

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA HRADEC KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

**MOŽNOSTI STANOVENÍ ŠIROKOSPEKTRÝCH BETA-
LAKTAMÁZ A JEJICH VÝZNAM PRO KLINICKOU
MIKROBIOLOGII**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Lydie Szkanderová
VEDOUCÍ PRÁCE: Doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc.
ŠKOLITEL SPECIALISTA: Prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D.

v Hradci Králové 2008

Prohlašuji:

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

V Olomouci dne 9.5.2008

Lydie Szkanderová

Poděkování:

Děkuji prof. MUDr. M. Kolářovi, PhD. z Ústavu mikrobiologie FNO a LF UP v Olomouci a doc. RNDr. V. Buchtovi, CSc. z Ústavu klinické mikrobiologie LF UK v HK a FN HK za cenné rady a připomínky při provedení a zpracování této bakalářské práce.

OBSAH

1. Cíle	5
2. Souhrn	6
3. Problematika bakteriální rezistence	7
3.1 Definice bakteriální rezistence	8
3.2 Příčiny vzniku a šíření bakteriální rezistence	9
3.3 Stanovování rezistence bakterií k antimikrobním přípravkům	9
3.3.1 Difúzní testy	9
3.3.2 Diluční testy	10
4. Bakteriální beta-laktamázy a jejich detekce.....	12
4.1 Klasifikace beta-laktamáz	12
4.2 Detekce AmpA beta-laktamáz (ESBL)	14
4.3 Detekce AmpC beta-laktamáz	16
5. Experimentální část	22
5.1 Metodika	22
5.2 Výsledky	23
6. Diskuze	27
7. Závěr	29
8. Literatura	30

1. Cíle

Cíle předložené bakalářské práce lze konkretizovat následujícími body:

- 1) Charakteristika bakteriálních beta-laktamáz a možnosti jejich detekce v rutinní mikrobiologické praxi.
- 2) Ověření definovaných fenotypových metod k určení produkce širokospektrých beta-laktamáz AmpA a AmpC.

2. Souhrn

Rezistence klinických bakteriálních izolátů k beta-laktamovým antibiotikům, podmíněná produkcí širokospektrých beta-laktamáz AmpA a AmpC, představuje stále rostoucí problém. Jejich detekce a správné určení bakteriální rezistence mohou být obtížné a řada kmenů produkujících uvedené enzymy je falešně interpretována jako citlivé k širokospektrým beta-laktamovým antibiotikům. Tato skutečnost může vést k selhání antibiotické léčby.

V běžné mikrobiologické praxi jsou použitelné především fenotypové metody. Jedním z možných přístupů je provedení diluční mikrometody a na základě výsledků u jednotlivých antibiotik lze určit další diagnostický postup pro identifikaci event. širokospektrých beta-laktamáz. Jako možné se jeví posouzení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) cefoxitinu, cefotaximu, ceftazidimu, cefepimu a stanovení jejich poměru v případě cefoperazonu a kombinace cefoperazon/sulbaktam.

1. Pokud je MIC cefoxitinu menší než 32 mg/l a výše uvedený poměr větší než 2:1, je nutné předpokládat produkci AmpA enzymů a provést modifikovaný Double Disk Synergy Test. Modifikace spočívá v zařazení disku s cefepimem a současném použití disku ceftazidimu s kys. klavulanovou. Pozitivní výsledek lze detekovat na základě klasického tvaru rozšíření inhibiční zóny mezi disky cefalosporinů nebo aztreonamu a diskem s kombinací amoxicilin + kys. klavulanová a současně porovnáním velikosti zón kolem disků ceftazidimu a ceftazidimu s kys. klavulanovou.
2. Pokud je MIC cefoxitinu ≤ 16 mg/l, MIC cefepimu ≤ 4 mg/L a výše uvedený poměr $\leq 2:1$, je nutné předpokládat produkci AmpC enzymů a provést diskový test s disky cefotaximu, ceftazidimu a jejich kombinacemi s kys. 3-aminofenylboritou, která je inhibitorem těchto enzymů.

Výše uvedené diagnostické postupy byly otestovány na souboru kmenů *Klebsiella pneumoniae* izolovaných z klinického materiálu pacientů Fakultní nemocnice Olomouc. Na základě výsledků lze dokladovat, že navržený diagnostický postup detekuje AmpA-pozitivní a současně AmpC-pozitivní izoláty uvedeného species.

3. Problematika bakteriální rezistence

Zvyšování bakteriální rezistence k antimikrobním léčivům je výrazný problém současného zdravotnictví [1-6]. Alexander Fleming popsal v roce 1928 antibakteriální účinek plísně rodu *Penicillium* na bakterii *Staphylococcus aureus* a tím zahájil antibiotickou éru. Objev penicilinu a jeho uvedení do praxe v roce 1942 představovaly důležitý zlom v medicíně, protože do této doby byly bakteriální infekce nejdůležitější příčinou úmrtnosti. Po penicilinu se postupně v terapeutické praxi objevovaly další antimikrobní přípravky a dokonce se uvažovalo o vymizení bakteriálních onemocnění jako zdravotnického problému. Bohužel se toto očekávání nenaplnilo a naopak, v roce 1992 Dr. Herold Neu ve svém článku v Science upozornil na alarmující nárůst odolnosti bakterií k účinku antimikrobní léčby [7]. Bývalý generální ředitel SZO Hiroshi Nakajima v roce 1996 dokonce prohlásil „*Stojíme na hranici globální krize způsobené infekčními chorobami. Optimistické očekávání vycházející ze 60. a 70. let, že infekce, především bakteriální, lze dostat pod kontrolu vedlo mezinárodní společenství ke zhoubnému uspokojení, které si nyní vybírá daň ve formě milionů lidských životů*“.

Je nutné zdůraznit, že na infekční onemocnění umírá na celém světě velký počet lidí, přičemž podstatnou část tvoří bakteriální infekce. Bakteriální infekce lze zjednodušeně chápat jako „*nefyziologicky probíhající interakci mezi bakterií a člověkem*“. Důležitou součástí jejich léčby je aplikace antibiotik. Bohužel však antimikrobní léčiva byla po dlouhou dobu a řadou generací lékařů považována za bezpečné léky a velmi často se uplatňoval názor „*Je lépe antibiotikum vždy podat, a to i případech kdy se pravděpodobně o bakteriální infekci nejedná*“. Současně se aplikace antibiotik stala v řadě případů i prvkem alibismu a uplatňoval se názor, že v podstatě není vůbec nutné a ani důležité zjišťovat původce onemocnění, protože hlavně širokospektrá antibiotika vše vyřeší.

Je zřejmé, že k důležitým schopnostem bakterií patří zvyšování jejich odolnosti k antimikrobním přípravkům a z tohoto důvodu k velmi závažným nežádoucím projevům antibiotik patří vznik a šíření bakteriální rezistence, tedy

schopnosti bakteriální populace přežít účinek antimikrobního přípravku. Hnací silou výskytu a šíření bakteriální rezistence je selekční tlak antibiotika. Klasickým příkladem je jeden z hlavních lidských bakteriálních patogenů *Staphylococcus aureus*, který byl původně citlivý na penicilin. Již v padesátých letech však většina kmenů tohoto species byla k tomuto antibiotiku rezistentní. Medicínský vývoj přinesl nové antibiotikum s účinností na penicilin-rezistentní kmeny *S. aureus*, a to methicillin (v našich podmínkách oxacilin). Bohužel, jeho široké používání vedlo k objevení se kmenů s rezistencí na methicilin (tzv. methicilin-rezistentní kmeny *S. aureus* – MRSA). Proto se v terapii infekcí vyvolaných těmito kmeny začaly používat glykopeptidy, především vankomycin. I v jeho případě nadměrná aplikace postupně přispěla ke vzniku vankomycin-rezistentních enterokoků. Navíc, gen kódující rezistenci na vankomycin byl přenesen i na stafylokoky a od začátku tohoto tisíciletí jsou popisovány vankomycin-rezistentní kmeny *S. aureus* [8-9].

3.1 Definice bakteriální rezistence

Rezistenci bakterie k antimikrobnímu přípravku lze definovat jako schopnost bakteriální populace přežít účinek inhibiční koncentrace příslušného antibiotika. Existují dva základní typy:

- *Přirozená (primární) rezistence*

přirozená odolnost bakteriálních druhů, které jsou mimo spektrum účinku příslušného antibiotika. Nejdůležitější příčinou je nepřítomnost cílové struktury.

- *Získaná (sekundární) rezistence*

změna z původně citlivé bakterie na rezistentní. Tento typ je v současné době závažným medicínským problémem z důvodu možnosti selhání antibiotické léčby.

3.2 Příčiny vzniku a šíření bakteriální rezistence

Vznik a šíření bakteriální rezistence jsou způsobeny rychlou evolucí bakteriálního genomu a selekčním tlakem antimikrobních přípravků [10]. Nejdůležitějším faktorem vzniku a šíření rezistence jsou změny bakteriálního genotypu. Tyto změny lze definovat následujícími body:

- modifikace genu na chromozomu, v tomto případě se jedná o tzv. chromozomální rezistenci,
- převzetí genetického materiálu od rezistentních bakteriálních buněk rekombinačními procesy (tzv. extrachromozomální rezistence).

3.3 Stanovování rezistence bakterií k antimikrobním přípravkům

Zjištění citlivosti bakteriálního původce na antibiotika in vitro je důležitým předpokladem kauzální antibiotické léčby. Dalším, neméně důležitým úhlem pohledu je nutnost surveillance bakteriální rezistence v jejím plném rozsahu. V současné době je zřejmé, především v případě pacientů s život-ohrožujícími bakteriálními infekcemi, že antibiotická léčba musí být zahájena co nejdříve. V krátkém časovém intervalu je však velmi problematické stanovit bakteriální etiologické agens a jeho citlivost k antibiotikům. Při volbě adekvátní antibioterapie však lze vycházet, mimo jiné, i z výsledků pravidelného a kontinuálního stanovování citlivosti či rezistence bakterií k antibiotikům.

Metody používané ke stanovení citlivosti bakterií k antimikrobním přípravkům lze klasifikovat jako difúzní a diluční.

3.3.1 Difúzní testy

Difúzní testy jsou pouze kvalitativní. Poskytují informaci o citlivosti nebo rezistenci bakterie k testovanému antibiotiku. Jejich principem je postupné uvolňování antibiotika z vhodného zdroje do agarové půdy inokulované vyšetřovaným kmenem mikroba. V průběhu inkubace difundující antibiotikum

inhibuje ve svém okolí růst citlivých bakterií a dochází tak k vytvoření inhibiční zóny. Nejčastěji je používána disková difúzní metoda.

Další možností je E-test, kdy zdrojem konkrétního antibiotika je plastický proužek, obsahující exponenciálně rostoucí koncentrace. Umožňuje stanovit MIC. Proužky obsahující různá antibiotika jsou kladeny na inokulovanou půdu. Po 16-18h inkubaci se v případě citlivých bakterií vytváří zóna inhibice růstu ve tvaru elipsy, která přetíná proužek s antibiotikem právě v místě udávajícím hodnotu MIC.

3.3.2 Diluční testy

Při testování citlivosti či rezistence bakterie je vhodnější stanovit hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC), která ukazuje i míru citlivosti bakterie ke konkrétnímu antibiotiku. Toto kvantitativní posouzení umožňuje výběr nejvhodnějšího léku a usnadňuje volbu optimálního dávkování.

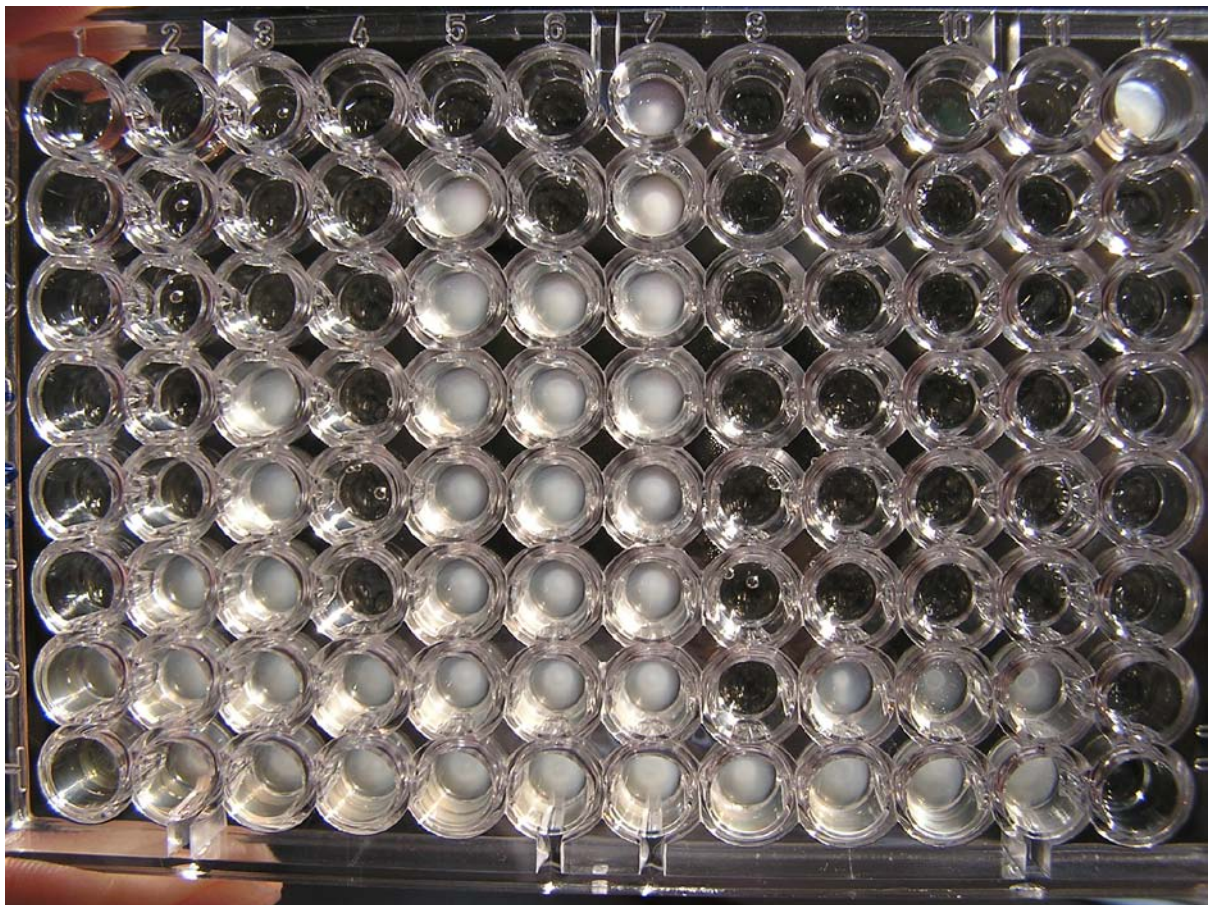
Principem dilučních testů je použití odstupňovaných koncentrací antibiotika (řaděných geometrickou řadou) v tekutých nebo tuhých půdách. Půdy všech koncentrací jsou inokulovány standardním množstvím čisté kultury testovaného kmene. Po inkubaci se zjišťuje, při kterém nejmenším množství antibiotika (v mg na 1 l půdy) došlo k zástavě viditelného růstu bakteriální populace.

Diluční testy lze provádět jak v prostředí tekutém (test zkumavkový, diluční mikrometoda), tak tuhém (test agarový). Kontrola kvality použitých antimikrobních přípravků, resp. jejich koncentrací, se realizuje pomocí referenčních kmenů se známým rozmezím hodnot MIC pro jednotlivá antibiotika. Současně se ověřují růstové schopnosti vyšetřovaného kmene na půdě bez antibiotika.

Diluční mikrometoda je v současné době nejpoužívanějším dilučním testem. Provádí se v jamkách mikrotitrační destičky, která obsahuje přesně definované koncentrace antibiotik v 100 μ l bujónu. Po naočkování celé destičky (12x8 jamek) vyšetřovaným kmenem a inkubaci se odečítá MIC. Obvykle se stanovuje MIC 12 antibiotik pro jeden bakteriální kmen za použití 8 koncentrací.

Při hodnocení se porovná růst testované bakterie v kontrolní jamce bez antibiotika (zákal nebo sediment) s růstem v jamkách s antibiotiky. Kmeny s MIC shodnou nebo nižší než je mezinárodně stanovená hraniční koncentrace (breakpoint), se označí jako citlivé k hodnocenému antibiotiku. Rezistentní kmeny vykazují MIC vyšší než je hraniční koncentrace. Výsledek diluční mikrometody je znázorněn na obrázku 1.

Obrázek 1: Výsledek diluční mikrometody



Legenda:

Každý sloupec obsahuje jedno antibiotikum v 8 různých koncentracích (řaděných geometrickou řadou) od minimální (spodní část destičky) po maximální (vrchní část destičky).

První jamka (odspodu) bez růstu určuje MIC příslušného antibiotika.

4. Bakteriální beta-laktamázy a jejich detekce

K nejdůležitějším obranným mechanismům gramnegativních bakterií vůči beta-laktamovým antibiotikům patří v současné době produkce enzymů inaktivujících účinek těchto antimikrobních léčiv [11]. Běžně se používá název beta-laktamázy [12].

Nejedná se pouze o teoretickou mikrobiologickou záležitost, ale o problém týkající se celé medicíny. Dopad zvyšující se četnosti multirezistentních gramnegativních bakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz lze spatřovat především v prodloužené době hospitalizace pacientů s infekcemi vyvolanými těmito bakteriálními kmeny, zvyšování ekonomických nákladů a v neposlední řadě ve zvýšené mortalitě podmíněné selháním antibiotické léčby [13].

4.1 Klasifikace beta-laktamáz

Bakteriální beta-laktamázy mohou být klasifikovány podle různých kritérií, např. hydrolytického spektra, citlivosti k inhibitorům beta-laktamáz nebo podle toho, zda jsou kódovány chromozomem nebo plasmidem. K nejužívanějším patří klasifikace Bushové-Jacoby-Medeirose, která zařazuje tyto enzymy podle preferovaného substrátu a podle jejich citlivosti k inhibitorům, a členění beta-laktamáz podle Amblera vycházející ze sekvencí aminokyselin [14,15].

Klasifikace Bushové-Jacoby-Medeirose popisuje 4 skupiny:

Skupina 1: Obsahuje beta-laktamázy, které nejsou inhibovány kys. klavulanovou. Většinou jsou kódovány chromozomálně. Některé z nich odpovídají beta-laktamázám třídy C podle Amblera. Hlavními producenty těchto enzymů jsou enterobakterie a kmeny *Pseudomonas aeruginosa*.

Skupina 2: Je největší, obsahuje enzymy kódované plasmidy, které jsou obvykle dobře inhibovatelné kys. klavulanovou a jsou dále členěny do podskupin podle preferovaného substrátu.

Do této skupiny lze zařadit i širokospektré beta-laktamázy ESBL (Extended Spectrum Beta Lactamases).

- Skupina 3: Obsahuje metalo-beta-laktamázy (molekulární třída B), které hydrolyzují široké spektrum substrátů, včetně karbapenemů, s výjimkou aztreonamu.
- Skupina 4: Zahrnuje málo četné enzymy, které jsou produkovány některými kmeny *Burkholderia cepacia*.

Amblerova klasifikace rovněž definuje 4 skupiny, resp. třídy:

- Třída A: Většinou jsou kódovány plasmidy. Nejčastějšími beta-laktamázy třídy A u čeledi *Enterobacteriaceae* jsou enzymy TEM-1,2 a SHV-1. Mutací těchto původních enzymů došlo ke vzniku a rozšíření širokospektrých beta-laktamáz AmpA (ESBL), zahrnujících především enzymy typu TEM, SHV a CTX-M.
- Třída B: Molekulární beta-laktamázová třída B je charakteristická svou účinností na karbapenemy.
- Třída C: Do této třídy patří chromozomální beta-laktamázy typu AmpC, které mohou mít inducibilní nebo konstitutivní charakter. Jejich produkce je popisována například u kmenů *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Morganella morganii* a *Pseudomonas aeruginosa*. Rezistence obvykle není reverzibilní účinkem inhibitorů beta-laktamáz. V současné době jsou, především u kmenů *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli*, popisovány beta-laktamázy typu AmpC kódované plasmidy (tzv. transferabilní AmpC beta-laktamázy).
- Třída D: Do třídy D jsou zařazovány OXA enzymy, produkované kmeny *Aeromonas* sp. a nefermentujících bakterií.

4.2 Detekce AmpA beta-laktamáz (ESBL)

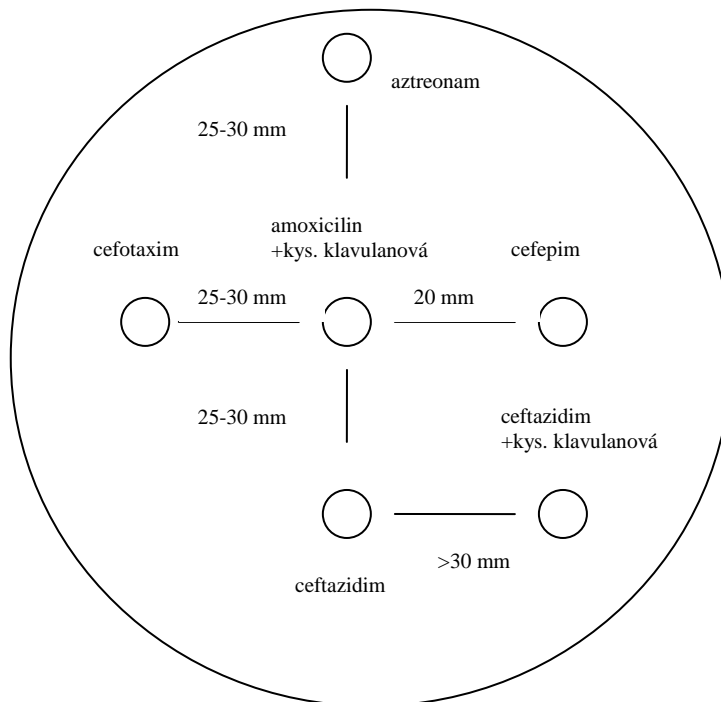
Výchozí screening na základě stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) vybraných antimikrobních přípravků nebo diskové difúzní metody je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: Výchozí screening produkce ESBL

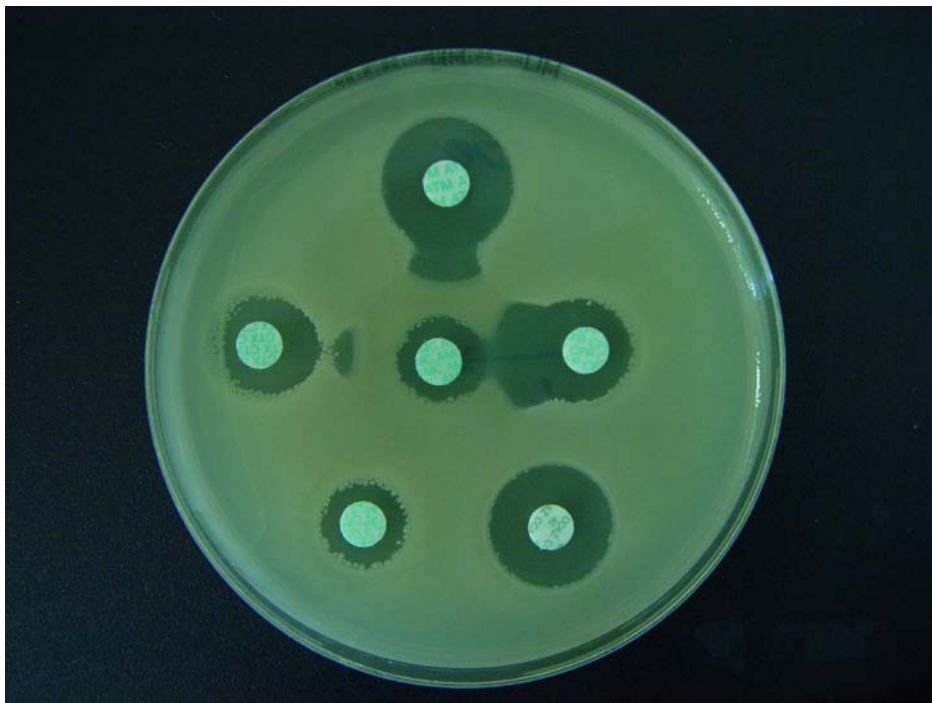
Diluční mikrometoda: alespoň jeden z následujících výsledků - MIC ceftazidimu, cefotaximu, cefoperaronu ≥ 2 mg/l
MIC cefoxitinu ≤ 16 mg/l
Poměr MIC cefoperazonu a kombinace cefoperazon/sulbaktam $> 2:1$
Testovaný kmen je citlivý alespoň na jeden z cefalosporinů III. generace (jedná se o vyloučení falešné citlivosti)

V případě pozitivního „screeningu“ je nutné provést modifikovaný Double Disk Synergy Test (DDST), který je uveden na schématu 1 [16]. Tento test představuje modifikaci klasického DDST podle Jarliera [17]. Výsledek je hodnocen na základě event. přítomnosti klasického tvaru rozšíření inhibiční zóny mezi disky cefalosporinů nebo aztreonamu a diskem s kombinací amoxicilin+kys. klavulanová a současně porovnáním velikosti zón kolem disků ceftazidimu a ceftazidimu s kys. klavulanovou (za pozitivní výsledek je považováno rozšíření zóny inhibice růstu kolem disku obsahujícího ceftazidim s kys. klavulanovou o více než 5 mm v porovnání se zónou kolem samotného ceftazidimu). Pozitivní průkaz produkce ESBL je zvýšen v případě, že vzdálenost disků cefepimu a amoxicilinu s kys. klavulanovou je 20 mm. Uvedená modifikace může přispět k omezení falešně negativních výsledků. Praktické provedení navrženého testu je znázorněno na obrázku 2.

Schéma 1: Modifikovaný DDST k detekci ESBL



Obrázek 2: Praktické provedení modifikovaného DDST testu s pozitivním výsledkem u kmene *Klebsiella pneumoniae*



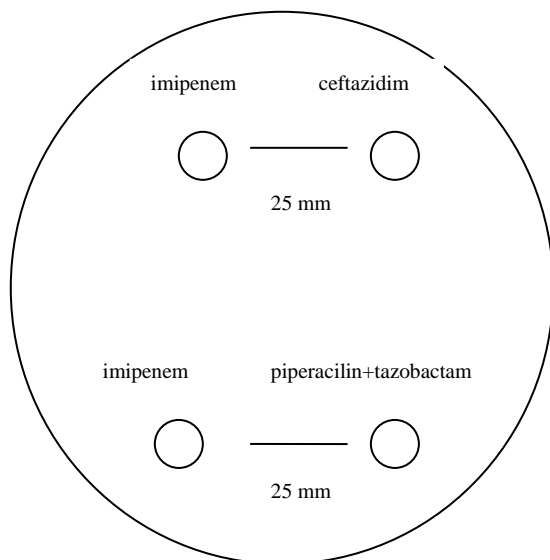
Legenda:
Umístění disků podle schématu 1.

4.3 Detekce AmpC beta-laktamáz

V případě chromozomálních AmpC beta-laktamáz může být jejich produkce konstitutivní (tzv. derepresované mutanty) nebo inducibilní [18]. Problém představuje především inducibilní produkce, kterou nelze běžnými metodami detekovat. Tato produkce nemusí nutně znamenat neúspěch léčby cefalosporiny III. generace u konkrétního pacienta. Jejich význam a nebezpečí spočívají v možnosti mutace vyvolávající konstitutivní nadprodukcí těchto enzymů, která je pak ireverzibilní a stálá a současně podmiňuje selhání léčby cefalosporiny [19]. Schéma 2 znázorňuje možné provedení diskového testu na průkaz inducibilní produkce AmpC enzymů. Test představuje modifikaci podle doporučení Dunneho a Hardina [20]. Test je založen na indukci AmpC beta-laktamázy silným induktorem a typickým „useknutím“ (zúžením o více jak 2 mm) inhibiční zóny cefalosporinu III. generace na straně přivrácené k disku s induktorem (Obr. 3). V rutinní mikrobiologické praxi nelze všechny izolované enterobakterie takto testovat, je však možné provádět tento jednoduchý test u vybraných izolátů.

Podezření lze vyslovit i na základě současného použití disku cefalosporinu III. nebo IV. generace a jeho kombinace s kys. klavulanovou za předpokladu, že zóna kolem disku obsahujícího kombinaci je menší.

Schéma 2: Diskový test na průkaz indukibilní produkce AmpC



Obrázek 3: Pozitivní výsledek testu na průkaz indukibilní produkce AmpC u kmene *Enterobacter aerogenes*



Legenda:

Umístění disků podle schématu 2.

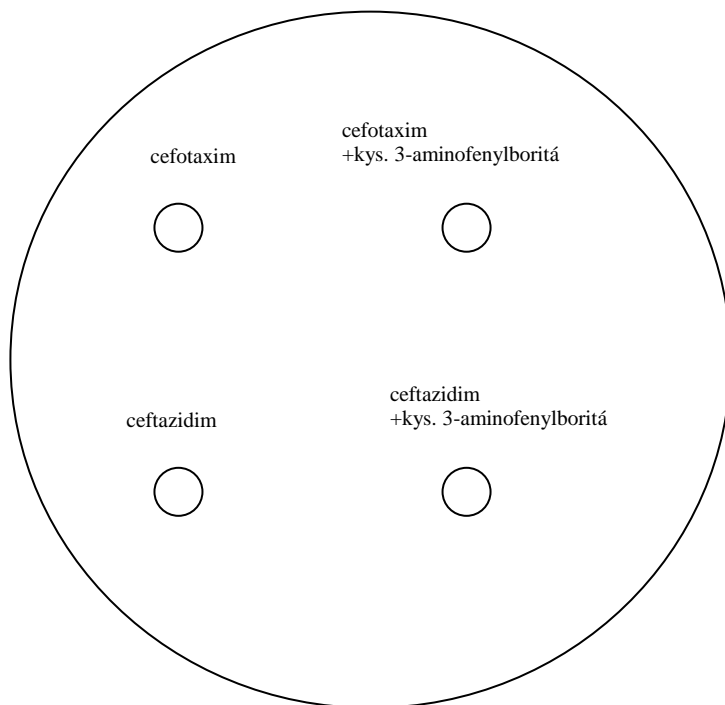
První dvojice disků (nahore) vykazuje falešně negativní výsledek

Vedle ESBL (AmpA podle Amblera) a chromozomálních AmpC nabývají na významu AmpC enzymy kódované plasmidy, tzv. transferabilní AmpC beta-laktamázy [21]. Bakterie produkující tento typ enzymů byly poprvé popsány na konci 80. let minulého století [21,22]. Jedná se o deriváty chromozomálních AmpC enzymů a v současné době jsou popisovány především u kmenů *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli* [18]. Ačkoliv jsou známy téměř 20 let, jejich klinický význam a možnosti detekce v rutinní mikrobiologické praxi stále unikají větší pozornosti. Je však nutné zdůraznit, že jejich produkci lze spojovat s falešně citlivými výsledky při provádění běžných testů stanovení rezistence a možným selháním léčby vedoucím až ke smrti pacientů [23].

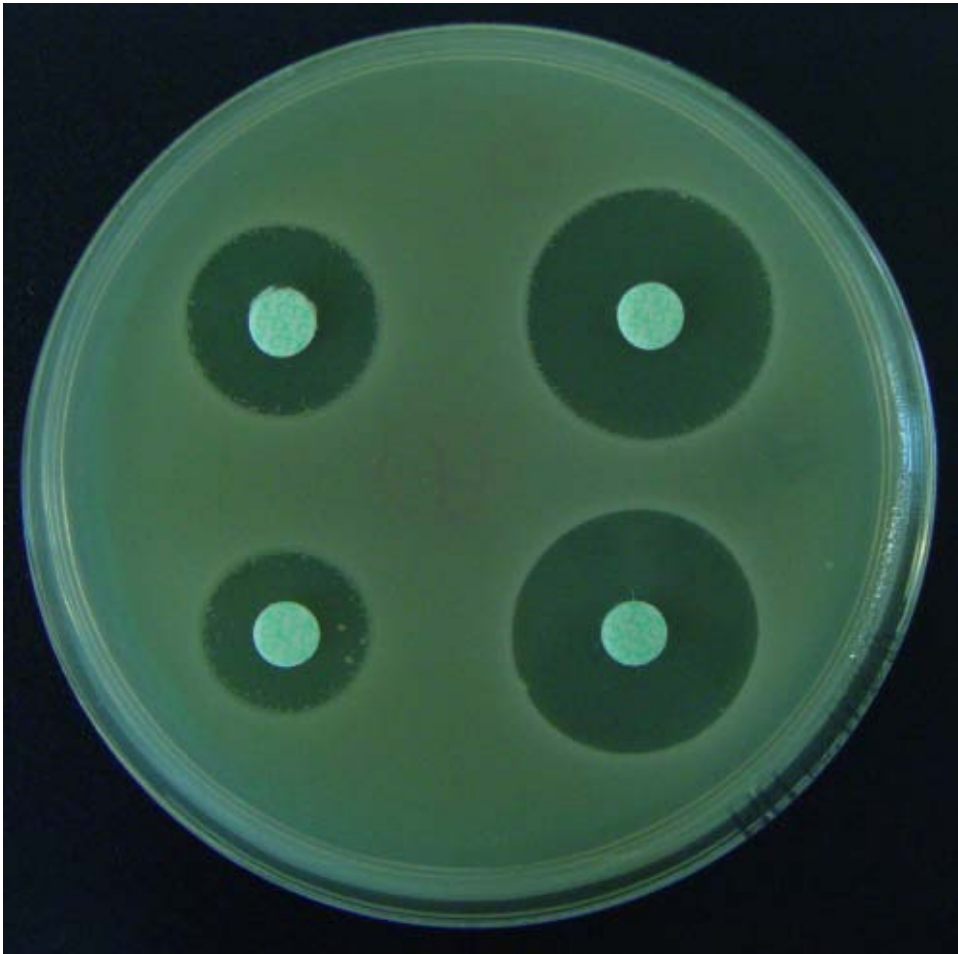
Pro detekci transferabilních AmpC beta-laktamáz lze použít modifikovaný diskový test s disky cefotaximu, ceftazidimu a jejich kombinací s kys. 3-aminofenylboritou, která je inhibitorem AmpC beta-laktamáz (Schéma 3) [24]. Při použití standardních antibiotických disků obsahujících 400 µg této kyseliny lze detekovat produkci uvedených enzymů na základě rozšíření inhibiční zóny o více jak 5 mm při porovnání s disky bez kys. 3-aminofenylborité. Praktická realizace tohoto testu je znázorněna na obrázku 4.

Výchozí screening na základě stanovení minimálních inhibičních koncentrací vybraných antimikrobních přípravků nebo diskové difúzní metody je uveden v tabulce 2.

Schéma 3: Disková metoda k průkazu AmpC beta-laktamáz za použití kys. 3-aminofenylborité



Obrázek 4: Pozitivní výsledek diskové metody za použití kys. 3-aminofenylborité (průkaz AmpC beta-laktamázy u kmene *Klebsiella pneumoniae*)



Legenda:

Disky cefotaximu a ceftazidimu s kys. 3-aminofenylboritou jsou umístěny vpravo, zóna inhibice kolem těchto disků je větší o více jak 5 mm (pozitivní výsledek)

Tabulka 2: Výchozí screening“ produkce AmpC enzymů

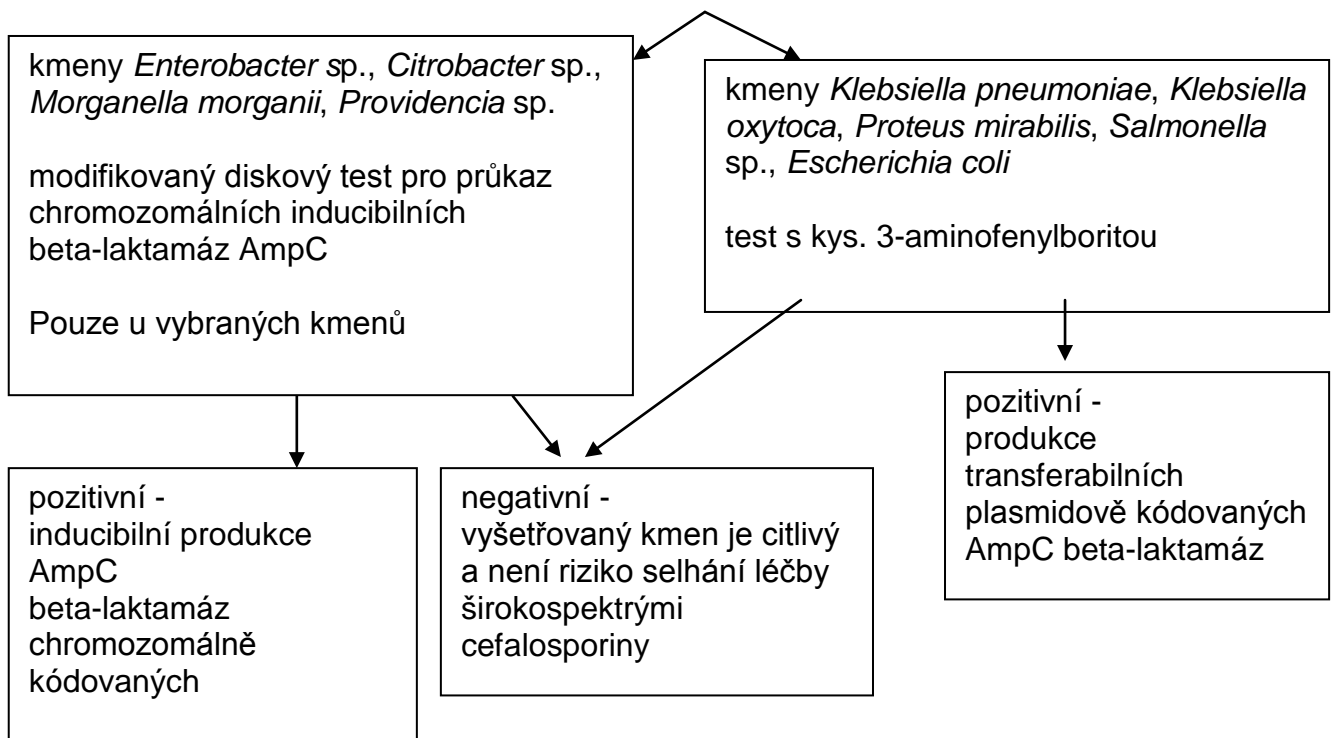
Diluční mikrometoda: alespoň jeden z následujících výsledků: MIC ceftazidimu, cefotaximu, cefoperazonu ≥ 2 mg/l

Výsledek MIC cefepimu: ≤ 4 mg/l

Výsledek MIC cefoxitinu: ≥ 16 mg/l

Poměr MIC cefoperazonu a kombinace cefoperazon/sulbaktam $\leq 2:1$

Testovaný kmen je citlivý alespoň na jeden z cefalosporinů III. generace (jedná se o vyloučení falešné citlivosti)



5. Experimentální část

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo ověření možnosti detekovat bakteriální kmeny s produkcí širokospektrých beta-laktamáz AmpA a AmpC v běžné mikrobiologické praxi.

5.1 Metodika

V období 1.11.–31.12.2007 bylo z klinického materiálu (tracheální endosekret, sputum, krev, moč, punktát, sekret z rány) pacientů hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Olomouc izolováno 100 kmenů *Klebsiella pneumoniae*. Sběr izolátů byl konsektivní a byly vyloučeny duplikáty. K identifikaci byly použity standardní mikrobiologické postupy za pomoci Enterotestu16 (Pliva-Lachema) a automatizovaný systém Vitek2.

Citlivost k antibiotikům (ampicilin/sulbaktamu, piperacilin/tazobaktamu, cefoxitinu, cefoperazonu, cefotaximu, ceftazidimu, cefoperazon/sulbaktamu, meropenemu) byla stanovena standardní diluční mikrometodou [25-26]. Při přípravě inokula bylo 3 až 5 kolonií testované bakterie z čerstvé kultury na Endově půdě (Trios, s.r.o.) přeneseno kličkou do 1 ml Mueller Hinton (MH) bujónu (HIMEDIA) tak, aby bylo dosaženo koncentrace $1,5-3 \times 10^8$ buněk/ml (0,5-1 podle McFarlandova zákalového standardu). Koncentrace inokula byla dále upravena přidáním 10 ml fyziologického roztoku. Inokulum bylo nalito do Petriho misky, ze které byly naočkovány pomocí aplikátoru s jehlami všechny jamky v mikrodestičce s antibiotiky (Trios, s.r.o.). Naočkované mikrodestičky byly umístěny do inkubátoru (36-37 °C) na dobu 16-18 h. Po inkubaci se porovnal růst testované bakterie v kontrolní jamce bez antibiotika (zákal nebo sediment) s růstem v jamkách s antibiotiky a následně odečtena nejnižší koncentrace konkrétního antibiotika, která zřetelně inhibovala růst (MIC). Kmeny s MIC shodnou nebo nižší než je hraniční koncentrace (breakpoint) byly označeny jako citlivé k hodnocenému antibiotiku. Rezistentní kmeny vykazovaly MIC vyšší než je hraniční koncentrace.

Podmínkou pro zařazení do souboru byla hodnota ~~MIC~~ mg/l pro alespoň jeden z testovaných cefalosporinů III. generace.

U všech kmenů s minimální inhibiční koncentrací alespoň jednoho z testovaných cefalosporinů III. generace (cefotaximu, ceftazidimu nebo cefoperazonu) vyšší jak 1 mg/l byl proveden modifikovaný DDST ke stanovení produkce ESBL nebo AmpC diskový test k průkazu AmpC enzymů podle výše definovaných postupů.

Příprava inokula pro modifikovaný DDST a AmpC diskový test byla shodná s postupem při standardní diluční mikrometodě. Takto připravené inokulum bylo přelito na MH agar (Trios, s.r.o.) s pH 7,2-7,4. Do 15 minut byly na MH agar umístěny příslušné antibiotické disky (BioRad) podle schématu 1 a 3. Vyhodnocení bylo provedeno porovnáním inhibičních zón tak, jak je znázorněno na obrázcích 2 a 4.

5.2 Výsledky

U 37 kmenů byl prokázán antibiogram s MIC některého z testovaných cefalosporinů III. generace (cefotaximu, ceftazidimu nebo cefoperazonu) vyšší jak 1 mg/l. Na základě modifikovaného DDST byla stanovena produkce ESBL u 16 kmenů (16 %). Hodnoty MIC vybraných antimikrobních přípravků jsou uvedeny v tabulce 3. Z výsledků je zřejmé, že u 13 kmenů se MIC cefoxitinu se pohybovala v rozmezí 1-8 mg/l, u dvou kmenů dosáhla tato hodnota 16 mg/l a pouze u jednoho kmene byla zaznamenána MIC 32 mg/l. U 13 kmenů byla prokázána alespoň 8-násobná redukce MIC cefoperazonu, pokud byl kombinován se sulbaktamem. U 3 kmenů byl tento poměr 4:1.

Tabulka 3: Hodnoty MIC testovaných antibiotik u AmpA-pozitivních kmenů *Klebsiella pneumoniae*

Číslo kmene	Antimikrobní přípravek/hodnota MIC							
	AMS	PPT	CXT	CPR	CTX	CTZ	CPS	MER
1	8	4	4	8	2	16	1	0,5
2	4	4	2	8	2	16	1	0,5
3	16	128	2	16	4	16	4	0,5
4	32	256	8	64	4	4	8	0,5
5	16	32	32	16	8	8	2	1
6	4	16	4	8	1	2	1	0,5
7	8	256	1	32	16	4	4	0,5
8	16	8	4	8	4	16	1	0,5
9	32	256	8	64	2	16	8	0,5
10	32	256	4	32	4	16	4	0,5
11	8	8	2	4	1	16	0,5	0,5
12	16	128	4	4	1	1	1	0,5
13	32	256	4	16	2	16	2	0,5
14	32	32	16	16	8	8	2	1
15	16	16	4	32	4	4	2	0,5
16	8	64	16	16	8	4	4	1

Legenda:

AMS – ampicilin/sulbaktam, PPT – piperacilin/tazobactam, CXT – cefoxitin, CPR – cefoperazon, CTX – cefotaxim, CTZ – ceftazidim, CPS – cefoperazon/sulbaktam, MER – meropenem

Výsledky stanovení pro 7 kmenů s pozitivním AmpC testem jsou uvedeny v tabulce 4. Z výsledků je zřejmé, že tyto izoláty měly MIC cefoxitinu minimálně 32 mg/l a přítomnost sulbaktamu nevedla ke snížení MIC u kombinace s cefoperazonem.

Tabulka 4: Hodnoty MIC testovaných antibiotik u AmpC-pozitivních kmenů *Klebsiella pneumoniae*

Číslo kmene	Antimikrobní přípravek/hodnota MIC							
	AMS	PPT	CXT	CPR	CTX	CTZ	CPS	MER
1	32	64	32	0.5	2	8	0.5	0,5
2	32	64	64	2	2	16	2	1
3	16	128	32	2	1	8	2	0,5
4	32	256	32	1	1	16	1	1
5	16	64	32	0,5	0,5	8	0,5	1
6	32	128	64	2	0,5	4	2	0,5
7	16	256	32	2	0,5	16	2	1

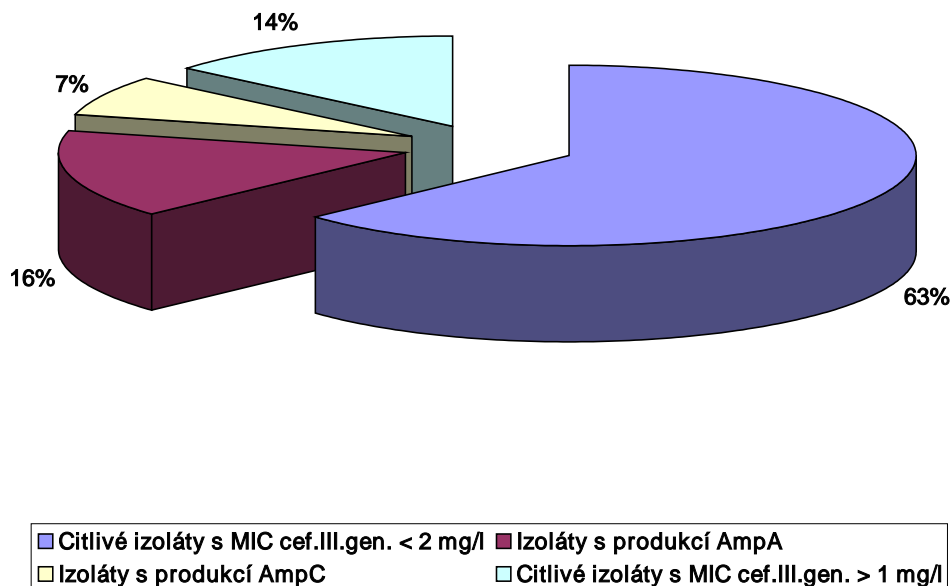
Legenda:

AMS – ampicilin/sulbaktam, PPT – piperacilin/tazobactam, CXT – cefoxitin, CPR – cefoperazon, CTX – cefotaxim, CTZ – ceftazidim, CPS – cefoperazon/sulbaktam, MER – meropenem

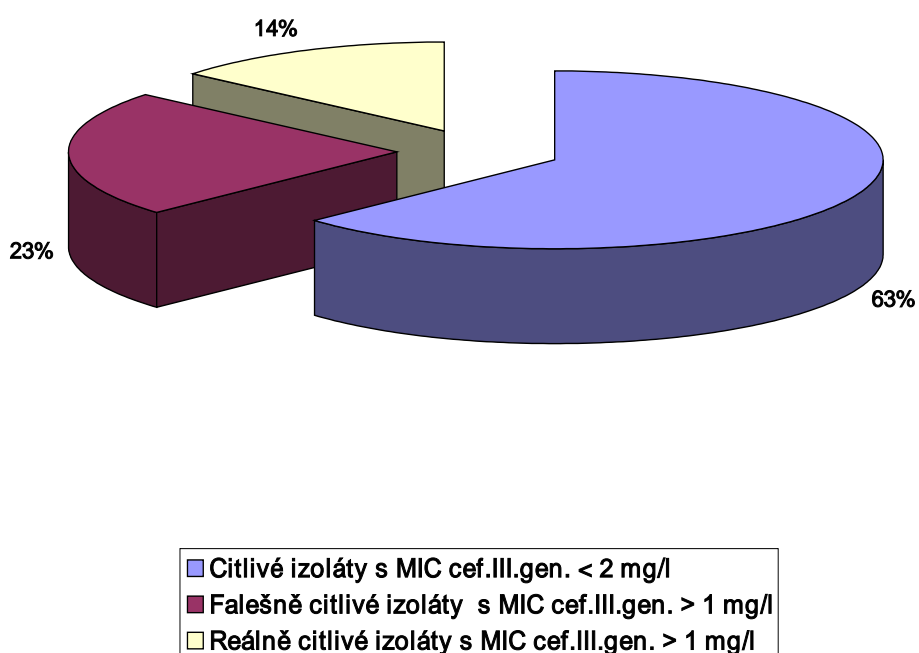
Z uvedených údajů vyplývá, že ze 100 izolátů *Klebsiella pneumoniae* zařazených do souboru, byla u 37 kmenů prokázána MIC rozmezí 2 - 8 mg/l pro alespoň jeden z testovaných cefalosporinů III. generace. Produkce ESBL byla potvrzena u 16 kmenů a přítomnost transferabilních AmpC enzymů u 7 kmenů. Tento výsledek znamená, že u 62 % kmenů s MIC v rozmezí 2 – 8 mg/l alespoň u jednoho z testovaných cefalosporinů III. generace se jednalo o falešnou citlivost a kmen ve skutečnosti produkoval AmpA nebo AmpC širokospektrou beta-laktamázu. Přehledně jsou výsledky uvedeny v grafech 1 a 2.

Výsledky dále prokázaly 100% citlivost kmenů *K. pneumoniae* produkujících širokospektré beta-laktamázy k meropenemu. Je tedy zřejmé, že karbapenemy patří k lékům volby v případě infekcí vyvolaných uvedenými kmeny.

Graf 1: Prevalence kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí širokospektrých beta-laktamáz ve Fakultní nemocnici Olomouc



Graf 2: Interpretace výsledků testování citlivosti izolovaných kmenů *Klebsiella pneumoniae*



6. Diskuze

Vznik a šíření bakteriální rezistence k antimikrobním přípravkům patří k nejdůležitějším problémům současné medicíny. Dopad zvyšujícího se výskytu multirezistentních bakteriálních kmenů lze spatřovat v mnoha oblastech [27]. Mezi nejdůležitější patří:

1. negativní úloha těchto bakterií u infekcí,
2. selhání antibiotické léčby a s tím související vyšší morbidita a mortalita,
3. zvyšující se finanční náklady na antibiotickou léčbu, která je vyvolána nutností používat účinnější a často i dražší přípravky.

V odborné literatuře je k dispozici řada studií dokladujících uvedené skutečnosti. Například Giamarellos-Bourboulis et al. ve své práci uvádějí, že infekce způsobené multirezistentními bakteriemi mají vyšší mortalitu a kratší přežívání v porovnání s infekcemi vyvolanými citlivými bakteriemi. V případě infekcí způsobených citlivými kmeny *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa* dokumentují nulovou mortalitu, u infekcí způsobených multirezistentními kmeny uvedených species popisují 22% mortalitu [28].

K důležitým antimikrobním léčivům, užívaným v léčbě bakteriálních infekcí, patří skupina beta-laktamových antibiotik zahrnující především peniciliny a cefalosporiny. Nejdůležitější biochemický mechanismus rezistence, vyvinutý bakteriemi k inhibici jejich účinku, představují v současné době beta-laktamázy, jejichž produkce je příčinou rezistence zhruba v 80 % [10]. K nejvíce problematickým patří tzv. širokospektré beta-laktamázy, schopné blokovat účinek penicilinů a cefalosporinů s širokým spektrem účinku. V odborné literatuře je popisováno velké množství beta-laktamáz a jejich počet se neustále zvyšuje. Ke klinicky významným patří především širokospektré beta-laktamázy AmpA (ESBL) a AmpC.

Detekce širokospektrých beta-laktamáz a správné určení bakteriální rezistence mohou být obtížné. Livermore a Yuan odhadují, že až 35 % ESBL-pozitivních kmenů je falešně interpretováno jako citlivé k širokospektrým beta-

laktamovým antibiotikům [29]. Rovněž bakteriální kmeny s produkcí AmpC enzymů mohou vykazovat falešnou citlivost a následkem může být neadekvátní antibiotická léčba, vedoucí až ke smrti pacienta. Je tedy zřejmé, že se nejedná pouze o teoretickou mikrobiologickou záležitost, ale o problém týkající se celé medicíny.

Správná detekce širokospektrých beta-laktamáz je důležitým úkolem mikrobiologických laboratoří. Je nutné zdůraznit, že klasické metody stanovení rezistence (disková difúzní metoda, diluční mikrometoda) mohou v případě bakterií s produkcí uvedených enzymů selhat a výsledkem je falešná citlivost. V rutinním mikrobiologickém provozu není možné používat metody založené na průkazu kódujících genů a jako vhodnější se jeví metody fenotypové. K těmto metodám patří modifikovaný DDST a AmpC disk test.

Z výsledků experimentální části předložené bakalářské práce vyplývá, že u 37 % testovaných kmenů *Klebsiella pneumoniae* byla prokázána MIC v rozmezí 2 - 8 mg/l alespoň pro jeden z testovaných cefalosporinů III. generace. Produkce AmpA enzymů (ESBL) byla potvrzena u 16 kmenů a přítomnost transferabilních AmpC enzymů u 7 kmenů. Tento výsledek znamená, že u 62 % izolátů se jednalo o falešnou citlivost a kmen ve skutečnosti produkoval AmpA nebo AmpC širokospektrou beta-laktamázu. Produkce AmpA a AmpC enzymů byla verifikována genetickým průkazem příslušných genů (zatím nepublikované údaje získané v rámci řešení grantových projektů na Ústavu mikrobiologie LF UP v Olomouci a poskytnuté prof. MUDr. M. Kolářem, Ph.D) a lze tedy doložit vysokou specifitu použitých metodik, včetně kritérií výběru adekvátního testu založených na výsledcích diluční mikrometody. Je tedy zřejmé, že na základě stanovení MIC definovaných antimikrobních přípravků (ampicilin/sulbaktamu, cefoxitinu, cefoperazonu, cefotaximu, ceftazidimu a cefoperazon/sulbaktamu) lze předpokládat možnou produkci širokospektrých beta-laktamáz AmpA nebo AmpC a jejich přítomnost následně prokázat jednoduchým fenotypovým testem. V případě pozitivního výsledku je pak nutné upravit výsledek „citlivý“ na „rezistentní“ u příslušných antibiotik v souladu s určeným typem beta-laktamázy.

7. Závěr

Včasná detekce širokospektrých beta-laktamáz a jejich správná klinická interpretace jsou důležitými úkoly mikrobiologických laboratoří, jejichž role je v tomto případě zcela nezastupitelná. Je vhodné opětovně zdůraznit, že léčba širokospektrými peniciliny a cefalosporiny může v případě infekcí, vyvolaných bakteriemi s produkcí těchto enzymů, selhat a následkem může být i smrt pacienta. Z tohoto pohledu má postup směřující k získání adekvátních informací o event. produkci beta-laktamáz a jejich typu důležité místo v mikrobiologickém vyšetření. Dalším úhlem pohledu je prevence šíření rezistence. Na základě informací o výskytu bakteriálních kmenů produkujících širokospektré beta-laktamázy je možné doporučit praktická opatření v rámci racionální aplikace antimikrobních přípravků a antibiotické politiky. Včasné snížení selekčního tlaku příslušných antibiotik, spolu s hygienicko-režimovými opatřeními na příslušných odděleních, mohou přispět k omezení šíření tohoto typu bakteriální rezistence.

Výsledky prokazují použitelnost navrženého přístupu k detekci produkce širokospektrých beta-laktamáz AmpA a AmpC enzymů. Je nutné poukázat na možnost falešné citlivosti k cefalosporinům, která v předloženém souboru dosáhla 62 %. S tímto zjištěním souvisí nutnost minimálně fenotypového potvrzení, že testovaný kmen v případě MIC cefalosporinů III. generace vyšší jak 1 mg/l neprodukuje širokospektrou beta-laktamázu a v pozitivním případě pak opravit výsledek citlivý na rezistentní.

8. Literatura

1. Levy SB. The antibiotic paradox: How the misuse of antibiotics destroys their curative powers. 2nd ed. Cambridge, MA, Perseus Publishing, 2002.
2. Kolář M, Urbánek K, Látal T. Antibiotic selection pressure and development of bacterial resistance. Intern J Antimicrob Agents 2001;17:357-363.
3. Ballow CH, Schentag JJ. Trends in antibiotic utilization and bacterial resistance. Report of the national nosocomial resistance surveillance group. Diag Microbiol Dis 1992;15:37-42.
4. Medeiros AA. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. Clin Inf Dis 1997;24:19-45.
5. Kolář M, Urbánek K, Vágnerová I, Koukalová D. The influence of antibiotic use on the occurrence of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Pharm Therap 2006;31:67-72.
6. Urbánek K, Kolář M, Čekanová L. Utilisation of macrolides and the development of *Streptococcus pyogenes* resistance to erythromycin. Pharm World Science 2005;27:104-107.
7. Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. Science 1992;257:1064-1073.
8. Chang S, Sievert DM, Jeffrey MS, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. N Engl J Med 2003;348:1342-1347.
9. Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:275-280.
10. Kolář M, Látal T, Čermák P. Klinicko-mikrobiologické podklady racionální antibiotické léčby. Trios, 2002.
11. Livermore DM, Paterson DL. Pocket guide to extended spectrum β -lactamases in resistance. Spain: Current Medicine Group Ltd; 2006.
12. Medeiros AA. β -lactamases. Br Med Bull 1984;40:18-27.
13. Bradford PA. Extended-spectrum- β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001;14:933-951.

14. Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Phil Trans R Soc Lond Biol Sc* 1980;289:321-331.
15. Bush K, Jacoby G, Medeiros A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-1233.
16. Kolář M.: Klinický význam širokospektrých β -laktamáz a zkušenosti s jejich identifikací v mikrobiologické praxi. *Klin Mikrobiol Inf Lék* 2007;13:195-205.
17. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988;10:867-878.
18. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:657–686.
19. Pfaller MA, Jones RN, Marshall SA, et al. Inducible AmpC β -lactamase producing gram-negative bacilli from blood stream infections: frequency, antimicrobial susceptibility, and molecular epidemiology in a national surveillance program (SCOPE). *Diagn Microbiol Inf Dis* 1997;28:211-219.
20. Dunne WM, Hardin DJ. Use of several inducer and substrate antibiotic combinations in a disk approximation assay format to screen for AmpC induction in patient isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., and *Serratia* spp. *J Clin Microbiol* 2005;43:5945-5949.
21. Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S. Extended broad-spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* 1989;17:316-321.
22. Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. Novel plasmid-mediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and α -methoxy β -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:2200-2209.
23. Pai H, Kang CI, Byeon JH, et al. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3720-3728.

24. Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, et al. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 2005;43:2551-2558.
25. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement. M100-S17. CLSI;2007.
26. Urbášková P. Rezistence bakterií k antibiotikům - vybrané metody. Praha, Trios, 1998.
27. Kolář M. Vývoj bakteriální rezistence a nová antimikrobní léčiva. Inter Med Prax 2007;9:213-216.
28. Giamarellos-Bourboulis EJ, Papadimitriou E, Galanakis N, et al. Multidrug resistance to antimicrobials as a predominant factor influencing patient survival. Int J Antimicrob Agents 2006;27:476-481.
29. Livermore DM, Yuan M. Antibiotic resistance and production of extended-spectrum β -lactamases amongst *Klebsiella* sp. from intensive care units in Europe. J Antimicrob Chemother 1996;38:409-424.