zástupcem je ciprofloxacin.^{10,67}

Tetracykliny pronikají přes buněčnou stěnu a cytoplasmatickou membránu a inhibují syntézu proteinů, vylučují se žlučí a z části (asi 30 %) močí. K tetracyklinům se u *N.gonorrhoeae* vyvinula v posledních letech značná rezistence, která je často činí k léčbě kapavky méně vhodnými.¹⁶

Makrolidová antibiotika působí na proteosyntézu bakterií, vazbou na 50S ribozomální podjednotku.⁴⁷ Působí bakteriostaticky a na určité bakterie baktericidně. Aby se nerozložily v žaludku, podávají se ve formě kapslí, které se vstřebávají v horní části tenkého střeva. Z jejich zástupců se k léčbě kapavky využívá hlavně azitromycin.⁴⁰

Betalaktamová antibiotika, se zástupcem penicilinem, mají ve své struktuře betalaktamový kruh. Mnoho kmenů *N.gonorrhoeae* tvoří enzym betalaktamázu a laktamový kruh štěpí.⁴⁶ Peniciliny s inhibitorem betalaktamázy (amoxicilin s kyselinou klavulanovou, ampicilin se sulbaktamem) jsou nevhodné při rezistenci jiné než způsobené betalaktamázu.

Aminoglykosidy jsou baktericidní antibiotika, pro léčbu kapavky se využívá jejich zástupce spektinomycin, který vazbou na ribozomální podjednotku inhibují syntézu bílkovin, podává se injekčně (nejčastěji i.v., ale i.m. se vstřebávají také dobře), obzvláště jsou-li pacienti alergičtí na penicilín.^{15,16}

Většinou se léčba podává intra venózně nebo intra muskulárně, méně perorálně v jednorázové dávce u nekomplikované urogenitální, rektální, faryngeální kapavky a u kapavky dětí a v graviditě. Léčbu 5 – 7 dní vyžaduje

ophtalmogonorrhoea, ascendentní kapavka vyžaduje léčbu kombinací antibiotik a diseminovaná kapavčitá infekce se léčí až 7 dní. Gonorrhoea je onemocnění podléhající povinnému hlášení výskytu. Pacient musí být poučen a potvrdit, že dodrží zákaz pohlavního styku a musí být vyšetřeni sexuální partneři pacienta. Po léčbě podstupuje pacient za 3 – 7 dní kontrolní odběr na kultivaci. Celkem se provádí 3x (u žen je dobré jednou během menstruace). Jsou-li kultivace negativní lze pacienta prohlásit za vyléčeného. Samozřejmě se při užívání antibiotik doporučuje současně užívat podpůrné přípravky, které zabrání rozvratu střevní mikroflóry.⁴⁵

Volbu antibiotik je třeba vzhledem k vzrůstající rezistenci *N.gonorrhoeae* důkladně zvážit. K rozhodnutí nám pomáhá stanovení citlivosti na antibiotika. Tak zjistíme, které antibiotikum je pro konkrétní kmen od určitého pacienta nejvhodnější. Ve Fakultní nemocnici Brno se testuje citlivost k sedmi druhům antibiotik a to na penicilin, cefuroxim, tetracyklin, ciprofloxacin, cefotaxim, azitromycin a spektinomycin.

Prevence onemocnění

Prevence nákazy kapavkou vychází z rizikových faktorů jejího přenos. Těmito faktory jsou:

- promiskuita
- náhodný styk s neznámou osobou (popř. rizikovou)
- nepoužívání základních ochranných pomůcek (kondomy)
- prostituce

Prevenčí je tedy, než sexuální abstinence, především zodpovědný přístup k sexuálnímu chování, věrnost, snížení počtu sexuálních partnerů či náhodných pohlavních styků s neznámými či rizikovými jedinci (uživatelé drog), popř. důsledné dodržování zásad bezpečného sexu. Z hlediska primární prevence je také důležitá osvěta mládeže v této oblasti.⁷²

U dětí infikovaných matek je prevencí včasné zaléčení matky, při narození jakéhokoli dítěte se jako prevence nákazy provádí tzv. kredeizace – každému

dítěti se do očí nakape dezinfekční prostředek. Dříve používaný dusičnan stříbrný byl nahrazen Ophtalmo septonexem či jodovými preparáty.⁸⁹

Prevence pomocí očkování není možná, není dostupná vakcína a ani prodělané onemocnění nezanechává imunitu. Sekundární prevencí, tedy je-li pacient již nakažen nebo byl ve styku s rizikovou osobou, je včasná a správná diagnostika a zahájení léčby vhodnými, účinnými antibiotiky a velmi podstatná je i compliance pacienta a sexuální abstinence, aby bylo zabráněno nakažení dalších osob.

Výskyt kapavky u pacienta podléhá povinnému hlášení. Odpovědnost za hlášení závisí na jednotlivých pracovištích. Ve FN Brno hlášení provádí ošetřující lékař na příslušné hygienické oddělení, v Hradci Králové hlášení provádí lékaři oddělení mikrobiologie na speciálních červených hlášenkách. Povinnost hlásit jednotlivé případy kapavky vychází ze zákona, hlášení je ošetřeno v těchto zákonech:

Zákon o péči o zdraví lidu č. 20/1966 Sb. ve znění pozdějších předpisů

Zákon o ochraně veřejného zdraví č. 258/2000

Vyhláška MZ ČR č. 195/2005 Sb. Podmínky předcházení vzniku a šíření infekčních onemocnění

Směrnice č. 30/1968 Věstníku MZ ČR o opatření proti pohlavním nemocem

Vyhláška MZ ČR a metodická opatření MZ ČR „Standardy léčebných a vyšetřovacích postupů“ z prosince 1977

Výskyt kapavky:

České republika

V roce 2011 bylo hlášeno 709 případů kapavky na území České republiky. V roce 2008 poklesl počet případů kapavky z 11 na 8 na 100 000 obyvatel a dlouhodobě se drží na 7 případech na 100 000 obyvatel. Až z 90 % ze 709 případů se jednalo o primoinfekci, vzrostl také podíl nakažených cizinců na území ČR o čtvrtinu (87 případů). Je výrazně vyšší podíl nakažených mužů oproti ženám, 10/100 000 případů u mužů ku necelým 4/100 000 u žen. Věková skupina, která byla nejvíce postižena výskytem případů kapavky byla 20-24 let, naopak ve vyšších věkových skupinách klesá. V rámci republiky byl nejvyšší výskyt kapavky v Praze, na druhém místě je Jihomoravský kraj.

Větší studie o vzestupu rezistence byla provedena v nemocnici v Ostravě. V tabulce jsou shrnuty výsledky této studie.³⁴

Tabulka č.2 Výskyt a vlastnosti fenotypů rezistence (event. snížené citlivosti) *N. gonorrhoeae*: rozmezí MIC v mg/l a produkce β-laktamázy.

fenotyp rezistence	penicilin	tetracyklin	ciprofloxacin	azitromycin	ceftriaxon	β+ počet (%)	počet (%)
CMRNG	2	1 – 1,5	>32	0,25 – 0,5	0,023 – 0,047	0	2 (1,8)
PPNG	24 ->32	8	2 -3	0,047 – 0,064	0,006 – 0,012	2 (1,8)	2 (1,8)
TRNG	0,023 - >32	3 – 32	<0,002 - 3	0,023 -0,19	0,002 – 0,064	2 (1,8)	13 (11,8)
ARNG	0,75 - 1	0,75 - 1	>32	4 – 8	0,016 – 0,047	0	2 (1,8)
QRNG	0,064 - >32	0,19 - 8	0,094 - >32	0,047 - 8	0,002 – 0,19	2 (1,8)	54 (49,1)
Cef	1	0,75 - 1	12 - >32	0,025 – 0,5	0,064 – 0,19	0	5 (4,5)

I evropské země čelí problémům s léčbou kapavky, vycházející z její vzrůstající rezistence k antibiotikům. Pro příklad uvedu statistické údaje z několika vybraných Evropských zemích.

Švédsko v roce 2011 zaznamenalo zvýšení počtu případů kapavky o 48 % od roku 2006, tím se zvýšil počet případů na 100 000 obyvatel ze 7,1 na 10/100 000. Věková skupina s největším počtem případů byla u žen 15 – 24 let a u mužů 25 – 34 let. Rezistence na ampicilin ze všech izolátů (951) se pohybovala v rozmezí 24 – 44 % , na ciprofloxacin 55 -75 %, na azitromycin 6 – 13 %, na cefixime vzrostla rezistence z méně než 1 % na 8 % a na ceftriaxon z 0 % na 2 %. Spektinomycin si zachoval citlivost u všech izolátů.⁷¹

V Německu bylo v roce 2006 testováno 98 izolátů a výsledkem bylo zjištění, že 8 % kmenů bylo rezistentních na azitromycin, žádný nebyl rezistentní na ceftriaxonu 5 % se sníženou rezistencí k ciprofloxacinu, z testovaných izolátů mělo 46 % chinolon rezistentní fenotyp, 11 % mělo chromozomálně kódovanou rezistenci, 1 % penicilin rezistentní, 5 % tetracyklin rezistentní fenotyp a kombinovaný fenotyp penicilin/tetracyklin rezistentní *N. gonorrhoeae* 16,3 %.

V Itálii bylo v roce 2006 testováno 42 izolátů, zde byla rezistence na azitromycin (9,5 %), ceftriaxon (4,8 %) a 4,8 % se sníženou citlivostí k

ciprofloxacinu. Fenotypy rezistence CMRNG – 9,5 %, PPNG – 9,5 %, QRNG – 33,3 %, TRNG – 0 % a kombinovaný fenotyp PPNG/TRNG – 0 %.⁴⁸

K rozšíření rezistentních gonokoků se sníženou citlivostí k cefalosporinům došlo v severním Řecku. Bylo otestováno 195 kmenů v období prosinec 2006 až leden 2008 na citlivost k antibiotikům, 17 izolátů mělo MIC cefotaximu 0,25 – 1 mg/l na rozdíl od ostatních izolátů s rozmezím MIC 0,002 – 0,125 mg/l, proto bylo testování rozšířeno i na jiné cefalosporiny a zjistili tak, že MIC bylo zvýšeno i u cefiximu a cefotaximu a objevila se vysoká rezistence k cefuroximu, cefoxitinu, ceftazidimu a cefipimu.⁶⁸

Tabulka č.3 Antimicrobial susceptibility profile of 17 CEDS gonococci^a

Antimicrobial agent	Susceptibility breakpoints (mg/L)^b	MIC range (mg/L)	MIC₅₀ (mg/L)	MIC₉₀ (mg/L)
Penicillin G	R: ≥2, S: ≤0.06	2–4	2	4
Cefotaxime	S: ≤0.5	0.25–1	0.5	1
Ceftriaxone	S: ≤0.25	0.064–0.125	0.125	0.125
Cefoxitin	R: ≥8, S: ≤2	2–4	4	4
Cefuroxime	R: ≥4, S: ≤1	32–64	32	64
Cefepime	S: ≤0.5	2–8	4	8
Ceftazidime	S: ≤0.5	0.5–2	2	2
Cefixime	S: ≤0.25	0.125–0.25	0.125	0.25
Cefalotin	—	32–64	64	64
Aztreonam	—	2–8	4	4
Ciprofloxacin	R: ≥1, S: ≤0.06	>32	>32	>32
Norfloxacin	R: ≥1, S: ≤0.25	32–64	64	64
Spectinomycin	R: ≥128, S: ≤32	8–16	16	16
Tetracycline	R: ≥2, S: ≤0.25	1–2	2	2
Erythromycin	R: ≥2, S: ≤0.25	2–4	2	4
Azithromycin	R: ≥1, S: ≤0.125	1–2	1	2
Chloramphenicol	R: ≥2, S: ≤0.25	4–8	8	8

• ^aAntibiotic susceptibility testing was performed on GC agar supplemented with Vitox. MICs of β-lactam antibiotics were determined in triplicate.

• ^bSusceptibility breakpoints are those of the CLSI,⁶ except for norfloxacin, erythromycin, azithromycin and chloramphenicol, for which generally accepted criteria were used. For classification in susceptibility categories according to these criteria, Etest MIC values lying between two marginal concentrations are rounded to the nearest highest concentration.

V USA probíhá monitorování citlivosti gonokoků od roku 1986. V roce 2010 byly testované izoláty rezistentní k penicilinu, tetracyklinu a ciprofloxacinu,

některé (6,9 %) byly kombinovaně rezistentní ke všem třem. K léčbě nejsou doporučovány peniciliny, tetracykliny a fluorochinolony, preferuje se duální terapie, kombinující injekčně (i.m.) podávané cefalosporiny a perorálně podávaný azitromycin, vše v 1 dávce.⁴⁴

Ve studii publikované roku 2011 je pojednáváno o novém kmeni vysoce rezistentním na cefixim a ceftriaxon objeveném ve Francii. Tento kmen byl označen F89 (MLST ST 1901) a obsahuje mozaikovou alelu genu penA, která nebyla doposud u neisserií popsána. Tento genetický podnět propouští tomuto kmeni značnou rezistenci k antibiotikům. U cefiximu došlo ke zvýšení MIC mezi 8 a 500 krát z 0,25 na 2 – 8 mg/l a u ceftriaxonu 31 – 500 krát z 0,25 na 0,5 – 4 mg/l. Tento kmen také vykazuje rezistenci k dříve používaným antibiotikům k léčbě kapavky a to k makrolidům, tetracyklinům, fluorochinolonom, aj., ale má nízkou úroveň rezistence k penicilinům, karbapenemům, ampicilinu, neprodukuje totiž žádnou betalaktamázu.⁶⁹

Studie provedená v Tel Avivu v Izraeli v roce 2000 testovala citlivost 100 izolátů gonokoků k penicilinu, tetracyklinu, ciprofloxacinu, ceftriaxonu a spektinomycinu. Spektinomycin a ceftriaxon měly 100 % citlivost, ciprofloxacin 61 % rezistence, 3 % intermediální a 36 % citlivý, tetracyklin 8 % rezistence, 66 % intermediální a 26 % citlivý a penicilin 16 % rezistence, 73 % intermediální a 11 % citlivý.³⁸

Tabulka č. 4 Antibiotická citlivost 100 izolátů *N. gonorrhoeae* Tel Aviv, Izrael

Antimicrobial agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^a			Distribution (%)		
	50%	90%	Range	Susceptible	Intermediate	Resistant
Penicillin	1.0	2.0	0.016-64.0	11	73	16
Tetracycline	1.0	2.0	0.032-2.0	26	66	8
Ciprofloxacin	4.0	8.0	0.002-16.0	36	3	61
Ceftriaxone	0.016	0.032	0.016-0.032	100	0	0
Spectinomycin	NA ^b	NA	NA	100	0	0

^a 50% and 90%, MICs at which 50 and 90% of isolates are inhibited, respectively.

^b NA, not applicable; the disk diffusion test was used.

Snižující se citlivost k cefiximu 2010 a léčné selhání cefiximem 2010 – 2012 v Evropě – příloha 4.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8. Materiál

8.1. Zpracování klinického materiálu

Práce vychází z retrospektivní analýzy dat z laboratorního informačního systému OKM FN Brno a spádových oblastí za období posledních 15 let, tedy od roku 1998 do roku 2012. Do zpracování byly zařazeny klinické izoláty *N. gonorrhoeae* a to vždy první izolát od pacienta.

Materiál byl do laboratoře Oddělení klinické mikrobiologie (OKM) Fakultní nemocnice Brno dodáván přepravní službou od praktických lékařů ze spádových oblastí nebo od ambulantních i hospitalizovaných pacientů FN Brno. Po kontrole preanalytické fáze pracovníci příjmu materiálu jsou vzorky předány laborantce ke zpracování dle SOP (standardního operačního postupu) OKM FN Brno.

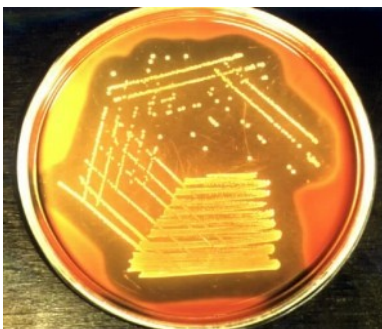
Nátěr na mikroskopickém podložním sklíčku byl barven metodou dle Grama.

Materiál na vyšetření *N. gonorrhoeae* byl očkovan na krevní agar, MacConkeyho agar, Č3 agar (čokoládový) a selektivní agar pro neisserie – GC.⁷⁸

Materiál z tampónu byl inokulován na půdy specifickým způsobem, misky byly označeny číslem vzorku a datem inokulace.

- tamponem bylo nanášeno husté inokulum
- z hustého inokula byly rozočkovány několika čarami ke straně stěny misky
- bylo otočeno očko kličky a několika čarami byl zopakován předešlý krok
- poté byla použita nová vyžíhaná a zchlazená klička a z předchozích čar byly opět vedeny další čáry
- otočením kličky byla dokončena poslední série čar a ukončena hádkem
- přes husté inokulum byla vedena čára *Staphylococcus aureus*
- u KA byl umístěn mimo čáru disk s amikacinem
- agary byly inkubovány 18 – 24 h při 35 – 37 °C v prostředí 5 – 8 % CO₂⁷⁸

Obr.č.x Příklad správného
rozočkování materiálu na
agar



MacConkey agar: - byl inkubován za běžné atmosféry 18 – 24 h při 35 – 37 °C²⁶

GC agar: - byl inkubován 42 – 48 h při 35 – 37 °C v prostředí 5 – 8 % CO₂, kontrolujeme i po 24 h

Čokoládový agar: - byl inkubován 42 – 48 h při 35 – 37 °C v prostředí 5 – 8 % CO₂, kontrolujeme i po 24h

Vzhled kolonií *N.gonorrhoeae* na těchto agarech je bílošedé barvy, s granulací, velikost 1 – 2 mm, kruhové s laločnatými či celistvými okraji, neprůhledné a po 48 h inkubace i mukoidní. Senzitivita kultivace je 70 % u obou pohlaví ⁷⁸

Vzorky, očkování a inkubace – příloha 2

Real-time PCR byl prováděn u klinických vzorků (nikoli z kultury) v případě, kdy je např. vlivem užívání nevhodných antibiotik ovlivněna životaschopnost bakterií a nedošlo by tak k nárůstu bakterie na kultivačních půdách. Touto metodou byla identifikována přítomnost DNA neisserie i když bakterie již není viabilní.

8.2. Identifikace kmenů

Podezřelé kolonie s charakteristickým růstem na čokoládovém a GC agaru byly zkontrolovány mikroskopicky. Byl proveden oxidázový a katalázový test a u všech kmenů provedena biochemická identifikace Neisseria testem firmy Lachema.

Metodika MALDI-TOF byla používána pro identifikaci podezřelých kolonií a pro ověření výsledku biochemie a pro zkrácení času do vydání výsledku.

8.3.Stanovení citlivosti

Ke stanovení citlivosti *N. gonorrhoeae* byla použita metoda diskového difuzního testu. Inokulum bylo očkováno na čokoládový agar Č3

(základ od firmy Columbia Agar Merck), výrobu agarů na Petriho miskách provádí oddělení OKM FN Brno). Ke stanovení citlivosti byly použity disky firmy OXOID o síle – tetracyklin – 30 µg, ciprofloxacin – 5 µg, azitromycin – 15 µg, spektinomycin – 100 µg, cefuroxim 30 µg . Poté byly misky inkubovány 18 – 24 – 48 hodin v termostatu při 35 ± 2 °C při zvýšené tenzi CO₂. Vyšetření dle SOP odečítáno po 24 – 48 hodinách. Po uběhnutí doby inkubace byly měřeny pravítkem průměry inhibičních zón daných antibiotik a tento průměr byl srovnáván s hraničním průměrem zóny inhibice citlivých kmenů, který je stanoven dle EUCAST. Byl-li průměr větší než hraniční hodnota, byl kmen hodnocen jako citlivý, byl-li hraniční hodnotíme jej jako intermediální, byl-li průměr menší jedná se o kmen rezistentní.⁸⁷

Ke stanovení minimální inhibiční koncentrace MIC penicilinu a cefotaximu byla použita kvantitativní metoda E-testu OXOID, provedená na čokoládovém agaru Č3 (základ od firmy Columbia Agar Merck, výrobu agarů na Petriho miskách provádí oddělení OKM FN Brno). Kultivace probíhala dnem vzhůru, 18 – 24 h v 5 – 8 % prostředí CO₂ při 35 ± 2 °C se zvýšenou tenzí CO₂.

Hodnota minimální inhibiční koncentrace byla odečítána v místě protnutí inhibiční zóny a proužku, ze stupnice vyčíslené na proužku. Hodnota MIC byla porovnávána s hraničním průměrem zóny inhibice citlivých kmenů stanovených dle EUCAST. Byl-li průměr větší než hraniční hodnota, byl kmen hodnocen jako citlivý. Byl-li hraniční kmen byl hodnocen jako intermediální, byl-li průměr menší jednalo se o kmen rezistentní.⁸⁶

8.4. Vyšetření produkce betalaktamázy pomocí nitrocefinového testu

U všech kolonií byl proveden nitrocefinový test. Změna barvy ze žluté na červenou byla hodnocena jako pozitivní, *N. gonorrhoeae* byla producentem betalaktamázy. Jako negativní je hodnocen kmen *N. gonorrhoeae* nedošlo-li ke změně barvy a terčík zůstal žlutý.

9. Výsledky

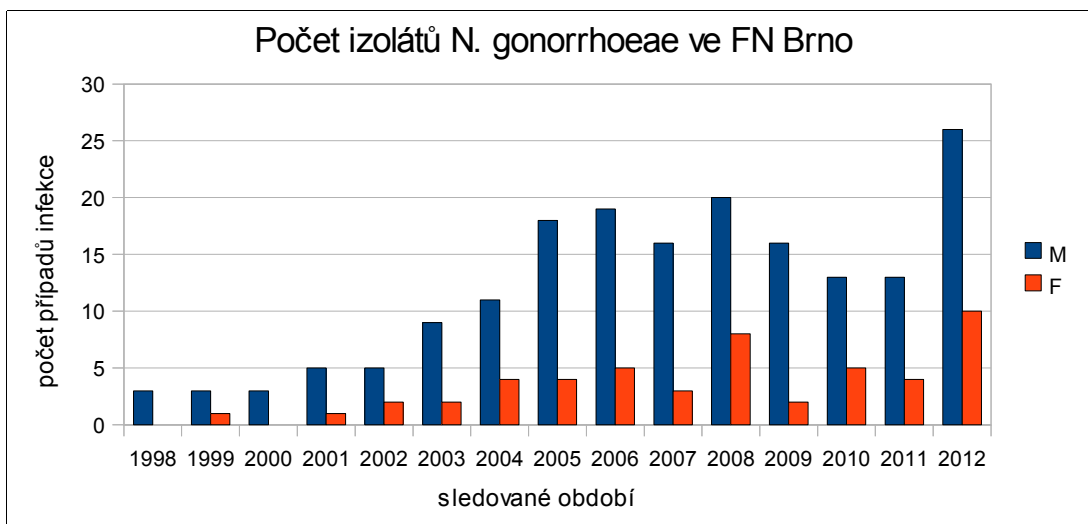
Ve sledovaném období 1998 – 2012 bylo ve FN Brno zachyceno 231 kmenů.

9.1. Počet vyšetření

V tabulce 5 a grafu 5 je znázorněn výskyt izolátů v letech 1998-2012 v rozdělení podle pohlaví. Větší výskyt onemocnění u mužů (celkem 180 izolátů u mužů oproti 51 kmenů u žen).

Tabulka č. 5 Výskyt izolátů u mužů a žen ve FN Brno v letech 1998 - 2012

	muži	ženy
1998	3	0
1999	3	1
2000	3	0
2001	5	1
2002	5	2
2003	9	2
2004	11	4
2005	18	4
2006	19	5
2007	16	3
2008	20	8
2009	16	2
2010	13	5
2011	13	4
2012	26	10
celkem	180	51



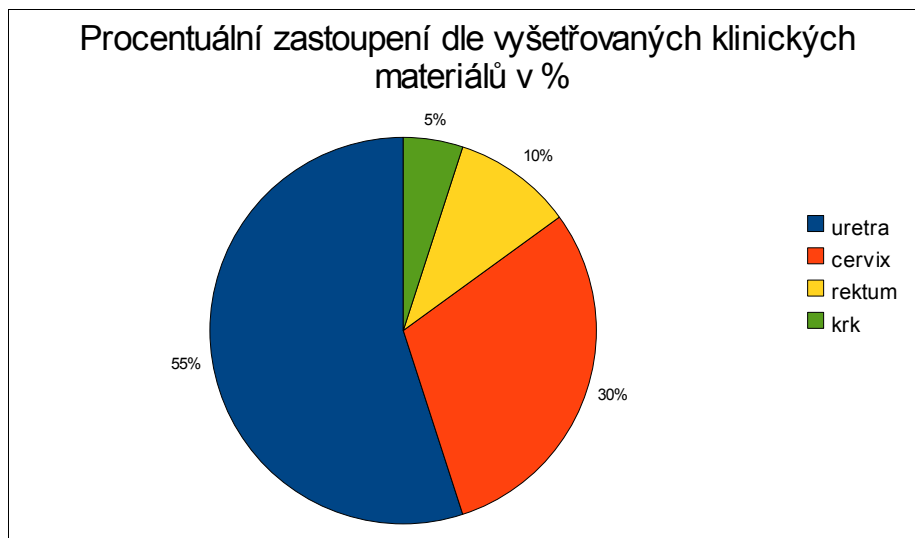
Graf č. 5 Výskyt izolátů *N. gonorrhoeae* ve FN Brno v letech 1998 – 2012, rozděleno podle pohlaví.

9.2. Rozdělení dle klinických materiálů

V tabulce 6 a grafu 6 vidíme záchyt kmenů *N. gonorrhoeae* v jednotlivých klinických materiálech celkově za celé období 1998-2012. Materiál s nejvyšším procentem záchytu (55 %) byl výtěr z uretry.

Tabulka č. 6 Výskyt izolátů *N. gonorrhoeae* ve vyšetřovaných klinických materiálech v % ve FN Brno celkově za období 1998 - 2012

Materiál	%
uretra	55
cervix	30
rektum	10
krk	5



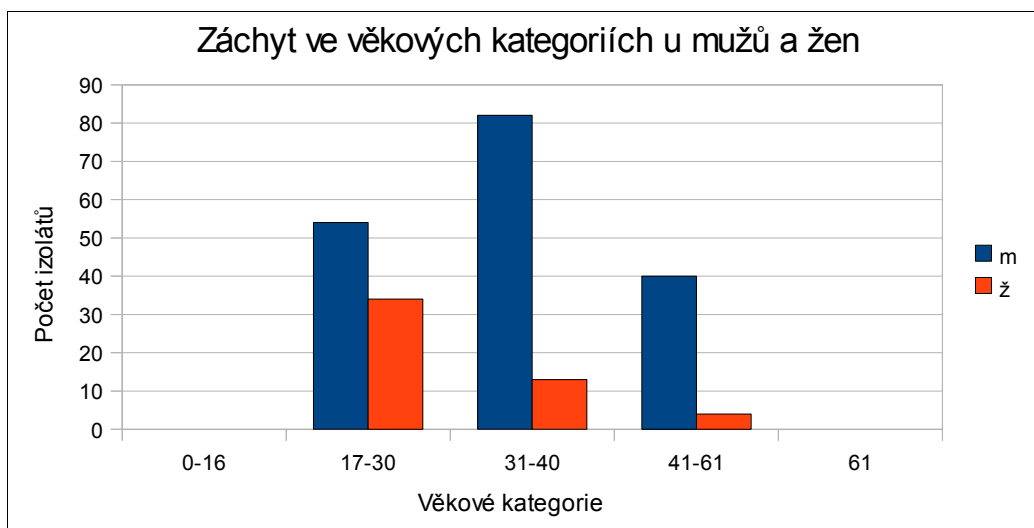
Graf č 6. Výskyt izolátů *N. gonorrhoeae* ve vyšetřovaných klinických materiálech v % ve FN Brno za období 1998 – 2012

9.3. Záchyt *N. gonorrhoeae* ve věkových skupinách

Rozdělení klinických izolátů *N. gonorrhoeae* podle věkových skupin zachycuje graf 7 a tabulka 7. Věkovou skupinou s nejvyšším záchytem je 31 – 40. Ve sledovaném časovém období nebyl zaznamenán žádný případ u dětí do 16 let.

Tabulka č. 7 Záchyt *N. gonorrhoeae* ve věkových skupinách u mužů a žen ve FN Brno v letech 1998 - 2012

Věkové kategorie	0 - 16	17 - 30	31 - 40	41 – 61	> 61
muži	0	54	82	40	0
ženy	0	34	13	4	0

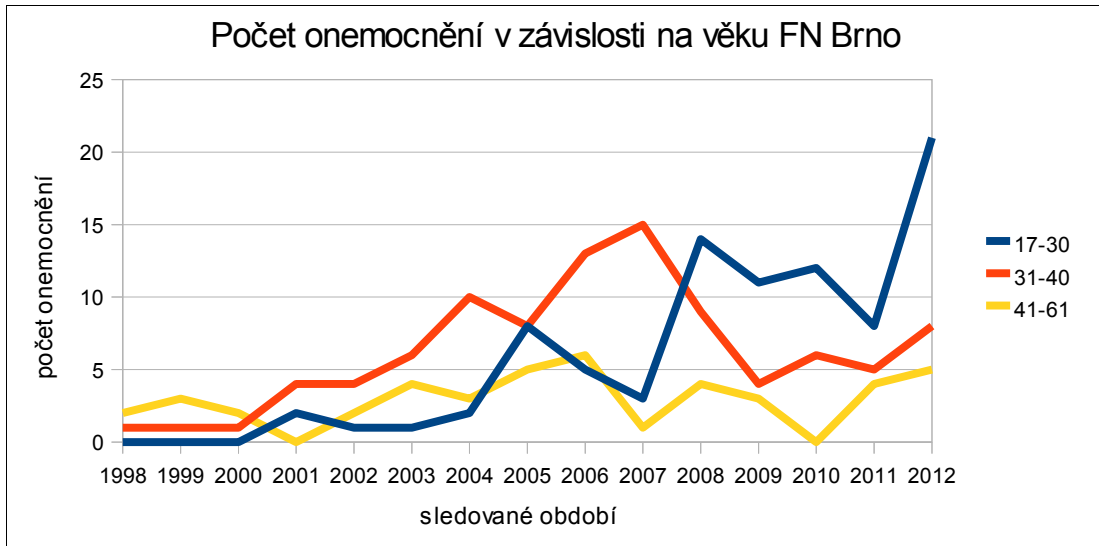


Graf č. 7 Záchyt *N. gonorrhoeae* ve věkových skupinách u mužů a žen ve FN Brno za období 1998 - 2012

Tabulka č. 8 a graf č. 8 zobrazují vývoj incidence kapavky v jednotlivých věkových skupinách v letech 1998-2012. V průběhu let se zvyšuje podíl záchytu ve věkové skupině 17-30 let.

Tabulka č.8 Souhrn záchytu *N. gonorrhoeae* ve věkových skupinách ve FN Brno za období 1998 - 2012

Riziková sk.	17-30	31-40	41-61
1998	0	1	2
1999	0	1	3
2000	0	1	2
2001	2	4	0
2002	1	4	2
2003	1	6	4
2004	2	10	3
2005	8	8	5
2006	5	13	6
2007	3	15	1
2008	14	9	4
2009	11	4	3
2010	12	6	0
2011	8	5	4
2012	21	8	5



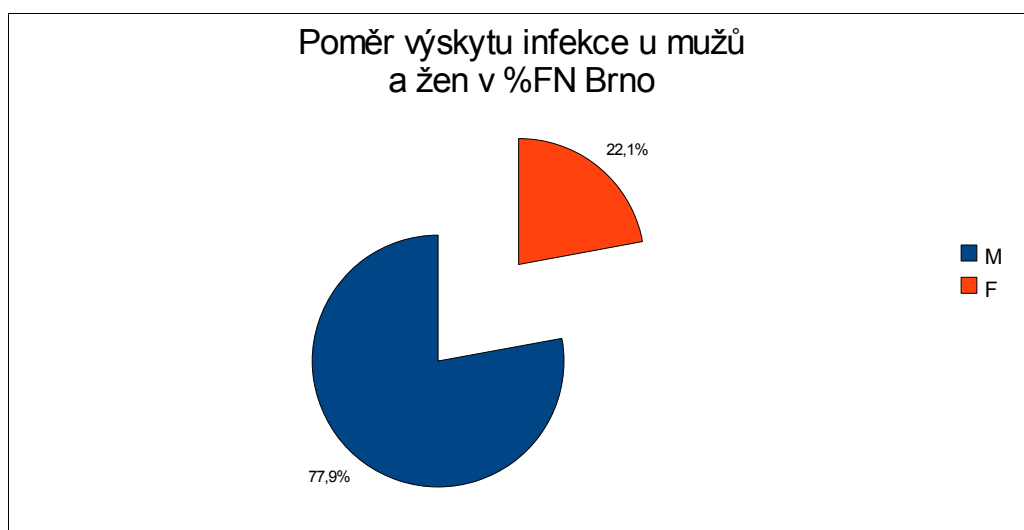
Graf č.8 Souhrn záchytu *N. gonorrhoeae* ve věkových skupinách ve FN Brno za období 1998 - 2012

9.4. Zastoupení mužů a žen

V následující tabulce č.9 a grafu č.9 jsou data celkové incidence v rozdělení podle pohlaví. Celkový počet izolátů *N. gonorrhoeae* je vyšší u mužů.

Tabulka č.9 Počet izolátů u mužů a žen ve FN Brno v letech 1998 – 2012 v %

FN Brno	muži	ženy
%	77,9	22,1
počet	180	51



Graf č.9 Počet izolátů u mužů a žen ve FN Brno v letech 1998 – 2012 v %

9.5. Rezistence na ATB

Tabulky a grafy č.10-17 zobrazují vývoj citlivosti *N. gonorrhoeae* na ATB v letech 1998-2012.

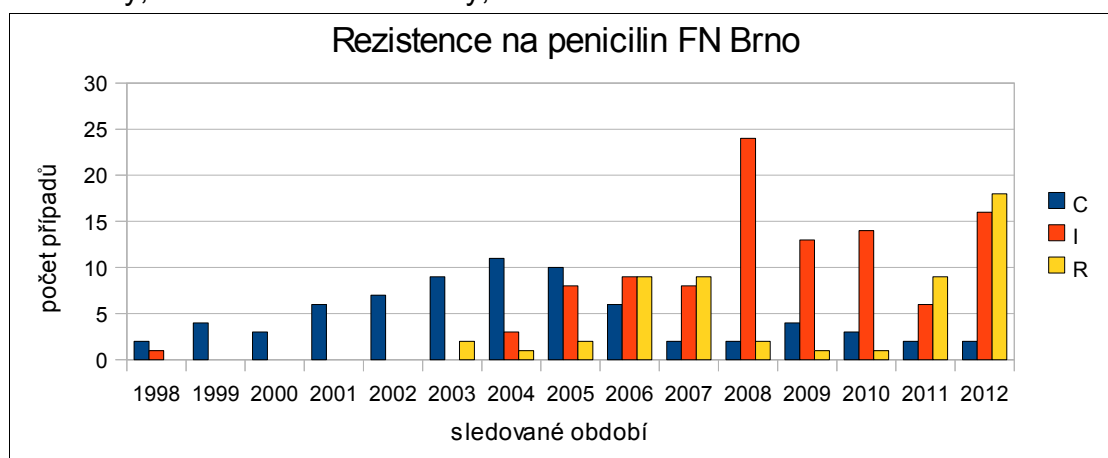
9.5.1. Penicilin

Tabulka č.10 Počet kmenů citlivých na penicilin ve FN Brno za období

1998 - 2012

Penicilin	Počet C	%	Počet I	%	Počet R	%
1998	2	66,7	1	33,3	0	0
1999	4	100	0	0	0	0
2000	3	100	0	0	0	0
2001	6	100	0	0	0	0
2002	7	100	0	0	0	0
2003	9	81,8	0	0	2	18,2
2004	11	73,3	3	20	1	6,7
2005	10	50	8	40	2	10
2006	6	25	9	37,5	9	37,5
2007	2	10,5	8	42,1	9	47,4
2008	2	7,15	24	85,7	2	7,15
2009	4	22,2	13	72,2	1	5,6
2010	3	16,6	14	77,8	1	5,6
2011	2	11,8	6	35,3	9	52,9
2012	2	5,6	16	44,4	18	50

C – citlivý, I – intermediálně citlivý, R - rezistentní



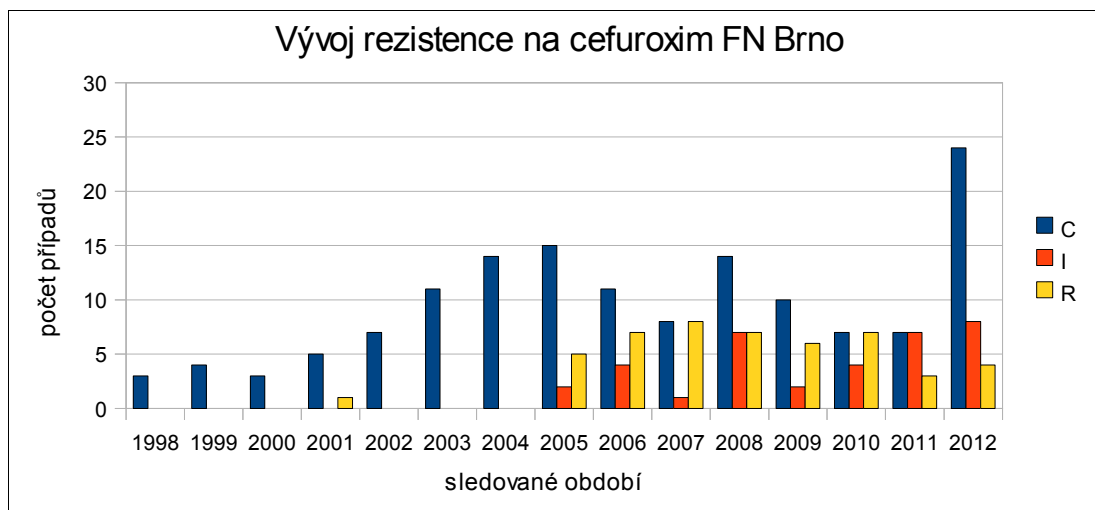
Graf č. 10 Vývoj rezistence na penicilin ve FN Brno za období 1998 - 2012

9.5.2. Cefuroxim

Tabulka č. 11 Počet kmenů citlivých na cefuroxim ve FN Brno za období 1998 - 2012

Cefuroxim	Počet C	%	Počet I	%	Počet R	%
1998	3	100	0	0	0	0
1999	4	100	0	0	0	0
2000	3	100	0	0	0	0
2001	5	83,3	0	0	1	16,7
2002	7	100	0	0	0	0
2003	11	100	0	0	0	0
2004	14	100	0	0	0	0
2005	15	68,2	2	9,1	5	22,7
2006	11	50	4	18,2	7	31,8
2007	8	47,1	1	5,8	8	47,1
2008	14	50	7	25	7	25
2009	10	55,5	2	11,1	6	33,4
2010	7	38,9	4	22,2	7	38,9
2011	7	41,2	7	41,2	3	17,6
2012	24	66,7	8	22,2	4	11,1

C – citlivý, I – intermediálně citlivý, R – rezistentní



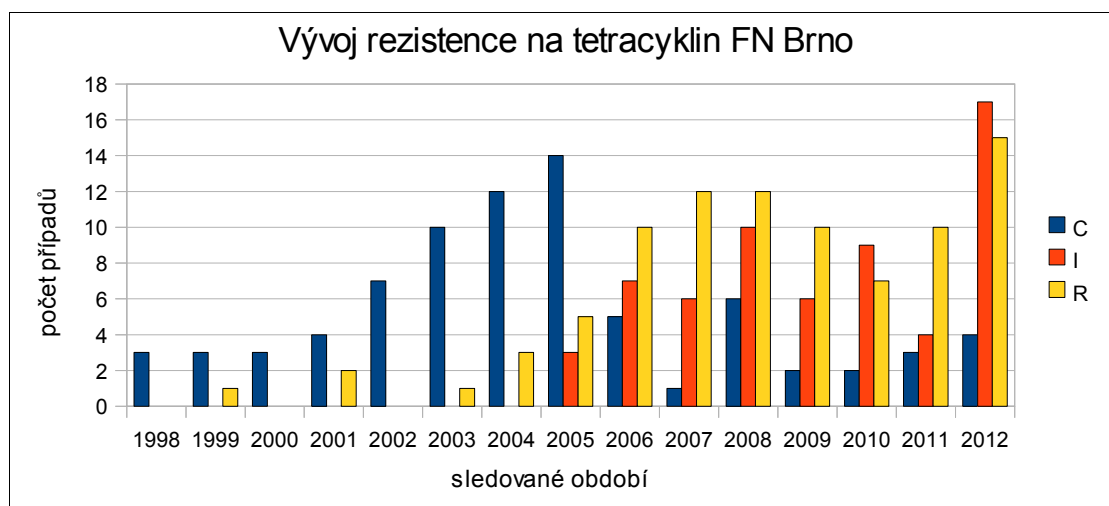
Graf č. 11 Vývoj rezistence na cefuroxim ve FN Brno za období 1998 – 2012

9.5.3. Tetracyklin

Tabulka č. 12 Počet kmenů citlivých na tetracyklin ve FN Brno za období 1998 - 2012

Tetracyklin	Počet C	%	Počet I	%	Počet R	%
1998	3	100	0	0	0	0
1999	3	75	0	0	1	25
2000	3	100	0	0	0	0
2001	4	66,7	0	0	2	33,3
2002	7	100	0	0	0	0
2003	10	90,9	0	0	1	9,1
2004	12	80	0	0	3	20
2005	14	63,7	3	13,6	5	22,7
2006	5	22,7	7	31,8	10	45,5
2007	1	5,2	6	31,6	12	63,2
2008	6	21,4	10	35,7	12	42,9
2009	2	11,1	6	33,3	10	55,6
2010	2	11,1	9	50	7	38,9
2011	3	17,7	4	23,5	10	58,8
2012	4	11,1	17	47,2	15	41,7

C – citlivý, I – intermediálně citlivý, R – rezistentní



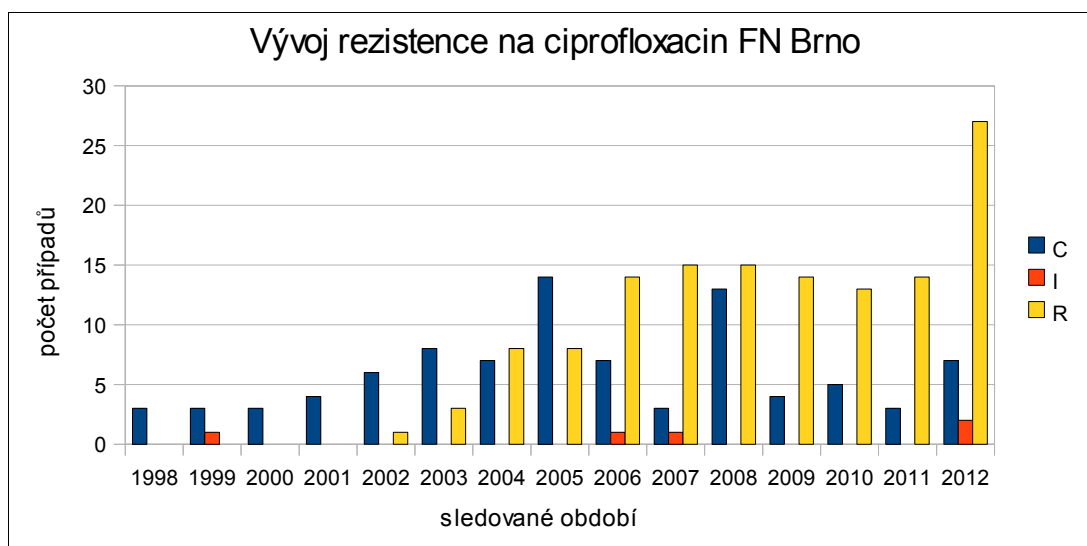
Graf č. 12 Vývoj rezistence na tetracyklin ve FN Brno za období 1998 - 2012

9.5.4. Ciprofloxacin

Tabulka č. 13 Počet kmenů citlivých na ciprofloxacin ve FN Brno za období 1998 - 2012

Ciprofloxacin	Počet C	%	Počet I	%	Počet R	%
1998	3	100	0	0	0	0
1999	3	75	1	25	0	0
2000	3	100	0	0	0	0
2001	4	100	0	0	0	0
2002	6	85,7	0	0	1	14,3
2003	8	72,7	0	0	3	27,3
2004	7	46,7	0	0	8	53,3
2005	14	63,6	0	0	8	36,4
2006	7	31,8	1	4,5	14	63,7
2007	3	15,8	1	5,3	15	78,9
2008	13	46,4	0	0	15	53,6
2009	4	22,2	0	0	14	87,8
2010	5	27,8	0	0	13	72,2
2011	3	17,6	0	0	14	82,4
2012	7	19,4	2	5,6	27	75

C – citlivý, I – intermediálně citlivý, R – rezistentní



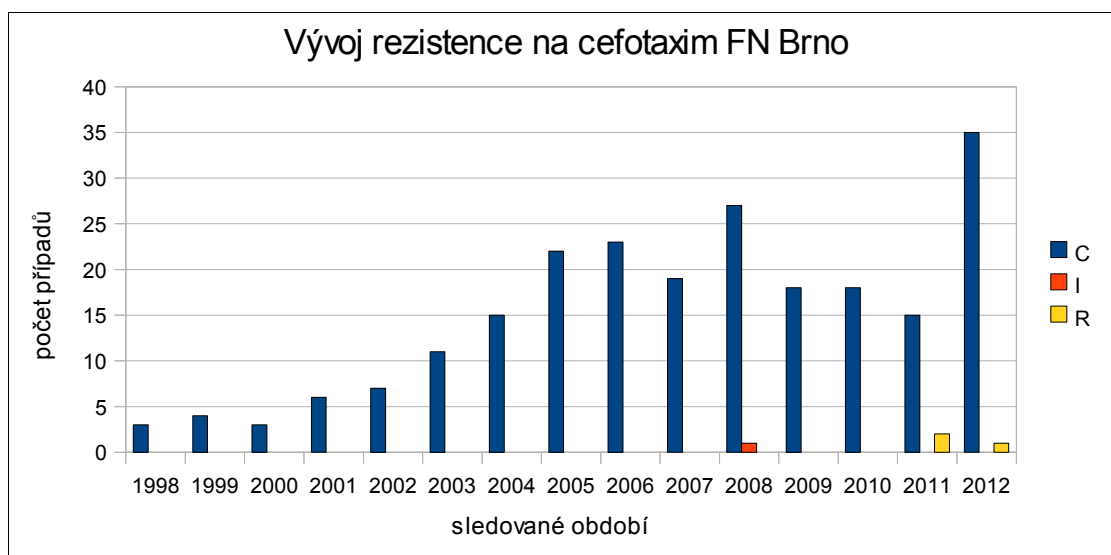
Graf č. 13 Vývoj rezistence na ciprofloxacin ve FN Brno za období 1998 – 2012, 75 % rezistence k ciprofloxacinu 2012.

9.5.5. Cefotaxim

Tabulka č. 14 Počet kmenů citlivých na cefotaxim ve FN Brno za období 1998 - 2012

Cefotaxim	Počet C	%	Počet I	%	Počet R	%
1998	3	100	0	0	0	0
1999	4	100	0	0	0	0
2000	3	100	0	0	0	0
2001	6	100	0	0	0	0
2002	7	100	0	0	0	0
2003	11	100	0	0	0	0
2004	15	100	0	0	0	0
2005	22	100	0	0	0	0
2006	23	100	0	0	0	0
2007	19	100	0	0	0	0
2008	27	96,4	1	3,6	0	0
2009	18	100	0	0	0	0
2010	18	100	0	0	0	0
2011	15	88,2	0	0	2	11,8
2012	35	97,2	0	0	1	2,8

C – citlivý, I – intermediálně citlivý, R – rezistentní



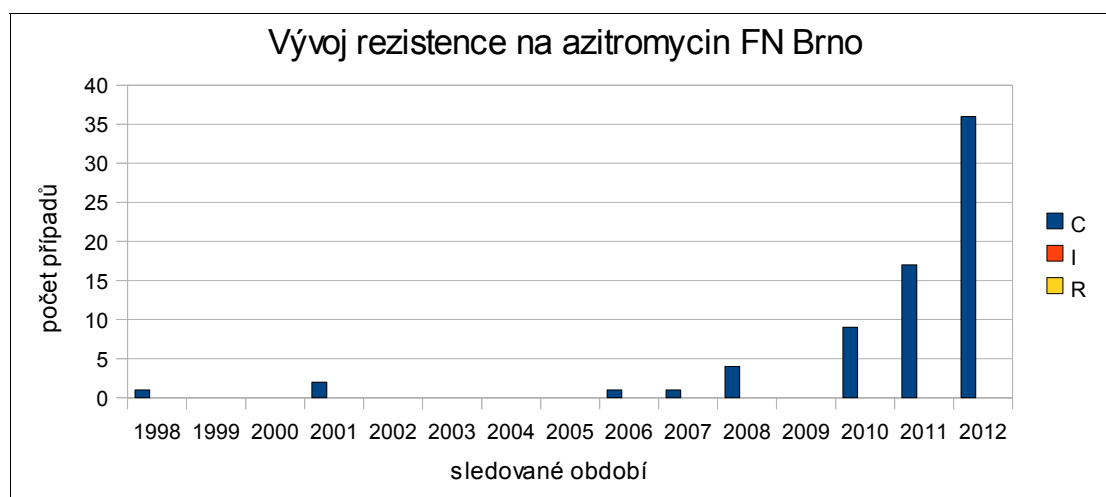
Graf č. 14 Vývoj rezistence na cefotaxim ve FN Brno za období 1998 – 2012. První výskyty rezistence na cefotaxim 2011 a 2012.

9.5.6. Azitromycin

Tabulka č. 15 Počet kmenů citlivých na azitromycin ve FN Brno za období 1998 - 2012

Azitromycin	Počet C	%	Počet I	%	Počet R	%
1998	1	100	0	0	0	0
1999	0	100	0	0	0	0
2000	0	100	0	0	0	0
2001	2	100	0	0	0	0
2002	0	100	0	0	0	0
2003	0	100	0	0	0	0
2004	0	100	0	0	0	0
2005	0	100	0	0	0	0
2006	1	100	0	0	0	0
2007	1	100	0	0	0	0
2008	4	100	0	0	0	0
2009	0	100	0	0	0	0
2010	9	100	0	0	0	0
2011	17	100	0	0	0	0
2012	36	100	0	0	0	0

C – citlivý, I – intermediálně citlivý, R – rezistentní



Graf č. 15 Vývoj rezistence na azitromycin ve FN Brno

9.5.7. Spektinomycin

Tabulka č. 16 Počet kmenů citlivých na spektinomycin ve FN Brno za období 1998 - 2012

Spektinomycin	Počet C	%	Počet I	%	Počet R	%
2011	4	100	0	0	0	0
2012	36	100	0	0	0	0

C – citlivý, I – intermediálně citlivý, R – rezistentní



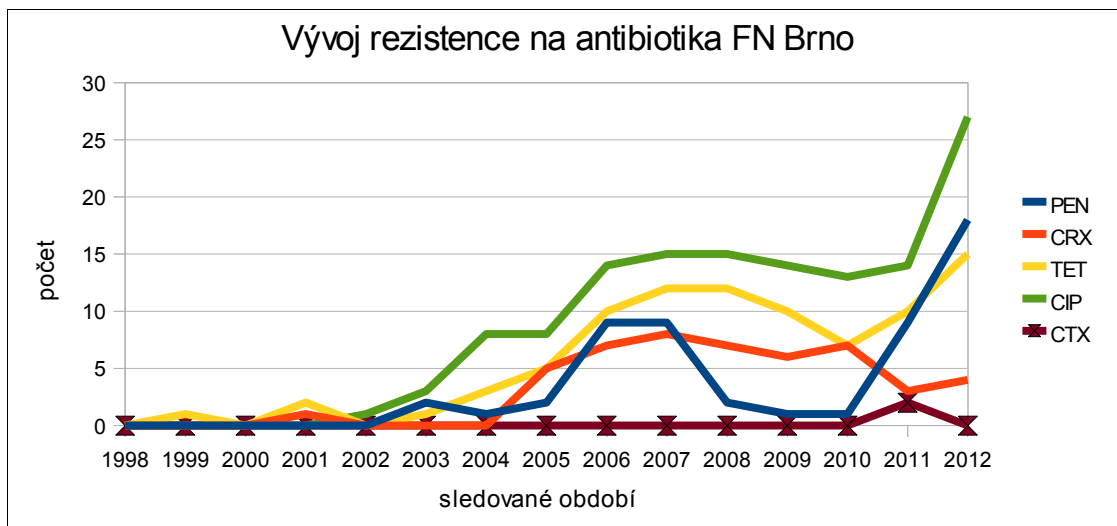
Graf č. 16 Vývoj rezistence na spektinomycin ve FN Brno. Zavedení testování.

9.6. Souhrný vývoj rezistence *N. gonorrhoeae*

Tabulka č.17 Vývoj rezistence ve FN Brno za období 1998 – 2012

R	PEN	CRX	TET	CIP	CTX	AZI	SPE
1998	0	0	0	0	0	0	0
1999	0	0	1	0	0	0	0
2000	0	0	0	0	0	0	0
2001	0	1	2	0	0	0	0
2002	0	0	0	1	0	0	0
2003	2	0	1	3	0	0	0
2004	1	0	3	8	0	0	0
2005	2	5	5	8	0	0	0
2006	9	7	10	14	0	0	0
2007	9	8	12	15	0	0	0
2008	2	7	12	15	0	0	0
2009	1	6	10	14	0	0	0
2010	1	7	7	13	0	0	0
2011	9	3	10	14	2	0	0
2012	18	4	15	27	0	0	0

R – rezistentní



Graf č. 17 Vývoj rezistence k daným antibiotikům ve FN Brno

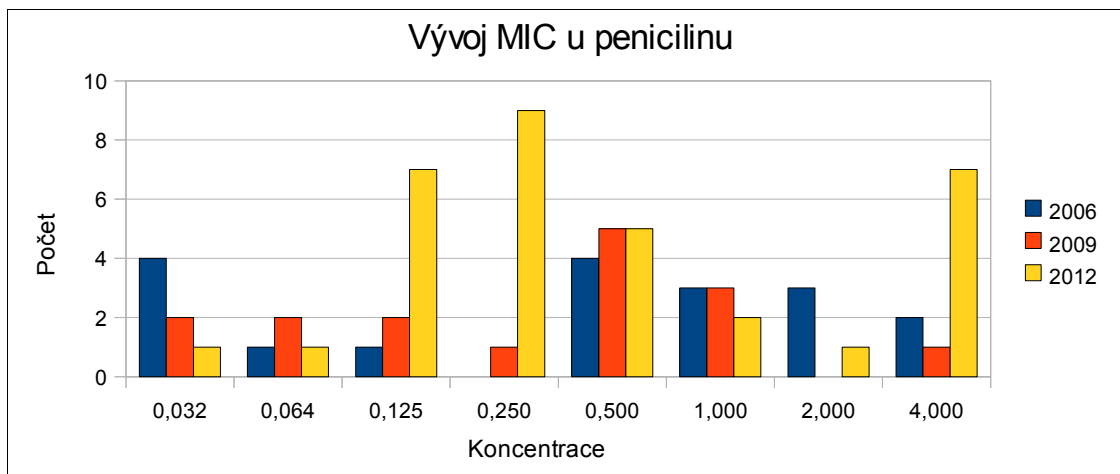
9.7. Distribuce minimální inhibiční koncentrace

V následujících tabulkách a grafech je zobrazena distribuce minimálních inhibičních koncentrací (mg/l) (MIC) ve vybraných letech.

9.7.1. Penicilin

Tabulka č. 18 Vývoj minimální inhibiční koncentrace penicilinu ve FN Brno ve vybraných letech 2006, 2009, 2012.

	0,03	0,06	0,13	0,25	0,5	1	2	4
2006	4	1	1	0	4	3	3	2
2009	2	2	2	1	5	3	0	1
2012	1	1	7	9	5	2	1	7

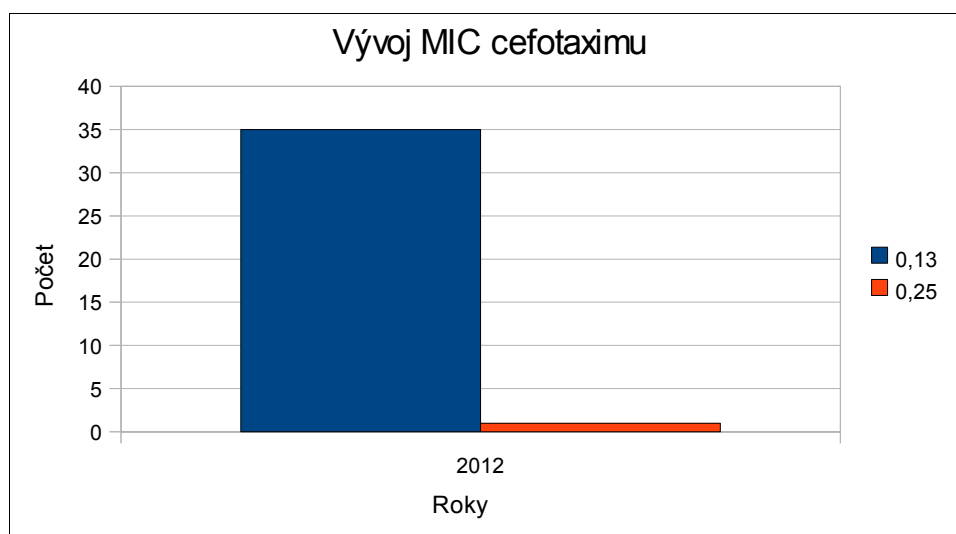


Graf č. 18 Vývoj MIC penicilinu ve FN Brno

9.7.2. Cefotaxim

Tabulka č. 19 Vývoj minimální inhibiční koncentrace cefotaximu ve FN Brno v roce 2012

	≤ 0,125	> 0,125
2012	35	1



Graf č. 19 Vývoj MIC cefotaximu ve FN Brno

10. Diskuze

Prvním, důležitým krokem je rozpoznání kapavky ošetřujícím lékařem. Vzhledem k tomu, že až 80% žen nemusí mít příznaky, může být stanovení diagnózy obtížné. Nesprávná diagnóza může vést k chybně zvolené antibiotické léčbě a snižuje možnost pozdější identifikace neisserie. Stejně tak samoléčba pacienta, který užívá antibiotika bez řádného vyšetření lékařem, vede pouze k dočasnému zmírnění příznaků a může vést k rozvoji rezistence.

Nejčastější místo odběru při infekci představuje uretra, u žen cervix, dále rektum, krk a spojivky. Správný odběr zajišťuje úspěšnou následnou diagnostiku. Úspěch značně ovlivňují i transportní podmínky. Teplota je výhodnější nižší, zpomalí se metabolismus bakterií. Bohužel při nižší teplotě citlivější bakterie hynou. Naopak vysoká teplota může vést k pomnožení bakterií běžné flóry a ty pak zastíní vlastní patogeny. Mechanické vlivy – otřesy při transportu mohou vést k vytřepání bakterií z tamponu do média a následné falešné negativitě vyšetření. Jakékoli poškození vzorku jej znehodnocuje a činí nepoužitelným pro vyšetření a také může vést ke zkontaminování celého transportního prostoru.

Po provedení standartních postupů preanalytické fáze je materiál zpracován stanovenými metodami. V případě, že je pacient už léčen antibiotiky, je k dispozici metoda real-time PCR, která zachytí přítomnost bakteriální DNA i v případě, že bakterie již není životaschopná. V ostatních případech je materiál naočkován na příslušné půdy, nátěr na sklíčku barven dle Grama. Po nárůstu jsou kolonie ověřeny mikroskopicky. Biochemicky určíme druh neisserie a oveříme správnost určení metodou MALDI-TOF. Standartně se u kolonií testuje citlivost na antibiotika. Hlavně díky narůstající rezistenci k antibiotikům, standartně užívaným k léčbě je citlivost monitorována. Léčba je pak přizpůsobena povaze izolátu u každého pacienta. Kdyby nedošlo ke změně léčebných postupů dle citlivosti daného kmene, stanou se rezistentní kmeny endemickou příčinou zvyšujícího se počtu nakažených. K tomu dochází v důsledku infekce rezistentními kmeny. Značný podíl na šíření infekce mají také cestovatelé.

Monitorování gonokokové citlivosti není univerzální, protože incidence endemické kapavky je nízká, ale i z rozvojových zemí získáváme aktuální údaje, protože mají prostředky pro adekvátní testování a surveillance programy, které umožňují průběžné posuzování rezistance a sledování nových trendů. Globální údaje o gonokokové citlivosti nejsou úplné a je třeba na ně nahlížet v kontextu.⁶⁴

Gonokoky prokazatelně rozvíjí rezistenci jak ke starším, levnějším antibiotikům, tak k nedávno objeveným preparátům. Existuje úzký vztah mezi in vitro rezistencí a klinickým selháním, proto by se antibiotikum nemělo užívat je-li více než 5 % kmenů k němu rezistentní. V mnoha částech světa jsou gonokoky rezistentní k penicilinu a tetracyklinu a je běžná i rezistence k více preparátům.⁶⁴ V několika vyspělých zemích jsou peniciliny stále užívány s vysokou efektivitou, ale jde-li o importovanou infekci, musí být detekována a léčba přizpůsobena. Byla zjištěna zkřížená rezistence mezi penicilíny a dřívějšími generacemi cefalosporinů. V oblasti západního Pacifiku a jihovýchodní Asie se objevila významná rezistence k chinolonům, která se dále šíří.

Z údajů v grafické části práce jednoznačně vyplývá, že nejen přibylo případů nákazy gonorrhoeou, ale také výrazně narůstá rezistence k antibiotikům, užívaným k její léčbě. Tento nárůst byl zaznamenán po celé České republice. Největší nárůst byl v posledních letech ve FN Brno zaznamenán u tetracyklinů, penicilínu, ciprofloxacinu, cefuroximu a v počáteční fázi i u cefotaximu. Účinnost si zatím uchovaly preparáty azitromycin a spektinomycin. Dále také vidíme, že v minulosti byl rizikovější skupinou věk 31 – 40 let, kdežto v současnější době se jí stává spíše skupina 17 – 30 let. Stále zůstává větší počet nakažených mužů než žen. I u žen došlo ke vzestupu počtu případů a to v mladší věkové skupině (17 – 30 let). Ve světě je u této věkové skupiny jednou z příčin větší záchyt u homosexuálních mužů, eventuálně cestovatelská anamnéza do rizikových oblasti (např. Thajsko). Je pravděpodobné, že i ve FN Brno může být větší záchyt z těchto důvodů, také díky větší sexuální otevřenosti u mladší věkové kategorie.

Výrazný nárůst rezistence je patrný z příslušných grafů. Rezistence na penicilin začala vzrůstat od roku 2004 a v roce 2012 je jen málo citlivých kmenů. V roce 2008 vidíme výrazný nárůst intermediální citlivosti. Podle epidemiologického šetření se pravděpodobně jednalo se o hromadný výskyt (outbreak) případů vycházející z jednoho zdroje.

Rezistence na cefuroxim začala narůstat od roku 2005 (22,7%), do té doby nebyl zaznamenán žádný rezistentní kmen. Cefuroxim je citlivý, protože je více kmenů s produkcí penicilinázy než s jinými druhy rezistence a tomu odpovídá i nárůst rezistence na penicilin.

Rezistence k tetracyklinům velmi markatně narůstá od roku 2005. V dalších letech dosahuje takových hodnot (50 a více %), že tetracykliny v regionu Brno již nejsou dále doporučovány k léčbě kapavky.

Rezistence na ciprofloxacin je v současné době natolik vysoká (75 % v roce 2012), že nejsou k léčbě kapavky používány. Velmi zajímavý prvek je úplné vymizení kmenů s intermediální citlivostí v období od roku 2008 do roku 2011, kdy kmeny nevykazovaly fázi snížení citlivosti, ale jen citlivost nebo rezistenci. U rezistence na cefotaxim je vidět trend, který se objevuje i ve světě a to že se začínají objevovat kmeny na cefotaxim rezistentní. Zatím byly zachyceny pouze dva případy v roce 2011 a jeden 2012, ale tyto případy musí být brány jako varovné signály, které mohou pravděpodobně vést k rozvoji rezistence na další typ antibiotika, prozatím velmi úspěšně používaného k léčbě.

Dalším testovaným antibiotikem je azitromycin, jeho citlivost byla v letech 1999, 2000, 2002 – 2005 a v roce 2009 vyšetřována jen cíleně na vyžádání ošetřujícím lékařem. Od roku 2010 byl azitromycin zařazen do standardní sestavy antibiotik pro testování rezistence *N. gonorrhoeae*.

Posledním testovaným antibiotikem ve FN Brno je spektinomycin. Tento přípravek sice není doposud v České republice registrovaný, ale je standardně testován od roku 2011 a to na žádost ošetřujících lékařů. Spektinomycin lze v ČR získat na tzv. mimořádný dovoz pro pacienty s polyrezistentními kmeny, případně pro pacienty s výskytem alergie na ostatní ATB.

V souhrnném grafu rezistence na stanovovaná antibiotika lze pozorovat fakt, že od roku 2005 začíná narůstat rezistence na penicilin, pak dochází k poklesu

rezistence a od roku 2010 rezistence znovu výrazně přibývá.

Stejný trend vývoje pozorujeme i u tetracyklinů, které od roku 2005 zvyšují rezistenci a tento trend si udržují. I u tetracyklinů došlo k poklesu rezistence v roce 2010, ale jen nepatrnému na rozdíl od penicilínu a stále tedy nejsou doporučovány k léčbě. Dalším antibiotikem s velmi výrazným nárůstem rezistence je ciprofloxacin. Jeho rezistence stoupá skokovitě, nejprve v roce 2004 a další skokový nárůst byl v roce 2005. Od té doby si udržoval konstantní míru rezistence. V roce 2011 došlo ke třetímu skoku v počtu rezistentních případů směrem nahoru. Důvodem proč tato tři antibiotika vykazují shodný, výrazný nárůst rezistence zhruba ve stejném období může spočívat v mechanismu chromozomální rezistence *N. gonorrhoeae*. Protože však nebylo u izolátů provedeno vyšetření fenotypu, nelze toto jednoznačně určit.

Co se týká cefalosporinů 3. generace, cefotaxim zůstává použitelný v terapii, byl zaznamenán pouze výskyt rezistence v roce 2011 ve dvou případech, u cefuroximu se v průběhu let objevují při testování kmeny jak citlivé, intermediálně citlivé tak rezistentní současně, počet rezistencí je zatím v poměru k citlivostem v menšině, ale je to výrazně individuální. Z grafu nakonec plyne i nadějný fakt, že azitromycin a spektinomycin zatím mají nulový počet případů rezistence a jsou tak další terapeutickou možností, dojde-li k selhání cefalosporinů 3. generace.

Poslední dva grafy znázorňují vývoj minimálních inhibičních koncentrací u penicilínu a cefotaximu, stanovené metodou E-testu ve vybraných letech. U penicilínu je v roce 2012 zaznamenána nejčastější koncentrace 0,25 µg a 4 µg. To odpovídá zjištění z předchozího grafu náležitosti rezistenci k penicilínu, v roce 2012 bylo nejvíce kmenů rezistentních a intermediálně citlivých. Stejně tak si grafy odpovídají i v dalších vybraných letech 2009 a 2006. U cefuroximu byl v roce 2012 zaznamenán jen jeden rezistentní kmen.

Nárůst rezistence však není záležitostí jedné země, ale týká se stále většího počtu států a stává se celosvětovým velmi obávaným problémem. Dříve poměrně lehce léčitelná gonorrhoea, jejíž původce byl citlivý k podávaným antibiotikům se stává chorobou, jejíž léčba se díky získaným faktorům

rezistence ztížila a antibiotikum je třeba uvážlivě volit dle stanovených citlivostí, aby nedošlo k rozšíření rezistence i na antibiotika dosud rezistenci odolávajících.

Situace v ČR je podobná jako ve světě. Z údajů uvedených v kapitole 7. se můžeme přesvědčit, že nárůst rezistence byl zaznamenán i v Praze a v Ostravě, jak poukazuje studie provedená v letech 2006 – 2010. Výsledky této studie zaznamenaly snížení počtu PPNG (penicilinázu produkující *N. gonorrhoeae*) kmenů a většina kmenů je QRNG (chinolon rezistentní *N. gonorrhoeae*). Na rozdíl od našich výsledků byly objeveny první kmeny rezistentní k azitromycinu a se sníženou rezistencí k ceftriaxonu.

Stav v jiných zemích odráží mezinárodní studie v oblasti západní Evropy, testující izoláty *N. gonorrhoeae* na citlivost k vybraným antibiotikům a přítomnost jednotlivých typů rezistence. Byly použity izoláty z těchto evropských zemí: Anglie a Wales, Belgie, Francie, Itálie, Německo, Nizozemsko, Portugalsko, Rakousko, Řecko, Skotsko, Španělsko, Švédsko. K analýze bylo použito 1055 izolátů, 80 % byly izoláty z mužské uretry, rekta či faryngu a 19 % od žen z cervixu, vaginy a uretry. Prvním testovaným antibiotikem byl azitromycin. Pouze 3 země měly nulovou rezistenci, a to Francie, Řecko a Portugalsko. Nejhorší situace byla v Rakousku, následovalo Nizozemsko a Švédsko, ostatní státy se pohybovaly pod hranicí 10 % rezistence. Druhým testovaným antibiotikem byl ceftriaxon, zde se malé procento rezistence objevilo jen v Itálii a Švédsku. QRNG kmeny se vyskytovaly velmi často, v Rakousku více než 50 %, Švédsko, Belgie, Německo blízko hranice 50 %, Itálie, Francie, Skotsko okolo 30 %, Portugalsko, Nizozemsko, Španělsko, Anglie a Wales, v rozsahu mezi 10 a 20 % a nakonec se 7,6 % Řecko. Dále se testovala snížená citlivost k ciprofloxacinu, zde byly výsledky mírnější, největší počet rezistentních izolátů pocházel ze Španělska, další státy se pohybovaly v rozmezí 0 – 5 %. Výskyt typů rezistence jako CMRNG byl v průměru všech států 8,7 %, PPNG v průměru 6,7 %, PPNG/TRNG v průměru 5,9 % a TRNG v průměru 6,2 %. Studie byla provedena v roce 2006 a vidíme zde značný nárůst rezistence k chinolonům, azitromycinu a počínající k ciprofloxacinu a ceftriaxonu.

Existují již dva kmeny s vysokou úrovní rezistence k cefiximu a ceftriaxonu a to F89 a H041. F89 byl objeven ve Francii, H 041 v Japonsku. Tyto kmeny jsou velkou hrozbou, úspěšně se šíří po celém světě. Selhání léčby v důsledku přítomnosti kmene F89 bylo zaznamenáno také v Norsku, Rakousku a Británii. Selhání léčby faryngeální kapavky bylo hlášeno ze Švédska a ze Slovinska a selhání léčby urogenitální infekce z Francie, kmen podezřelý z rezistence k ceftriaxonu byl hlášen ze Španělska. Byl zřízen Evropský program pro kontrolu rezistence gonokoků, a ten potvrdil v letech 2009 – 2010 snížení citlivosti k cefiximu, které je nejen častější, ale šíří se po celé Evropě, zároveň zjistili, že klesá i citlivost k ceftriaxonu. Evropské centrum pro prevenci onemocnění a kontrolu vytvořil specifické cíle pro minimalizaci dopadu rezistentní kapavky v Evropě, ty zahrnují zřízení více center ve více zemích, testujících citlivost gonokoků, zajišťující sběr epidemiologických a demografických dat a zajištění srovnatelnosti výsledků, dalším cílem je co nejrychlejší odhalení nemocného pacienta, který již prodělal selhání léčby cefalosporiny, aj. Dojde-li ke globálnímu rozšíření, mohla by se gonorrhoea stát neléčitelnou nemocí.

V severním Řecku bylo také pozorováno rozšíření rezistentních gonokoků se sníženou citlivostí k cefalosporinům. Bylo zjištěno, že bylo zvýšeno MIC u cefiximu a cefotaximu a objevila se vysoká rezistence k cefuroximu, cefoxitinu, ceftazidimu a cefipimu. Skupinu izolátů se sníženou citlivostí k cefalosporinům tvořily non-producenti penicilinázy, fluorochinolon rezistentní kmeny a multi rezistentní kmeny, se sníženou úrovní rezistence k penicilinu G, tetracyklinům, erytromycinu a chloramfenikolu. Všechny tyto izoláty sdílely stejný plazmid a byly stejného původu, získané z kožní a venerologické kliniky v Soluni.

Studie provedená v Tel Avivu v Izraeli v roce 2000, ve které se testovala citlivost 100 izolátů gonokoků k penicilinu, tetracyklinu, ciprofloxacinu, ceftriaxonu a spektinomycinu. Studie prokázala výraznou rezistenci k ciprofloxacinu způsobenou chromozomálním typem rezistence. Vysoký počet intermediálně citlivých kmenů k penicilinu a tetracyklinům a 100% účinnost ceftriaxonu a spektinomycinu.

V USA byla prokázána rezistence k penicilinu, tetracyklinu, ciprofloxacinu a k léčbě se zde preferuje duální terapie kombinující intramuskulární a perorální podání antibiotik.

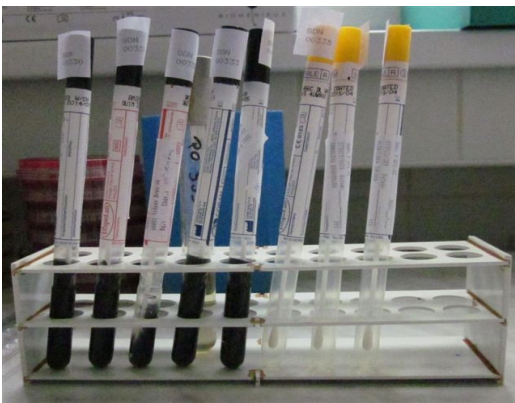
11. Závěr

Počet jedinců nakažených gonorrhoeou v současné době značně stoupá a gonorrhoea je tak, po infekcích *Chlamydia trachomatis*, druhou nejrozšířenější sexuálně přenosnou chorobou. Rezistence k antibiotikům *N. gonorrhoeae* v posledních letech značně vzrostla, a to zejména k některým druhům antibiotik jako jsou peniciliny, fluorochinolony nebo tetracykliny, aj. Rezistence i k cefalosporinům 3. generace se u nás zatím nijak výrazně neprojevuje, ve světě je však velkým problémem ohrožující úspěšnost léčby a zdraví populace. Nově objevené, k cefalosporinům vysoce rezistentní kmeny H041 a F89 mají značnou tendenci šířit se po celém světě a teoreticky mohou vytvořit z gonorrhoey neléčitelnou nemoc. Rezistence *N.gonorrhoeae* je v současnosti značně diskutovaným tématem a velmi obávanou hrozbou všech zainteresovaných osob, bojujících s touto bakterií.

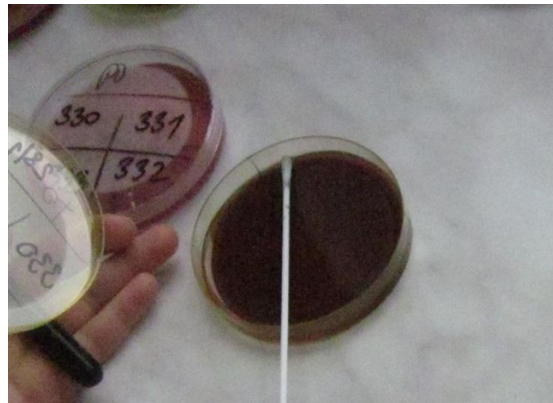
Pro zachování účinnosti antibiotik je třeba jak dnes, tak v budoucnu velmi uvážlivě volit antibiotika k léčbě, aby nebyl vyvíjen nadměrný selekční tlak antibiotik, značně podporující rozvoj rezistence. Bude-li situace i nadále takto závažná, pak se možná bude nutné obrátit se k jiným cestám, například k cestě hledání nových vysoce účinných antibiotik, abychom dokázali vyléčit dříve tak snadno léčitelnou nemoc jakou je gonorrhoea.

Obrazová příloha 1: Vzor žádanky pro vyšetření *N.gonorrhoeae*, zdroj: foto autor

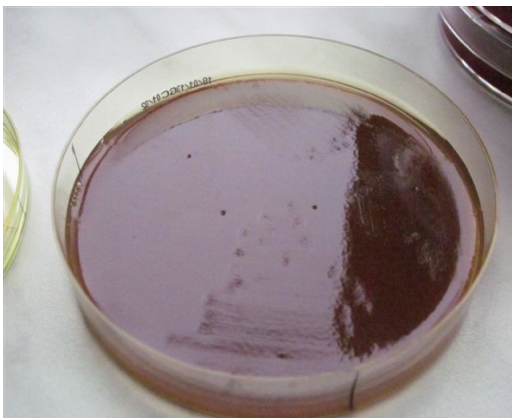
Příloha 2: Vzorčky, očkování půd, podmínky kultivace, zdroj: foto autor



Vzorčky zaslané do laboratoře



Očkování Č3 agaru



Naočkovaný Č3 agar

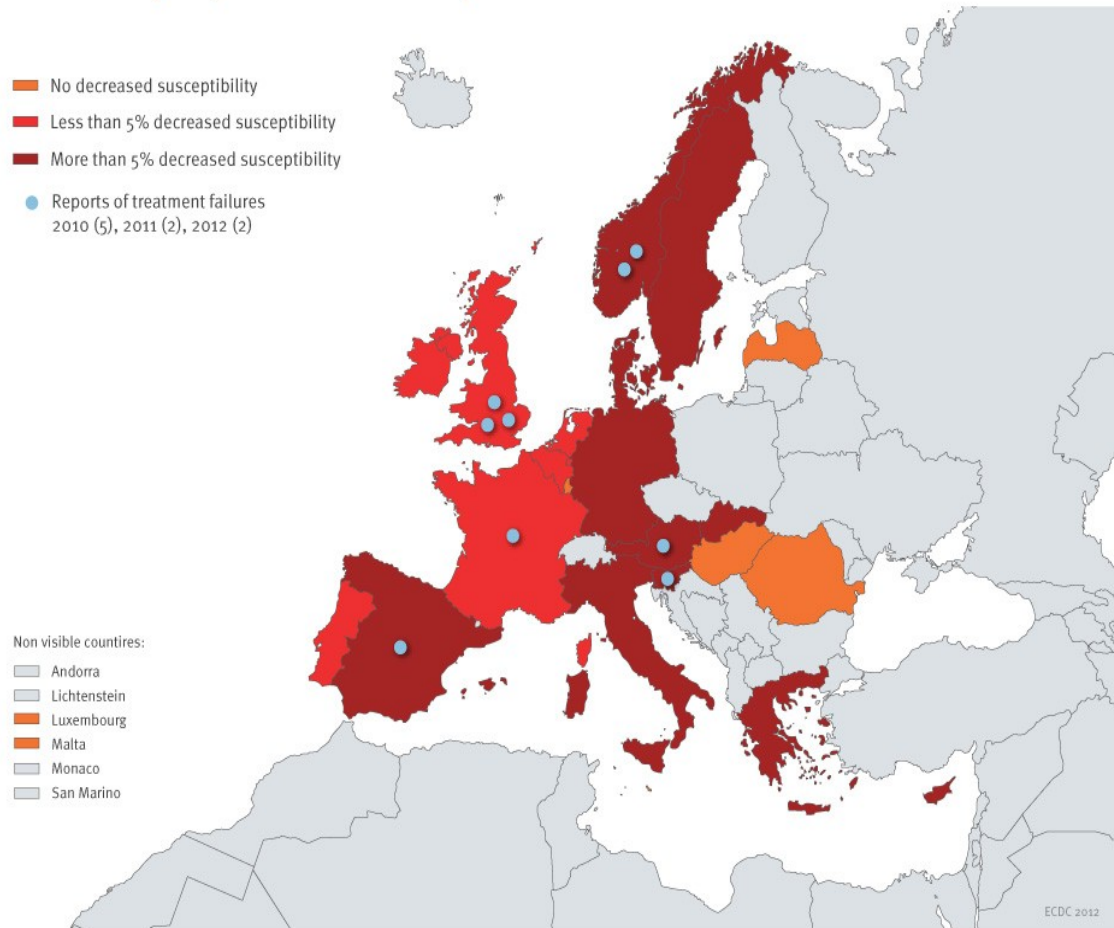


Termostat s vyšší tenzí CO₂

Příloha 4: Snižující se citlivost k cefiximu 2010 a léčné selhání cefiximem 2010 – 2012 v Evropě, zdroj: 101

FIGURE

Decreased susceptibility to cefixime in 2010 and reported cefixime treatment failures in 2010-2012, EU/EEA



EU/EEA: European Union/European Economic Area.

Decreased susceptibility to cefixime is defined as a minimum inhibitory concentration (MIC) ≥ 0.25 mg/L.

This figure has been adapted with permission from a map published in [9].

Seznam zkratk:

ABC – rodina adenosintrifosfát vazebné kazety

AIDS – syndrom získaného imunodeficitu

Aj. - a jiné

APCI – chemická ionizace za atmosferického tlaku

Apod. - a podobně

ARNG – azitromycin rezistentní *N. gonorrhoeae*

ATB - antibiotika

ATP – adenosin trifosfát

ASGP-R -asialoglykoproteinový receptor

Atd. - a tak dále

Bp – páry bazí

C3b – rozštěpená složka komplementu

CEA – karcio embryonální antigen

CEACAM – karcioembryonální antigen buněčná adhezivní molekula

CD4+ - cluster znak T - lymfocytu

CMP-NANA – cytosin monofosfát – N-acetyl neuraminová kyselina

CMRNG – chromozomální rezistencie *N. gonorrhoeae*

dATP – deoxy adenosin trifosfát

dCTP – deoxy cytidin trifosfát

DGI – diseminovaná kapavčitá infekce

dGTP – deoxy guanosin fosfát

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dsDNA – dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina

dTTP – deoxy tymisin fosfát

ESI – ionizace elektron sprejem

GTP – guanosin trifosfát

Hb - hemoglobin

HSPG – heparansulfát proteoglykany

iC3b – inaktivovaná rozštěpená složka komplementu

IgA - imunoglobulin třídy A

IgG – imunoglobulin třídy G

IgM – imunoglobulin třídy M

IL-1beta – interleukin 1 beta

IL-6 – interleukin 6

IL-8 – interleukin 8

KA – krevní agar

Kb – kilo báze

kDa – kilo dalton

LCAT – linkomycin, kolistin sulfát, amfotericin B, trimetoprim

LNnT – lakto – N - neotetralóza

LOS – lipopolysacharidy neisserií

LPS - lipopolysacharidy

MALDI-TOF – laserová desorpce/ionizace za účasti matrice s detektorem doby letu

MATE – rodina multilékového a toxického efektu

MFS – hlavní facilitátorová podrodina

MIC – minimální inhibiční koncentrace

min - minuta

ml - mililitr

MOP – mikrobiální obraz poševní

m-RNA – mediátorová ribonukleová kyselina

NaCl – chlorid sodný

NAD – nikotinamidadeninukleotid

např. - například

nm - nanometr

OPA - s neprůhledností asociované proteiny

PBP – penicilin vázající protein

PCR – polymerázová řetězová reakce

PID – zánětlivé onemocnění pánve

PMN - polymorfonukleáry

popř. - popřípadě

PorB – pór B

PPNG – penicilinázy produkující *N. gonorrhoeae*

QRNG – chinolon rezistentní *N. gonorrhoeae*

RNA – ribonukleová kyselina

r-RNA – ribozomální ribonukleová kyselina

RND – rodina rezistentní nodulace buněčné divize

rtPCR – real-time polymerázová řetězová reakce

s - sekunda

ssDNA – jednořetězová deoxyribonukleová kyselina

SMR – rodina malých multilékových regulátorů

STD – sexuálně přenosné choroby

Taq-polymeráza – *Thermus aquaticus* polymeráza

TNF- α – tumor nekrotizující faktor alfa

t-RNA – transferová ribonukleová kyselina

TRNG – tetracyklin rezistentní *N. gonorrhoeae*

tzv. - tak zvaný

UK – Velká Británie

USA – Spojené státy Americké

UVC – ultrafialové záření C

VCAT – vankomycin, kolistin sulfát, amfotericin B, trimetoprim

VCN - vankomycin, kolistin sulfát, nystatin

VCNT - vankomycin, kolistin sulfát, nystatin, trimetoprim

Seznam elektronických zdrojů:

1. Virginiamycin. *Australien pesticides and Veterinary medicines authority* [online]. 2012, [cit.2013-04-18]. Dostupné z: <http://www.apvma.gov.au/products/review/completed/virginiamycin.php>
2. *Půdy*. 3. Lékařská fakulta Univerzity Karlovi v Praze, 2010. Dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/pudy/pudy.htm>
3. *Princip PCR*. LFHK, 2007. Dostupné z: <http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/PCR.htm>
4. *Hmotnostní spektrometrie proteinů a peptidů pomocí laserové desorpce/ionizace za účasti matrice (MALDI MS)*. ., . Dostupné z: https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:le1mvnPi3_QJ:bart.chemi.muni.cz/courses/Lab%2520Cv%2520MALDI%25202008%2520CZ.doc+&hl=cs&gl=cz&pid=bl&srcid=ADGEEShcdm-R2aReCaIOUIPkm_0x7W0XVnwnmk09XprhxrBnW8PNMkwdf2BqEp2kA0MUI MBjOAxLTmVBBzCEdMiPtZCxofnZSbCyEwof8d_LKSZ27_H-Gys6cYDVmblcd4_cXxV3IPt&sig=AHIEtbSjoflLjN3DnavIkRyCeEql-23ow
5. *Neisseria gonorrhoeae with Reduced Susceptibility to Azithromycin --- San Diego County, California*, 2009. CDC [online]. 2011, roč. 60, č. 18, 2013 [cit. 2013-04-17]. Dostupné z: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6018a2.htm>
6. *Mikroflóra lidského organismu*. Brno, 2005. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/mikrobiologie_lidskeho_organismu.pdf
7. Identified Virulence Factors of *Neisseria* : Invasion. *Virulence factors of pathogenic bacteria* [online]. 2003 [cit. 2013-04-18]. Dostupné z: <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/vfs.cgi?Keyword=Invasion&Species=&Genus=Neisseria>
8. *Real-time PCR*. LFHK, 2007. Dostupné z: <http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm>
9. *Papírové terčíky BBL pro zjišťování b-laktamázových enzymů*. BD, 2010. Dostupné z: https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:xYNa0M4SeigJ:www.bd.com/leaving/%3F/resource.aspx%3FIDX%3D19293+&hl=cs&gl=cz&pid=bl&srcid=ADGEEShUYSWiJATkVWnwKm5OjuulN2XIq86nc6iVnNz4P-iMySyDDZgfNJKhe-StOkuz2fK4qNIG-_gsRwRbHNSE9KI0Rg6hPmAkaTzZo-k77cWgrE3nFg2LcMID2ScjYciKTo0uEK91&sig=AHIEtbTqPvSNhUzYHfhwelfshbJiCW6iw
10. *Fluorochinolony*. 3. Lékařská fakulta Univerzity Karlovi v Praze, 2003.

Dostupné :

<http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/atb/fluorochinolony.htm>

11. Albert Ludwig Sigismund Neisser. In: *Dead Scientist of the Week* [online]. 2012 [cit. 2013-04-17].

Dostupné z: <http://deadscientistoftheweek.blogspot.cz/2012/01/albert-ludwig-sigismund-neisser.html>

12. Gramovo barvení. *VOŠ a SZŠ Hradec Králové* [online]. . [cit. 2013-04-20].

Dostupné z:

<http://labmet.zshk.cz/vyuka/Gramovo-barveni.aspx>

13. ITEST PLUS, s.r.o. HK. *ITEST OXIDÁZA*. . Dostupné z:

<http://www.itest-plus.cz/diagnosticke-pripravky-cz/diagnosticke-disky-cz/itest-oxidaza-cz>

14. *Hmotnostní analyzátořy*. UPCE, . Dostupné z:

https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:66ilxNp8uf8J:holcapek.upce.cz/teaching/03_HmotnostniAnalyzatory.pdf+&hl=cs&gl=cz&pid=bl&srcid=ADGEESi1FT-71xpac4ONoEUEliCkFHLcFvBwyFAXRzmUFRy_e-xOaEJP-rV7U-EY9O9EB7fFAXd71-F9DWicl2sgvcCRm3wqbZ1M-PFaQ3YpdVp-O_5mWoYrX6fLDQtE2brPuMsw26UR&sig=AHIEtbRoRWYyEc5zNaK2K0NVEC1bBeBzDw

15. *Antimikrobní přípravky*. LF UPOL, . Dostupné z:

https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:1itDdlmqA4J:www.lf.upol.cz/fileadmin/user_upload/LF-kliniky/mikrobiologie/dokumenty/zubni/Antimikrobní_pripravky.pdf+&hl=cs&gl=cz&pid=bl&srcid=ADGEESj6RZoYhJ_siXILYpakRwC-WkFknsD2dW9AfMAJTYpuINEmwTLxbQfrYOWGcGj3cYxxt3Jjx5j1sO8hnWQ_7TUo50flaqr9-Ym1K0QY4vmzDSVJYXbllcWjYulDK-lz_oA1fW4v&sig=AHIEtbRYFgOf2LZVdtwmnkwJtN-GCwyqRg

16. *Antibiotické minimum*. 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovi v Praze, 2011.

Dostupné z: <http://inf3.lf1.cuni.cz/~hrozs/Atb2011/antibio05.htm>

17. *Epidemiologie-Laboratorní diagnostika stafylokoků*. . [online]. 2008 [cit.

2013-04-20]. Dostupné z:

<http://sharka-ali.blog.cz/en/0805/epidemiologie-laboratorni-diagnostika-stafylokoku>

18. *Gonorrhoea*. *PubMed ealth* [online]. 2001, . [cit. 2013-04-11]. Dostupné z:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0004526/>

19. Tylosin. In: *MUAMC* [online]. 2011 [cit. 2013-04-18]. Dostupné z:

<http://www.apvma.gov.au/products/review/completed/virginiamycin.php>

20. *Biochemická aktivita*. In: *Identifikace bakterií* [online]. 2008 [cit. 2013-04-20].

Dostupné z:

http://fvl.vfu.cz/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie_pro_farmaceuty/praktikum04/index.html

21. *Ionizační techniky*. UPCE, . Dostupné z:
[https://docs.google.com/viewer?
a=v&q=cache:Zku6dpHG8EJ:holcapek.upce.cz/teaching/02_IonizacniTechniky.pdf&hl=cs&gl=cz&pid=bl&srcid=ADGEESiJK9yyqTdxh7fF4at4RinAM0H3Dq8IpJilQrcsWLDUUIbBLMIlphsEdRMSzfyh9cOPTp-4Oc8u04PpHb4DHG_5c3h8CmlhtRBx_z2S-gPFhI9QjJq4Xkd bTNVhSdVSxXYLp7L&sig=AHIEtbTleopokoRIZC2E0MJqKw0jNul_vQ](https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:Zku6dpHG8EJ:holcapek.upce.cz/teaching/02_IonizacniTechniky.pdf&hl=cs&gl=cz&pid=bl&srcid=ADGEESiJK9yyqTdxh7fF4at4RinAM0H3Dq8IpJilQrcsWLDUUIbBLMIlphsEdRMSzfyh9cOPTp-4Oc8u04PpHb4DHG_5c3h8CmlhtRBx_z2S-gPFhI9QjJq4Xkd bTNVhSdVSxXYLp7L&sig=AHIEtbTleopokoRIZC2E0MJqKw0jNul_vQ)
22. MALDI Biotyper. *Brucker* [online]. 2013 [cit. 2013-04-11]. Dostupné z:
http://www.brucker.pl/images/stories/Daltonics/brochure_MALDI_Biotyper.pdf
23. Identification of Neisseria species. *NELI* [online]. 2011 [cit. 2013-04-21]. Dostupné z:
<http://www.neli.org.uk/integratedcrd.nsf/ad39b7c12305db3d802575630061be11/d0432b64a505f32e8025701b003add04?OpenDocument>
24. *OXI Test*. Erba Lachema, 2011. Dostupné z:
<https://www.eralachema.com/attachments/OXItest-CZ+SK+EN.pdf>
25. GC AGAR BASE. *Conda lab* [online]. 2011 [cit. 2013-04-11]. Dostupné z:
<http://www.condalab.com/pdf/1106.pdf>
26. *MacConkey Agar*. Bio Vendor, 2013. Dostupné z:
[https://docs.google.com/viewer?
a=v&q=cache:9Wc2O95g8bEJ:lm.biovendor.cz/download.php%3Ffile%3D:%255CBIOVENDOR%2520BVLM%2520DATAB%25C1ZE%255CLaboratorios%2520Conda%255CN%25E1vody%2520k%2520pou%259Eit%25ED%255CLC1052.pdf%26_full_path%3D1+&hl=cs&gl=cz&pid=bl&srcid=ADGEESgQBeLRo6zxljwLakffrF-YDs3fDracWNjYWc8M-uOqrF2qyTvqPEtzhQ2pt5xL6wA3AjHjiVwb7Yi1Agds4vFskrfB_BcdLq0MQiuYerq6wnakw13LVHfQQ3EBMj5OWAQOhSyb&sig=AHIEtbSEfN4YCJL50CayZGb ezfwBgTKw](https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:9Wc2O95g8bEJ:lm.biovendor.cz/download.php%3Ffile%3D:%255CBIOVENDOR%2520BVLM%2520DATAB%25C1ZE%255CLaboratorios%2520Conda%255CN%25E1vody%2520k%2520pou%259Eit%25ED%255CLC1052.pdf%26_full_path%3D1+&hl=cs&gl=cz&pid=bl&srcid=ADGEESgQBeLRo6zxljwLakffrF-YDs3fDracWNjYWc8M-uOqrF2qyTvqPEtzhQ2pt5xL6wA3AjHjiVwb7Yi1Agds4vFskrfB_BcdLq0MQiuYerq6wnakw13LVHfQQ3EBMj5OWAQOhSyb&sig=AHIEtbSEfN4YCJL50CayZGb ezfwBgTKw)
27. NEISSERIA test. In: *Erba Lachema* [online]. 2012 [cit. 2013-04-12] Dostupné:
<https://www.eralachema.com/attachments/NEISSERIAtest-CZ+SK+EN+RU+PL.pdf>
28. Gonorrhea - CDC Fact Sheet. *CDC* [online]. 2011, roč. 60, č. 18, 2013 [cit. 2013-04-17]. Dostupné z:
<http://www.cdc.gov/std/gonorrhea/stdfact-gonorrhea.htm>
29. Pelvic inflammatory disease. *WebMD* [online]. ., . [cit. 2013-04-18]. Dostupné z:
<http://women.webmd.com/guide/sexual-health-your-guide-to-pelvic-inflammatory-disease>

30. a VL CLARK. The major anaerobically induced outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*, Pan 1, is a lipoprotein. *NCBI* [online]. 1992, roč. 60, č. 11 [cit. 2013-04-18]. Dostupné z:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1398981>
31. IgA protease of *Neisseria gonorrhoeae*: isolation and characterization of the gene and its extracellular product. *NCBI* [online]. 1984, roč. 3, č. 7 [cit. 2013-04-18]. Dostupné z:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC557564/>
32. Glucose Metabolism in *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of bacteriology* [online]. 1974, roč. 120, č. 2 [cit. 2013-04-17]. Dostupné z:
<http://j.b.asm.org/content/120/2/702>
33. *Textbook of Microbiology and Immunology, 2/e* [online]. Elsevier, 2012 [cit. 2013-04-16]. ISBN 9788131228104. Dostupné z:
<http://books.google.cz/books?id=vNZGxKQkF-IC&pg=PA203&lpg=PA203&dq=antibody+against+OPA+proteins&source=bl&ots=V1tA2CsWP5&sig=uRf0SaBjrcbfvZGccJKEFmg3pTQ&hl=cs&sa=X&ei=QZBqUb7RF8SQswbP74DABg&ved=0CIYBEOgBMAc#v=onepage&q=antibody%20against%20OPA%20proteins&f=false>
34. Stanovení minimální inhibiční koncentrace penicilinu, tetracyklinu, ciprofloxacinu, azitromycinu a ceftriaxonu E - testem u 110 kmenů *Neisseria gonorrhoeae* izolovaných na Ostravsku v letech 2006–2010. *Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě* [online]. 2010, . [cit. 2013-04-11]. Dostupné z:
<http://generator.citace.com/dokument/52vyl1fTKpwsDW88>
35. Antibiotická rezistence u lidí i u zvířat je stále větším zdravotním problémem. In: SZU [online]. 2012 [cit. 2013-04-21]. Dostupné z:
http://www.szu.cz/uploads/EAAD_2012/Tiskova_zprava_SZU_EAAD_2012.pdf
36. ASSALKHOU, R., S. BALASINGHAM, R. F. COLLINS, S. A. FRYE, T. DAVIDSEN, A. V. BENAM, M. BJORAS, J. P. DERRICK a T. TONJUM. The outer membrane secretin PilQ from *Neisseria meningitidis* binds DNA. *Microbiology* [online]. 2007, roč. 153, č. 5, s. 1593-1603 [cit. 2013-04-18]. ISSN 1350-0872. DOI: 10.1099/mic.0.2006/004200-0. Dostupné z:
<http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.2006/004200-0>
37. BASH. Quinolone Resistance–Determining Region Mutations and por Type of *Neisseria gonorrhoeae*. *Oxford Journal* [online]. 2004, č. 93 [cit. 2013-04-20]. DOI: 0022-1899/2004/18911-0017. Dostupné z:
<http://jid.oxfordjournals.org/content/189/11/2085.full.pdf>
38. DAN, M., F. POCH a B. SHEINBERG. High Prevalence of High-Level Ciprofloxacin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in Tel Aviv, Israel: Correlation with Response to Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 6-2002, roč. 46, č. 6, s. 1671-1673 [cit. 2013-04-11]. ISSN 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.46.6.1671-1673.2002.

Dostupné z:

<http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.46.6.1671-1673.2002>

39.DENSEN, P, S GULATI a P A RICE. Specificity of antibodies against *Neisseria gonorrhoeae* that stimulate neutrophil chemotaxis. Role of antibodies directed against lipooligosaccharides. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1987, roč. 80, č. 1, s. 78-87 [cit. 2013-04-18]. ISSN 0021-9738. DOI:10.1172/JCI113067. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/113067>

40.DOC. MUDR. VYHNÁNKOVÁ, Ludmila, CSc. Makrolidy. *Zdravotnické noviny* [online]. 2003, . [cit.2013-04-20]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/makrolidy-155471>

41.EDWARDS, J. L. a M. A. APICELLA. The Molecular Mechanisms Used by *Neisseria gonorrhoeae* To Initiate Infection Differ between Men and Women. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2004, roč.17, č. 4, s. 965-981 [cit. 2013-04-11]. ISSN 0893-8512. DOI: 10.1128/CMR.17.4.965-981.2004. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.17.4.965-981.2004>

42x.FRANCIS, F, S RAMIREZ-ARCOS, C SALIMNIA, VICTOR a J R DILLON. Organization and transcription of the division cell wall (dcw) cluster in *Neisseria gonorrhoeae*. *BioInfoBank Library* [online]. 2000, č. 251 [cit. 2013-04-17]. Dostupné z: <http://lib.bioinfo.pl/paper:10876091>

42.GARWOOD, Jeremy. Who Will Win the Fight?: Antibiotic resistance. *Lab Times* [online]. 2011, č. 7[cit. 2013-04-12]. Dostupné z: http://www.labtimes.org/labtimes/issues/lt2011/lt07/lt_2011_07_18_25.pdf

43.HILL, Stuart A. a John K. DAVIES. Pilin gene variation in *Neisseria gonorrhoeae*: reassessing the old paradigms. *NCBI* [online]. 2009, roč. 33, č. 3 [cit. 2013-04-18]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2753986/>

44. KIDD, Sarah CEPHALOSPORIN - RESISTANT NEISSERIA GONORRHOEA E PUBLIC HEALTH RESPONSE PLAN. In: *CDC* [online]. 2012 [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: <http://www.cdc.gov/std/treatment/ceph-r-responseplanjuly30-2012.pdf>

45.KOJANOVÁ, M. Kapavka (Gonorrhoea). *Levret* [online]. 2007, č. 13 [cit. 2013-04-12]. Dostupné z: <http://www.levret.cz/publikace/casopisy/mb/2007-13/?pdf=36>

46.KOLÁŘ, Milan. Bakteriální beta-laktamázy. In: . [online]. . [cit. 2013-04-18]. Dostupné z: <https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:wOQn-Y2mS6kJ:www.bpp.cz/solan/PDF/blok1/1.pdf+&hl=cs&gl=cz&pid=bl&srcid=ADGEESipYK1bqDUyGrxAIKGxkUpVOx5EHl0AL63LgLB0NY2ecypTSsRz4yEm8CLFxsZ0oOWm5g>

4Wo8P-5nh4gpkszfFrJA7OmrVr6JwflVh3mv9TQfU7UmpMTmWvXqfHuXcjMF3fpcYm&sig=AHIEtbQ7a1fXtRB2Dt_mpa4v8t3cWTxf9g

47. LITERÁK, Ivan. Antibiotika. In: . [online]. 2012 [cit. 2013-04-20]. Dostupné z: http://fvhe.vfu.cz/export/sites/fvhe/adresa/sekce_ustavy/ubchvzz/Biologie/biologie-prednasky/2012-13/12-Biologie-BSP-2012-2013xantibiotikax.pdf

48. MARTIN, I. M. C. European Surveillance of Sexually Transmitted Infections (ESSTI): the first combined antimicrobial susceptibility data for *Neisseria gonorrhoeae* in Western Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2006, roč. 58, č. 3, s. 587-593 [cit. 2013-04-12]. ISSN 0305-7453. DOI: 10.1093/jac/dkl265. Dostupné z: <http://www.jac.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jac/dkl265>

49. MORAN, Anthony P., Martina M. PRENDERGAST a Ben J. APPELMELK. Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease. *FEMS Immunology* [online]. 1996, roč. 16, č. 2, s. 105-115 [cit. 2013-04-18]. ISSN 09288244. DOI:10.1111/j.1574-695X.1996.tb00127.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-695X.1996.tb00127.x>

50. MORSE, Stephen A. a Bruce H. HEBELER. Effect of pH on the growth and glucose metabolism of *Neisseria gonorrhoeae*. *NCBI* [online]. 1978, č. 21 [cit. 2013-04-17]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC421961/?page=1>

51. MOSLEH, I. M. *Neisseria gonorrhoeae* Porin Modulates Phagosome Maturation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1998, roč. 273, č. 52, s. 35332-35338 [cit. 2013-04-18]. ISSN 00219258. DOI:10.1074/jbc.273.52.35332. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.273.52.35332>

52. MUDR. HOBSTOVÁ. Beta-laktamová antibiotika, beta-laktamázy a jejich inhibitory. *Zdravotnické noviny* [online]. 2003, . [cit. 2013-04-20]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/beta-laktamova-antibiotika-beta-laktamazy-a-jejich-inhibitory-151726>

53. MUDR. MLČOCH, Zbyněk. Cína Léky Jak správně užívat antibiotika [online]. 2012 [cit. 2013-04-18]. Dostupné z: <http://www.zbynekmlcoch.cz/informace/medicina/leky/jak-spravne-uzivat-antibiotika-pravidla-doporuceni>

54. MUDR. ZÍMOVÁ, Jana, Pavlína MGR. ZÍMOVÁ a MUDR. ZÍMA. Kapavka – gonorrhoea, aktuálně a v přehledu (1. *Kožní ambulance* [online]. 2012, roč. 13, č. 6 [cit. 2013-04-17]. Dostupné z: [https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:76qiuRg6dcEJ:www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2012/06/06.pdf+&hl=cs&gl=cz&pid=bl&srcid=ADGEEShpJdBesHO8N1qZb5jS4rgNI4dgifg-](https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:76qiuRg6dcEJ:www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2012/06/06.pdf+&hl=cs&gl=cz&pid=bl&srcid=ADGEEShpJdBesHO8N1qZb5jS4rgNI4dgifg-95)

[C5Z1Is8yQAwGWSczEFUsMku63gfl4eWN8cQSuesbjSnM59uFiMOGaF3lhltlFVOIOXBQGyyU0plAqtbZAE-Gb8UTAWQwW_XsUilA9ms6c&sig=AHIEtbRhn6jQ_7LNjAGsWhW70g22GmXYyw](https://doi.org/10.1093/jac/dkr162)

55. MULLER, E. E., S. A. FAYEMIWO a D. A. LEWIS. Characterization of a novel β -lactamase-producing plasmid in *Neisseria gonorrhoeae*: sequence analysis and molecular typing of host gonococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2011, roč. 66, č. 7, s. 1514-1517 [cit. 2013-04-20]. ISSN 0305-7453. DOI: 10.1093/jac/dkr162. Dostupné z: <http://www.jac.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jac/dkr162>

56. PANDORI, Mark, Pennan M. BARRY, Abel WU, Alyssa REN, WHITTINGTON, Sally LISKA a Jeffrey D. KLAUSNER. Mosaic Penicillin-Binding Protein 2 in *Neisseria gonorrhoeae* Isolates Collected in 2008 in San Francisco, California. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* [online]. 2009, roč. 53, č. 9 [cit. 2013-04-11]. DOI: 10.1128/AAC.00406-09. Dostupné z: <http://aac.asm.org/content/53/9/4032.full>

57. PLUMMER, F A, H CHUBB, J N SIMONSEN, M BOSIRE, L SLANEY, I MACLEAN, J ONDINYA-ACHOLA, P WAIYAKI a R C BRUNHAM. Antibody to Rmp (outer membrane protein 3) increases susceptibility to gonococcal infection. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1993, roč. 91, č. 1, s. 339-343 [cit. 2013-04-18]. ISSN 0021-9738. DOI: 10.1172/JCI116190. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/116190>

58. PLUMMER, F A, H CHUBB, J N SIMONSEN, M BOSIRE, L SLANEY, N J NAGELKERKE, I MACLEAN, J O NDINYA-ACHOLA, P WAIYAKI a R C BRUNHAM. Antibodies to opacity proteins (Opa) correlate with a reduced risk of gonococcal salpingitis. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1994, roč. 93, č. 4, s. 1748-1755 [cit. 2013-04-17]. ISSN 0021-9738. DOI: 10.1172/JCI117159. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/117159>

59. POHLNER, Johannes, Roman HALTER, Konrad BEYREUTHER a Thomas F. MEYER. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* [online]. 1987, roč. 325, č. 6103, s. 458-462 [cit. 2013-04-18]. ISSN 0028-0836. DOI: 10.1038/325458a0. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/325458a0>

60. PRIM. MUDR. JIREŠOVÁ, Jiřina a MGR. GROSSOVÁ. *Odběr a zaslání biologického materiálu (BM) na mikrobiologické vyšetření*. Orlickoústecká nemocnice, a.s., Oddělení lékařské mikrobiologie, . Dostupné z: https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:tLTyUUOQ8QJ:www.ou-nem.cz/lab/odbery_mikrobiologie.doc+&hl=cs&gl=cz&pid=bl&srcid=ADGEESi2VWiHPah8_hHF_oDNpEaTNtTXHdy-mml5lotCSQ5Gv4qLqzU2zOE3liKcER4asm1cpAw12gp6FDwQgAZmGEZ3IGX85-6KGR9sQcKMKmxc0G_dd5GfD7bGgOCW-9Hws5aRZGLs&sig=AHIEtbRnNPHscXNNsgPpa_pKV70dzBp68w

61. SCHRYVERS, Anthony B. a Igor STOJILJKOVIC. Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Molecular Microbiology* [online]. 2002, roč. 32, č. 6, s. 1117-1123 [cit. 2013-04-18]. ISSN 0950-382x. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01411.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.1999.01411.x>
62. SMÍŠEK, Jan. Mikroskopie v mikrobiologii a mikrobiologická barvení. In: . [online]. 2009 [cit.2013-04-20]. Dostupné z: https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:8TwBtIAnW0UJ:mikrobiologie.unas.cz/soubory/mikroskopie.pps+&hl=cs&gl=cz&pid=bl&srcid=ADGEESikVDWo4j1VOjRIj5rEbALG6R9Sy-MnHfOlyu8FDbz0rFPYS4zt_x6_IDUpOdthMnZqJlceGczc5SDCY58ldNvsna1Q5a7VCe2SP6qbZ9t6-cY-gC4RNFa23NetVFpQJ5gdVo&sig=AHIEtbTwN3phavNWrZKfO6QyfKvJilgooA
63. STEFANELLI. Emerging Resistance in *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *MEDSCAPE* [online]. 2011, č. 2 [cit. 2013-04-20]. Dostupné z: http://www.medscape.com/viewarticle/739024_3
64. TAPSALL, John. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *WHO* [online]. 2001, č. 3 [cit.2013-04-12]. Dostupné z: http://www.who.int/drugresistance/Antimicrobial_resistance_in_Neisseria_gonorrhoeae.pdf
65. TETTELIN, H. a kol. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *NCBI* [online]. 2000, č. 287 [cit. 2013-04-17]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10710307>
66. TODAR PHD, Keneth. Pathogenic *Neisseriae*: Gonorrhea, Neonatal Ophthalmia and Meningococcal Meningitis (page 1). *Todar's online textbook of microbiology* [online]. 2012, . [cit. 2013-04-18]. Dostupné z: <http://textbookofbacteriology.net/neisseria.html>
67. TREES, KNAPP JS, FOX KK, TREES DL, WHITTINGTON WL. a WL WHITTINGTON. Fluoroquinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *NCBI* [online]. 1997, č. 1 [cit. 2013-04-20]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9126442>
68. TZELEPI, E., M. DANIILIDOU, V. MIRIAGOU, E. SIATRAVANI, E. PAVLIDOU a A. FLEMETAKIS. Cluster of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to the newer cephalosporins in Northern Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2008-6-12, roč.62, č. 3, s. 637-639 [cit. 2013-04-11]. ISSN 0305-7453. DOI: 10.1093/jac/dkn236. Dostupné z: <http://www.jac.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jac/dkn236>
69. UNEMO, Magnus, Daniel GOLPARIAN, Robert NICHOLAS, Makoto OHNISHI, Anne GALLAY a Patrice SEDNAOUI. High-Level Cefixime- and Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: Novel penA Mosaic

Allele in a Successful International Clone Causes Treatment Failure.
Antimicrobial Agents Chemotherapy [online]. 2011, roč. 56, č. 3 [cit. 2013-04-11]. DOI:10.1128/AAC.05760-11. Dostupné z:
<http://aac.asm.org/content/56/3/1273.full>

70.VAN DER DOES, Chris. Conjugative Plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*.
PLoS ONE [online]. 2010, roč. 5, č. 4, e9962- [cit. 2013-04-20]. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0009962.
Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0009962>

71._VELICKO, I. a M. UNEMO. Recent trends in gonorrhoea and syphilis epidemiology in Sweden: 2007 to 2011. *Eurosurveillance* [online]. 2012, roč. 29, č. 17 [cit. 2013-04-27]. Dostupné z:
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20223>

72.Kapavka. *Vitalion* [online]. ., . [cit. 2013-04-21]. Dostupné z:
<http://nemoci.vitalion.cz/kapavka/>

73.Výskyt multirezistentních gramnegativních bakterií v českých nemocnicích – upozornění na problém šíření bakterií produkujících transferabilní karbapenemá. In: *SZU* [online]. 2011 [cit. 2013-04-21]. Dostupné z:
http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/doporucene_postupy/surveillance_g/aktivni_surveillance_multirezistentnich_gramnegativnich_bakterii.pdf

Seznam použité literatury:

74.BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1. Praha:

Marvil, 1996, 558 s. ISBN 80-238-0297-6.

75.BORRIELLO, S, Patrick R MURRAY a Guido FUNKE. *Topley and Wilson: Microbiology and microbial infections*. 10th ed. London: Hodder Arnold, 2005, 772-2209. ISBN 03408856532.

76. DASTYCH, Milan a Petr BREINEK. *Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2008, 232 s. ISBN 978-802-1045-729.

77.DR. NOVÁKOVÁ, Lucie. *Hmotnostní spektrometrie*. Výukový materiál Farmaceutické fakulty v HK, 2011.

78.*Kultivační a mikroskopické vyšetření na GO ze stěrů z urogenitálního traktu, rekta, krku*. SOP OKM FN Brno, .

79.MAHON, Connie R, Donald C LEHMAN a George MANUSELIS. *Textbook of diagnostic microbiology*. 4th ed. Maryland Heights, Mo.: Saunders/Elsevier, c2011, xvii, 1080 p. ISBN 14-160-6165-7.

80.MUDR. ZAHRADNÍČEK, Ondřej. *Odběr, transport a zpracování různých typů vzorků k mikrobiologickému vyšetření*. Výukový materiál OKB FNUSA, 2009.

81.MURRAY, Patrick R, Ken S ROSENTHAL a Michael A PFALLER. *Medical microbiology*. 6th ed. Philadelphia: Mosby/Elsevier, c2009, x, 947 p. ISBN 978-032-3054-706.

82.*Neisseria gonorrhoeae RT-PCR (Smart cyclor)*. SOP OKM FN Brno, .

83.PHARMDR. LIBRA, Antonín, Ph.D. *Kvantifikace genové exprese pomocí real-time PCR*. Generi Biotech, 2012, výukový materiál Generi Biotech

84.PHARMDR. LIBRA, Antonín, Ph.D. a Lenka MGR. HUBÁLKOVÁ. *PCR*. Generi Biotech, 2012, výukový materiál Generi Biotech

85.SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010, 223 s., [24] s. příl. ISBN 978-802-4731-704.

86.*Stanovení citlivosti k antibiotikům kvantitativně: definovaný gradient antibiotika*. SOP OKM FN Brno, .

87.*Stanovení citlivosti k antibiotikům kvalitativně: Disková difuzní metoda*.SOP OKM FN Brno, .

88.VOTAVA, Miroslav. A KOL. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902-8966-5

89.VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, c2010, 495 s. ISBN978-80-86850-04-7.

90.VOTAVA, Miroslav, Zdeněk BROUKAL a Jiří VANĚK. *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékaře*. Brno:Neptun, c2007, xxv, 567 s. ISBN 978-808-6850-030.

91.WILSON, Brenda A a Abigail A SALYERS. *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. 3rd ed.Washington, DC: ASM Press, c2011, xiv, 526 p. ISBN 978-155-5814-182.

Seznam zdrojů obrázků:

92. <http://ihm.nlm.nih.gov/luna/servlet/detail/NLMNLM~1~1~101424281~185006?printerFriendly=1>

93. <http://academictree.org/idtree/peopleinfo.php?pid=36979>

94. <http://biosiva.50webs.org/ed.htm>

95. MUDR. ZAHRADNÍČEK, Ondřej. Přehled gramnegativních bakterií.
Výukový materiál OKB FNUSA, 2010.

96. <http://www.cytologystuff.com/learn/mole/molecular3b.asp>

97. <http://www.biochemj.org/bj/449/bj4490631add.htm>

98. http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB3294594.htm

99. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ed/Streptogramin_A.svg

100. http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Gonococcal_urethritis_PHIL_4085_lores.jpg

101. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20225>