

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. Lékařská fakulta

Ústav lékařské mikrobiologie

ATB REZISTENCE, JEJÍ VÝZNAM V SOUČASNÉ MEDICÍNĚ,
MOŽNOSTI PREVENCE

***KLEBSIELLA SP. PRODUKUJÍCÍ ESBL JAKO PŮVODCE
NOZOKOMIÁLNÍCH INFEKČÍ***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Iva Vaňková

2006/2007

Vedoucí práce: MUDr. Otakar Nyč

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem vyznačila prameny, z nichž jsem pro svou práci čerpala, způsobem ve vědecké práci obvyklým.“

V Praze dne 3.4.2007

Iva Vaňková

Kaňková Iva

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji MUDr. Otakaru Nyčovi za hodnotné rady a odborné vedení během mé práce.

10. Diskuze

Jedním z aktuálních problémů, kterému se dnes v medicíně věnuje velká pozornost je vzrůstající rezistence na antibiotika. Je nesporné, že nadměrná spotřeba antibiotik v komunitě i nemocnicích je hlavní příčinou tohoto stavu, protože antibiotika velmi účinně selektují nové rezistentní kmeny. Podle dosavadního vývoje lze bohužel předpokládat, že dříve nebo později budou bakterie rezistentní vůči všem doposud používaným antibiotikům. Zatím situace v České republice není tak vážná jako v některých jiných zemích, i když ji zdaleka nelze považovat za optimální a to hlavně v nemocnicích (viz výše uváděné výsledky EARSS). Především intenzivní medicína je oborem, kde rezistence k antibiotikům přináší mnoho těžkostí.

NI na jednotkách intenzivní péče a anesteziologicko resuscitačních odděleních patří k závažným, mnohdy život ohrožujícím infekčním komplikacím, které představují významný medicínský a současně ekonomický problém. Je do jisté míry paradoxem současné medicíny, že díky svým stále dokonalejším diagnostickým a léčebným postupům zachraňuje život pacientům, kteří by v minulosti ve většině případů pravděpodobně nepřežili, ať už se jedná o těžké úrazy, náročné operace, transplantace kostní dřeně a orgánů, těžké otravy apod., ale současně jsou tyto jedinci v sebelépe vybavené a špičkovou péčí zajištěné nemocnici vystaveni určitému riziku rozvoje závažné infekce, která je ohrožuje o to více, že díky základnímu onemocnění a léčbě mají často výrazně narušenou imunitu.

Klebsiely s produkcí ESBL patří, díky svým adaptačním mechanismům a řadě faktorů patogenity a virulence, k obávaným oportunním patogenům. Z prezentovaných výsledků vyplývá, že výskyt ESBL pozitivních kmenů mezi klinickými izoláty *K. pneumoniae* se liší právě v závislosti na jednotlivých odděleních. ESBL fenotyp byl detekován u 33% z celkového počtu 182 izolátů klebsiel zachycených na odděleních ARO a JIP. Na ostatních odděleních, kde byla izolovány z klinických vzorků *K. pneumoniae* bylo ESBL pozitivních kmenů 15,6%. Skutečnost, že pravděpodobnost šíření klebsiel ve zdravotnickém zařízení je vyšší dokazuje srovnání počtu pacientů přijatých z komunity a pacientů již hospitalizovaných.

Význam časnosti kolonizace pacienta nemocniční bakteriální mikroflórou dokumentuje i mnou prezentované sledování. V sledovaném souboru pacientů se v průběhu hospitalizace stačila kolonizovat více než třetina pacientů a 6 z nich (33 %) bylo následně postiženo klinicky významnou NI.

OBSAH

Seznam zkratk

| | |
|--|-----------|
| 1. Úvod | 9 |
| 2. Cíl práce | 10 |
| 3. Rezistence na antibiotika | 11 |
| 3.1. Problém rezistence | 11 |
| 3.2. Získání rezistence | 12 |
| 3.2.1. Chromozomální (mutačně-selekční) rezistence | 12 |
| 3.2.2. Přenosná rezistence | 13 |
| 3.2.2.1. Plazmidy | 13 |
| 3.3. Obecné mechanismy rezistence | 14 |
| 3.3.1. Snížení permeability buněčných obalů bakterie | 14 |
| 3.3.2. Zneškodnění antibiotika bakteriálními enzymy | 14 |
| 3.3.3. Aktivní vylučování antibiotika – eflux | 15 |
| 3.3.4. Změna zásahového místa | 15 |
| 3.3.5. Další změněné vlastnosti rezistentních mutant | 15 |
| 4. Beta-laktamová antibiotika | 15 |
| 4.1. Peniciliny | 16 |
| 4.2. Cefalosporiny | 16 |
| 4.3. Ostatní beta-laktamy | 17 |
| 4.3.1. Monobaktamy * | 17 |
| 4.3.2. Karbapenemy | 17 |
| 4.4. Inhibitory beta-laktamáz | 17 |
| 4.5. Mechanismus účinku beta-laktamů | 18 |
| 4.6. Rezistence na beta-laktamová antibiotika | 18 |
| 5. Rezistence zprostředkovaná beta-laktamázi | 18 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 5.1. | Charakteristika beta-laktamáz | 19 |
| 5.2. | Vznik a evoluce beta-laktamáz | 19 |
| 5.3. | Mechanismus účinku a struktura beta-laktamáz | 20 |
| 5.4. | Klasifikace beta-laktamáz | 20 |
| 6. | Beta-laktamázy s rozšířeným spektrem účinku (ESBL) | 21 |
| 6.1. | Evoluce ESBL | 22 |
| 6.2. | Klasifikace ESBL | 22 |
| 6.3. | Typy širokospektrých beta-laktamáz | 23 |
| 6.3.1. | TEM | 23 |
| 6.3.2. | SHV | 23 |
| 6.3.3. | CTX-M | 24 |
| 6.3.4. | OXA | 24 |
| 7. | Průkaz beta-laktamáz širokého spektra (ESBL) | 24 |
| 7.1. | Metody průkazu ESBL a fenotypu rezistence | 25 |
| 7.1.1. | Vyhledávání kmenů produkujících ESBL | 25 |
| 7.1.2. | Konfirmační metoda CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) | 25 |
| 7.1.3. | Metoda DDST (Double Disk Synergy Test) | 25 |
| 7.1.4. | Etest | 27 |
| 7.1.5. | Rychlá detekce ESBL | 27 |
| 7.1.6. | Detekce ESBL v přítomnosti AmpC | 28 |
| 7.2. | Interpretace výsledků | 28 |
| 7.3. | Sdělování výsledků | 29 |
| 7.4. | Molekulárně-biologické metody průkazu ESBL | 29 |
| 8. | <i>Klebsiella</i> sp. | 29 |
| 8.1. | Charakteristika | 29 |
| 8.2. | Patogeneze | 30 |
| 8.3. | Citlivost na antibiotika a léčba | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 8.3.1. Projekt surveillance antibiotické rezistence (EARSS) | 31 |
| 9. Sledování výskytu nozokomiálních infekcí vyvolaných gramnegativními multirezistentními původci (<i>Klebsiella</i> sp.) produkujícími ESBL na oddělení JIP a ARO ve FN Motol | 32 |
| 9.1. Úvod | 32 |
| 9.1.1. Cíl studie a hlavní sledované ukazatele | 32 |
| 9.1.2. Zdroje informací pro analýzu | 32 |
| 9.2. Materiál a metody | 33 |
| 9.2.1. Metodika sledování | 33 |
| 9.2.2. Odběr a transport biologického materiálu pro bakteriologické sledování | 33 |
| 9.2.3. Bakteriologické vyšetření | 34 |
| 9.2.4. Specifikace a antibiogram sledovaných species | 36 |
| 9.2.5. Průkaz produkce ESBL | 36 |
| 9.3. Výsledky a analýzy sledování | 37 |
| 9.3.1. Výsledky sledování výskytu NI na oddělení ARO FN v Motole vyvolaných kmeny <i>Klebsiella</i> sp. | 37 |
| 9.3.2. Prevalence ESBL-pozitivních kmenů na odděleních FN v Motole | 39 |
| 9.3.3. Analýza některých případů infekce | 40 |
| 10. Diskuze | 42 |
| 11. Závěr | 44 |
| 12. Seznam literatury | 45 |
| 13. Přílohy | 48 |

Seznam zkratk

| | |
|-----------------|--|
| AR | antibiotická rezistence |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standarts Institute |
| DDST | Double Disk Synergy Test (diskový difuzní test s inhibitorem beta-laktamázy) |
| EARSS | European Antimicrobial Resistance Surveillance System |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová |
| ESBL | extended spectrum beta-lactamases (širokospektré beta-laktamázy) |
| ETR | endotracheální aspirát |
| IZ | inhibiční zóna |
| LCR | ligase chain reaction |
| MIC | minimální inhibiční koncentrace |
| NCCLS | National Committee for Clinical and Laboratory Standards |
| NI | nozokomiální infekce |
| PBP | penicillin-binding proteins |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PCR-RFLP | restriction fragment lenght polymorfism |
| PCR-SSCP | single strand conformation polymorfism |
| SZÚ | Státní zdravotní ústav |
| WHO | World Health Organization (Světová zdravotnická organizace) |

1. Úvod

Antibiotikum se v dnešní době užívá jako společný název pro přírodní i chemické látky s antimikrobiálním účinkem, které se užívají pro léčbu infekčních nemocí. Mají schopnost inhibovat růst mikroorganismu nebo ho usmrtit. Obranným procesem bakterií je mikrobiální rezistence na tyto látky. Bylo zjištěno více mechanismů rezistence. Nejčastějším podkladem rezistence je inaktivace antibiotika vlivem bakteriálních enzymů. Typické jsou zejména beta-laktamázy, které jsou schopny hydrolyzovat beta-laktamová antibiotika. Velká skupina beta-laktamů je charakteristická beta-laktamovým kruhem ve své chemické struktuře, který beta-laktamázy atakují a způsobují hydrolyzu antibiotika. Po létech intenzivního podávání, se vyvinula u četných druhů multirezistence způsobená enzymy schopnými inaktivovat širší spektrum beta-laktamáz. Souhrnně se označují ESBL (extended spectrum beta-lactamases). Tento mechanismus rezistence byl poprvé zjištěn v roce 1983.

V posledních dvou desetiletích vzrůstá počet producentů širokospektré beta-laktamázy, zejména u druhů *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* a *E. coli*. Tyto kmeny jsou schopné inaktivovat beta-laktamová antibiotika (peniciliny, cefalosporiny a monobaktamy) s výjimkou karbapenemů, a jsou často rezistentní k antibiotikům z dalších skupin. Geny kódující ESBL jsou lokalizovány na plazmidech a proto dochází k snadnému horizontálnímu přenosu v rámci druhu i mezidruhově.

Vzrůstající počet bakteriálních kmenů s nebezpečnými fenotypy rezistence je jedním z problémů současné medicíny. K tomuto vývoji dochází i na odděleních ARO a JIP, kde nozokomiální infekce vyvolané multirezistentními bakteriemi představují velmi vážné ohrožení pro pacienty. Omezují se dříve úspěšné možnosti léčby infekcí způsobených těmito kmeny a je potřeba neustále měnit terapeutické postupy, zvyšují se náklady na léčbu v důsledku podávání antibiotik a prodloužené hospitalizace.

Jako prevence se doporučuje sledovat aktuální výskyt bakteriálních kmenů s definovanými fenotypy rezistence, které mají význam z hlediska vysokého rizika závažné infekční komplikace pro primárně nemocné a také předcházení vzniku a šíření nozokomiálních infekcí, jako například ESBL-pozitivních kmenů *K. pneumoniae*.

2. Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce bylo zaměřit se na problematiku antimikrobní rezistence v nemocnici. Jelikož je toto téma nesmírně rozsáhlé a nelze komplexně obsáhnout, zvolila jsem dílčí problém. Na příkladu bakteriálního druhu *Klebsiella* sp. ukazují narůstající hrozbu současné antibiotické léčby, výskyt a šíření širokospektrých beta-laktamáz (ESBL). Rozšíření těchto enzymů, jejichž jsou klebsiely nejčastějšími producenty, přináší zejména u kritických pacientů (JIP, ARO) vysoké riziko závažných nozokomiálních infekcí s omezenou možností účinné antimikrobní léčby. Zrekapitulovat možnosti současné fenotypové diagnostiky ESBL a zmapovat jejich výskyt na odděleních s intenzivní péčí považuji za hlavní cíl a náplň mé práce.

3.2. Získaná rezistence

Geny rezistence získávají bakterie vertikálně (dědí je) nebo horizontálně (od bakterií stejného, ale i jiného druhu v příslušném ekosystému), mimoto rezistence vzniká na podkladě spontánních genetických mutací.⁵ Bakterie mohou získat rezistenci na jednotlivá antibiotika nebo být multirezistentní (rezistence na 3 a více skupin antibiotik).

Rezistentní bakterie mají selektivní výhodu nad bakteriemi citlivými na antibiotika a proto mohou ve velmi krátké době v dané populaci zcela převládnout, zejména pod selekčním tlakem antibiotik. Čím narůstá jejich počet, tím je snadnější šíření rezistence z bakterie na bakterii, z člověka na člověka a v rámci nemocničního prostředí i komunity.⁶

3.2.1. Chromozomální (mutačně-selekční) rezistence

Nové geny rezistence vznikají spontánními mutacemi, jenž jsou velmi častými ději. Můžeme ji definovat jako náhlou dědičnou změnu, která vytváří nový genotyp. Může jít o bodové mutace, které cílovou strukturu mění do té míry, že nemůže antibiotikum vázat, ačkoli všechny funkce nutné k trvalému přežití jsou stále zachovány, odstranění části genu (deleci), jeho náhradu (substituci), anebo přidání (adici) jednoho či několika párů bazí v deoxyribonukleové kyselině, čímž vznikne jiný bílkovinný produkt, který má omezenou schopnost vázat antibiotikum. Stupeň rezistence závisí na biologických důsledcích chromozomové mutace.

Vzniklá rezistence má trvalý charakter, tj. přenáší se na další dceřinné buňky, zejména tehdy, jak je výše uvedeno, přináší-li nově nabytá vlastnost (rezistence) nějakou výhodu ve smyslu adaptace a přežívání v prostředí.¹ Například mutace genů pro syntézu beta-laktamázy u gramnegativních bakterií může mít za následek vysokou produkci těchto enzymů a v důsledku toho rezistenci k cefalosporinům, které jsou normálně k beta-laktamázám odolné.⁷

3.2.2. Přenosná rezistence

Přenosná neboli extrachromozomální rezistence spočívá v převzetí genetického materiálu od rezistentních bakteriálních buněk. Přenos DNA se mezi bakteriemi přenáší trojím způsobem: transdukcí (přenos zprostředkovaný bakteriofágy), konjugací (zprostředkovávána plazmidy) a transformací.³ Závažným zdravotnickým problémem

z hlediska přenosné rezistence jsou zejména mikroorganismy z čeledi enterobakterií, nefermentujících gramnegativních tyčků a *Staphylococcus aureus*.¹

3.2.2.1. Plazmidy

Plazmidy, tvořené do kruhu uzavřenou DNA, představují přídavnou, nikoli nepostradatelnou genetickou informaci bakterie. Dovedou se samostatně replikovat a segregovat do dceřinných buněk. Funkce, které kódují nejsou obecně životně nepostradatelné, ale ve zvláštních podmínkách prostředí mohou svého nositele zvýhodňovat nebo zachránit před zahynutím.³ Přenos plazmidů konjugací má ze všech tří způsobů přenosu genů pro rezistenci největší význam. Plazmidy, které determinují rezistenci k jednomu nebo k více antibiotikům (R-plazmidy), se v populaci mohou rychle šířit konjugací.

R-plazmidy byly prvně objeveny v Japonsku v roce 1959, kdy se ukázalo, že rezistence k několika antibiotikům se přenáší konjugací mezi kmeny shigel a *E. coli*. Vzápětí se ukázalo, že se R-plazmidy běžně vyskytují ve všech částech světa. Uzpůsobení R-plazmidů *in vivo* se v jednotlivých případech liší, je však jisté, že prosté faktory přenosu mohou získat geny rezistence a rekombinovat s nepřenosnými plazmidy rezistence. Tak mohou vzniknout R-plazmidy nesoucí rezistenci až k osmi antibiotikům. Evoluci plazmidů akcelerují genetické elementy zvané transpozony, což jsou lineární úseky DNA, často obsahující geny pro rezistenci, migrující mezi nepřibuznými plazmidy a chromozomem nezávisle na normálních rekombinacích.⁷

Rozdíl, zda rezistence vzniká chromozomálními determinantami, které vznikly spontánními mutacemi, nebo plazmidy je významný.

Plazmidy nesoucí rezistenci se na rozdíl chromozomů šíří explozivně. Již malý počet buněk majících R-plazmid (plazmid nesoucí geny rezistence) dokáže změnit celé populace bakterií.

Chromozomální rezistence se obvykle omezuje pouze na jedno antibiotikum nebo jednu skupinu charakterizovanou shodnou molekulární strukturou, zatímco přenosná rezistence je mnohdy charakterizována multirezistencí.

Jev přenosné rezistence způsobil vytvoření rezervoáru multirezistentních oportunních nebo i saprofytických kmenů nacházejících se v organismu nebo mimo něj. Zvláště značný

výskyt těchto kmenů nacházíme v nemocnicích, kde vyvolávají velmi závažné nozokomiální infekce.¹

3.3. Obecné mechanismy rezistence

Získaná antimikrobiální rezistence má svůj původ v biochemických procesech, které jsou kódovány bakteriálními geny. Lze je rozdělit zhruba do čtyř typů.⁸

3.3.1. Snížení permeability buněčné stěny

Průchod živin a produktů látkové výměny umožňuje vnější buněčná stěna a vnitřní plazmatická membrána, které fungují také jako bariéra proti látkám, které buňce škodí. Rozdíly ve složení membrány mezi grampozitivními a gramnegativními bakteriemi jsou odpovědné za rozdíly v přirozené rezistenci vůči antibiotikům.⁹ Změna průchodnosti přes obal bakteriální buňky způsobí, že do ní antibiotikum nemůže proniknout a tudíž ji zničit. Změna povrchu může vést také k tomu, že antibiotikum nemůže buňku nalézt. Zhoršený průnik antibiotika do buňky byl popsán např. u aminoglykosidů, tetracyklinu nebo chinolonů.¹⁰

3.3.2. Zneškodnění antibiotika bakteriálními enzymy

Rezistentní kmeny produkují enzymy, které buď štěpí nebo substituují molekuly antibiotika a činí je neúčinnými.

Enzymy rozkládající antibiotika (peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy) jsou například beta-laktamázy, které se naváží na antibiotika vazebnými místy obsahujícími aminokyselinu serin a tím způsobí hydrolyzu beta-laktamového kruhu. Ten se již neváže na své zásahové místo, a proto nemá žádnou antimikrobní aktivitu.¹

Další specifické enzymy například modifikují aminoskupiny nebo hydroxylové skupiny antibiotika. Příkladem bakteriálních enzymů, které způsobují rozklad antibiotika jsou acetyltransferáza chloramphenikolu nebo fosfotransferázy, adenyltransferázy a acetyltransferázy aminoglykosidů a další vysoce specializované enzymy.²

3.3.3. Aktivní vylučování antibiotika - eflux

Rezistentní mikrob dokáže určitý antibiotický prostředek aktivně „vypumpovat“ ven z buňky ještě dříve, než dosáhne intracelulárně uloženého cílového místa. Rychlá exkrece antibiotika je spojena s produkcí membránových bílkovin.⁹

3.3.4. Modifikace cílových molekul pro antibiotika

Většina antibiotik působí na metabolické pochody tím, že se váží na proteiny bakteriální buňky. V těchto případech zcela postačí změny v lokusu nukleinové kyseliny, na kterém dochází k vazbě antibiotika. Receptorové místo je tudíž pozměněné, což má za následek rezistenci k příslušnému antibiotickému preparátu.¹

Změna cílové molekuly na antibiotika je známa u rezistence na makrolidy nebo linkosamidy, ale i beta-laktamy.¹⁰ Příkladem jsou bílkoviny buněčných obalů vazebné pro penicilin, tzv. penicillin-binding proteins (PBP), které jsou zásahovými místy pro beta-laktamová antibiotika. PBP jsou vlastně enzymy, které se účastní biosyntézy bakteriální buněčné stěny a buněčného růstu. Navázaná antibiotika zbavují u citlivých bakterií tyto bílkoviny aktivity, čímž zabraňují jejich funkci.⁹

3.3.5. Další změněné vlastnosti rezistentních mutant

Mikrobiální perzistence

Perzistence je fenomén patřící do adaptivních jevů. Znamená výskyt genotypicky sice citlivých, ale fenotypicky rezistentních bakterií v celkově citlivé bakteriální populaci.¹ Mikrob přežívá *in vivo* pod vlivem antibiotika, na něž je *in vitro* citlivý.¹⁰ Předpokládá se, že bakteriální buňky přežívají buď ve stavu nevnímavém k antibiotiku (L-varianty) nebo jsou lokalizovány v buňkách makroorganismu a těmito vlastně chráněny před jeho vlivem. Ke klinickému relapsu pak dojde za několik dnů, týdnů, měsíců či dokonce roků, když se buňky vrátí do svého původního morfologického či fyziologického stavu nebo když se uvolní z tkání.¹

4. Beta-laktamová antibiotika

Antibakteriální antibiotika se rozdělují do skupin podle chemické struktury, které odpovídá řada společných vlastností, jako je mechanismus účinku i rezistence, spektrum nebo nežádoucí účinky.¹⁰ Velkou skupinu tvoří beta-laktamy, inhibitory syntézy bakteriální stěny, jimž je společná struktura - beta-laktamový kruh v molekule.³ Beta-laktamový kruh je čtyřčlenná struktura skládající se ze tří atomů uhlíku a jednoho atomu dusíku. Různé typy beta-laktamů se liší složením dalšího kruhu připojeného na cyklus beta-laktamový.

Beta-laktamy se dělí na peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy.¹⁰

4.1. Peniciliny

Získávají se z kultury plísně *Penicillium chrysogenum* a dalších, které produkují kyselinu 6-aminopenicilanovou. V její molekule je beta-laktamový kruh konjugován s pětičlenným kruhem thiazolidinovým (pětičlenný kruh s atomem síry).¹⁰ Typickým přirozeným antibiotikem je penicilin G, jehož antimikrobiální působení je však dosti úzké. Po zjištění jeho chemického složení se podařilo chemickou cestou, navazováním různých chemických radikálů na kyselinu penicilanovou, sestavit množství nových látek tzv. semisyntetických penicilinů,¹¹ které se liší šířkou antibakteriálního spektra a stabilitou vůči nízkému pH a vůči beta-laktamázám. Na základě těchto odlišností je můžeme členit do několika skupin: přirozené peniciliny (penicilin G, penicilin V), peniciliny rezistentní k beta-laktamázám (meticilin, oxacilin), aminopeniciliny (ampicilin, amoxicilin) a peniciliny protipseudomonadové (karboxypeniciliny, ureidopeniciliny).¹⁰

4.2. Cefalosporiny

Cefalosporiny jsou blízce příbuzné penicilinům.⁷ Základem je kyselina 7-aminocefalosporanová, poprvé izolovaná z plísně rodu *Cephalosporium*.¹⁰ V její molekule je na beta-laktamový kruh připojen šestičlenný dihydrothiazinový cyklus, na nějž jsou u různých cefalosporinů napojeňy postranní řetězce, jež udělují molekule specifické farmakologické vlastnosti nebo modifikují spektrum účinnosti. Počítají se k nim i cefamyciny (cefalosporiny 2. generace), které místo atomu uhlíku v šestičlenném kruhu obsahují atom kyslíku.³

Cefalosporiny mají zřetelnou výhodu svou odolností k penicilináze, mají širší spektrum účinnosti.⁷ Podle spektra účinnosti, citlivosti vůči beta-laktamázám a podle

průniku buněčnou stěnou se rozdělují do čtyř generací. Co se týká spektra, od první do čtvrté generace stoupá účinnost na gramnegativní bakterie. Cefalosporiny 3. generace jsou více stabilní k beta-laktamáze, působí na všechny kmeny enterobakterií a částečně i na kmeny rezistentní k penicilinům a cefalosporinům 1. a 2. generace.¹⁰

4.3. Ostatní beta-laktamy

Tyto látky mají shodnou strukturu – beta-laktamový kruh – s peniciliny a cefalosporiny.

4.3.1. Monobaktamy

Prakticky jediný z této skupiny je aztreonam, monocyklický beta-laktam (monobaktam). Není hydrolyzován základními beta-laktamázami a neindukuje jejich produkci.^{1,3}

4.3.2. Karbapenemy

Mají ve svém jádru nahrazenou síru skupinou $-\text{CH}_2-$. Karbapenemy, imipenem a meropenem, mají díky stabilitě vůči beta-laktamázám velmi široké spektrum účinnosti. Jejich vynikající antimikrobní vlastnosti, ale také možný rychlý nárůst rezistence řadí tyto léky mezi preparáty rezervní.¹

4.4. Inhibitory beta-laktamáz

Rozšiřující se poznatky o účincích beta-laktamáz a narůstající rezistence k beta-laktamům vedly k úsilí zvýšit stabilitu antibiotika úpravou jeho struktury. Jednu z možností nabízí kombinace beta-laktamového antibiotika s inhibitory – sloučeninami, které na sebe mohou vázat některé typy beta-laktamáz a tím chránit vlastní molekulu antibiotika před hydrolyzou a to může nerušeně působit.^{10, 13} Inhibitory beta-laktamáz jsou chemickou strukturou beta-laktamy (obsahují beta-laktamový kruh), ale vykazují jen zanedbatelnou hydrolytickou aktivitu.³

Prvním, dodnes široce užívaným inhibitorem beta-laktamáz, je kyselina klavulanová, dále následoval sulbaktam a tazobaktam – zatím nejúčinnější inhibitor zavedený do praxe.

Ideální inhibitor beta-laktamáz by měl velmi rychle proniknout do bakteriální buňky, vykazovat co nejvyšší afinitu k co nejširšímu spektru beta-laktamáz a inaktivovat enzym ireverzibilně. Kapacita inhibitoru je limitována a v případě nadprodukce i původně citlivé beta-laktamázy může dojít k selhání účinku.¹³

4.5. Mechanismus účinku beta-laktamů

Základní součástí buněčné stěny bakterií je vrstva peptidoglykanu (murein, mukopeptid), který se skládá z vrstev polysacharidových řetězců pospojovaných napříč krátkými peptidy. Peptidoglykan obsahuje střídavě dva cukry, kyselinu N-acetylmuramovou a N-acetylglukosamin. Vlastní struktura stěny se podstatně liší u bakterií grampozitivních a gramnegativních.¹⁰ U grampozitivních bakterií je stěna relativně jednodušší; její hlavní vrstvou je peptidoglykan, který je u četných druhů navíc obklopen vrstvou teichoové kyseliny, u některých druhů též vrstvou polysacharidů. U gramnegativních bakterií je buněčná stěna komplexnější a sestává se z vrstvy mureinu, který je obklopen vrstvami lipoproteinů a polysacharidů.¹

V bakteriální buňce se beta-laktamy vážou na enzymy transpeptidázy a karboxypeptidázy účastníci se tvorby peptidoglykanu, základní složky buněčné stěny. Tyto enzymy katalyzují tvorbu peptidových a glycinových můstků spojujících řetězce střídajících se molekul N-acetylglukosaminu a kyseliny N-acetylmuramové. Označují se též PBP. Vazba beta-laktamu na PBP zastaví rostoucí bakterii tvorbu peptidoglykanové vrstvy a naopak podnítlí uvolnění autolytických enzymů, které rozvolní již hotovou stěnu.¹⁰

4.6. Rezistence na beta-laktamová antibiotika

Rezistence vzniká trojím způsobem. Gramnegativní bakterie získají schopnost blokovat průnik beta-laktamů skrze póry zevní membrány. U pneumokoků vznikají pozměněné PBP, které si zachovávají svoji enzymatickou schopnost, ale přestávají mají sníženou vazebnou schopnost k penicilinu. Nejčastější příčinou vzniku rezistence na beta-laktamy je, že bakterie získají schopnost tvorby beta-laktamáz.¹⁰

5. Rezistence zprostředkovaná beta-laktamázami

5.1. Charakteristika beta-laktamáz

Beta-laktamázy patří k nejvíce prostudovaným enzymům, které dokáží inaktivovat antibiotikum. Jsou skupinou enzymů s určitými podobnostmi ve struktuře.⁸ Jsou produkovány jak grampozitivními, tak i gramnegativními mikroorganismy. Grampozitivní koky uvolňují tento enzym do prostředí; u gramnegativních bakterií se nachází uvnitř buňky a jeho průkaz se proto snáz zjistí po porušení buněčné stěny.¹ Geny, které je determinují, jsou umístěny na chromozomu, ale i na plazmidech, díky nimž se v populaci bakterií enormně zvýšil jejich výskyt.³

Beta-laktamázy mohou být produkovány konstitutivně či induktivně. Při konstitutivní produkci vytváří bakterie tyto enzymy nezávisle na přítomnosti či nepřítomnosti antibiotika uvnitř nebo vně buňky. Induktivní beta-laktamázy jsou produkovány pouze v případě, že v okolí nebo uvnitř bakteriální buňky je přítomno beta-laktamové antibiotikum.¹²

5.2. Vznik a evoluce beta-laktamáz

První enzym tohoto typu byl popsán v roce 1940 E. Abrahamem, který zjistil, že necitlivost některých bakteriálních species na penicilin spočívá v jejich produkci penicilinázy.¹³ V následujících letech se pod tlakem intenzivního používání ATB objevilo velké množství podobných kultur produkujících enzym, který inhibuje penicilin. Do roku 1975 bylo více než 80% typů *Staphylococcus aureus* rezistentních vůči penicilinu a tento trend pokračoval zhruba až do celkových 90%. Se začátkem používání beta-laktamových derivátů, penicilinů a cefalosporinů, se objevilo také množství mikroorganismů schopných produkovat několik typů beta-laktamáz a tím hydrolyzovat nové sloučeniny.¹⁴ Nyní je známo asi 200 různých typů beta-laktamáz s různým spektrem a intenzitou účinku.

Z historického pohledu je důležitý rok 1965, kdy byly objeveny širokospektré beta-laktamázy (TEM-1 popsána u *E. coli*) vázané na plazmidech, v současné době nejrozšířenější enzymy vůbec. V roce 1980 byly poprvé popsány u některých enterobakterií mutanty s trvalou nadprodukcí chromozomálních beta-laktamáz, které kromě penicilinů inaktivují i první, druhou a třetí generaci cefalosporinů. Další neméně závažný mechanismus rezistence k penicilinům, cefalosporinům a monobaktamům byl zjištěn v roce 1983 – jsou jím tzv. beta-laktamázy s rozšířeným spektrem účinku (ESBL), šířící se velmi rychle především mezi klebsiely a *E. coli*.¹³

Mnoho gramnegativních bakterií má přirozeně chromozomálně kódované beta-laktamázy.¹⁵ Některé z těchto genů produkují tento enzym kontinuálně (*Branhamella* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacteroides* sp.), jiné ho produkují až po indukci některým ze sloučenin cefalosporinů (*Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Serratia marcescens*, *Pseudomonas* sp., *Providencia* sp.).¹⁴

5.3. Mechanismus účinku a struktura beta-laktamáz

Účinek beta-laktamáz spočívá v interakci s beta-laktamovým antibiotikem a jeho následné hydrolyze. Beta-laktamázy atakují amidovou vazbu v beta-laktamovém kruhu. Rychlost i efektivnost připojení beta-laktamázy k danému antibiotiku a rychlost hydrolyzy vzniklého komplexu závisí na afinitě beta-laktamázy k antibiotiku a účinnosti následné hydrolyzy.⁸ Tyto bakteriální enzymy mohou uplatnit svoji katalytickou účinnost dvojitým způsobem:

- pomocí reaktivního serinového zbytku v aktivním místě (třída A, C, D podle Amblera)
- účinkem těžkých kovů, nejčastěji Zn^{2+} , spolu s zbytky histidinu a (nebo) cysteinu (třída B) (16) Do skupiny beta-laktamáz s reaktivním serinovým zbytkem patří většina známých beta-laktamáz.

Jednotlivé beta-laktamázy jsou schopny hydrolyzy různé skupiny beta-laktamových antibiotik, některé i dokonce širší skupinu těchto látek. Na základě substrátové specifity rozlišujeme penicilinázy, které hydrolyzují peniciliny, cefalosporinázy hydrolyzující cefalosporiny různých generací, karbapenemázy, jejichž substrátem je karbapenem a v neposlední řadě také monobaktamázy hydrolyzující monobaktam. V posledních desetiletích se začínají stále častěji objevovat kmeny, které produkují širokospektré beta-laktamázy. Jsou však izolovány i bakteriální kmeny s produkcí beta-laktamáz rezistentních k účinku inhibitorů beta-laktamáz.¹⁷

5.4. Klasifikace beta-laktamáz

Podle různých výzkumů, byla předkládána i různá klasifikační schémata beta-laktamáz. Klasifikace navržená Sawaiem a spol. v roce 1968 byla založena na reakci k antiséru. Klasifikace dle Richmonda a Sykese z roku 1973 rozdělovala beta-laktamázy

dle substrátového profilu. Schéma bylo roku 1976 rozšířeno Sykesem a Mathewem a kladlo důraz na plazmidem kódované beta-laktamázy. Autoři popsali i dělení podle izoelektrického bodu. Mitsuhashi a Inoue navrhli v roce 1981 schéma, které klasifikaci skupiny penicilináz a cefalosporináz rozšířilo o novou kategorii beta-laktamáz hydrolyzující cefuroxim.¹⁸

Klasifikace beta-laktamáz v současné době vychází ze dvou základních hledisek. První, které bylo navrženo v roce 1989 Bushovou a znovu upraveno v roce 1995 a publikováno jako Bush-Jacoby-Madeirosovo, rozděluje beta-laktamázy do čtyř základních skupin (1-4) a jedenácti podskupin podle fenotypických vlastností, a to především na základě spektra a stupně hydrolytické aktivity ke standardní řadě antibiotik a citlivosti k různým inhibitorům (EDTA, kys. klavulanová). Druhá koncepce, podporovaná např. Livermorem, rozvíjí strategii navrženou původně Amblerem v 80. letech, který na podkladě molekulární struktury rozčleňuje beta-laktamázy do čtyř evolučně odlišných tříd (A-D).^{13,19}

PŘÍLOHA A – Klasifikace beta-laktamáz

6. Beta-laktamázy s rozšířeným spektrem účinku (ESBL)

ESBL (extended spectrum beta-lactamases) jsou bakteriální enzymy přenosné na plazmidech schopné hydrolyzovat a inaktivovat širokou paletu beta-laktamů, zahrnující třetí generaci cefalosporinů, peniciliny a aztreonam. Enzymy širokospektrých beta-laktamáz vznikly důsledkem mutací enzymů dosud známých beta-laktamáz TEM-1 a TEM-2 a SHV-1. Všechny jsou obvykle nacházeny u čeledi *Enterobacteriaceae*. Přirozeně udělují enzymy TEM-1, TEM-2 a SHV-1 vysokou rezistenci k dřívějším penicilinům a nižší rezistenci k první generaci cefalosporinů. Velké rozšíření užívání třetí generace cefalosporinů a aztreonamu bylo hlavní příčinou mutací těchto enzymů, které vedlo ke vzniku beta-laktamáz s rozšířeným spektrem. Tyto enzymy udělují rezistenci k cefotaximu, ceftazidimu a dalším širokospektrým cefalosporinům a k monobaktamům jako aztreonamu, ale nejsou aktivní vůči cefamycinu a imipenemu. Enzymy byly nazvány ESBL díky svému značně rozšířenému rozsahu substrátu. Mutace se šíří v aktivním místě, což způsobuje odchylku v oxyimino skupině a umožňuje útok na beta-laktamový kruh. Takové mutované enzymy – nyní je známo asi 200 druhů – napadají všechny oxyiminocefalosporiny, ale ne α -methoxy-cefalosporiny (cefamyciny) nebo karbapenemy. Mimo to, organismy

produkcující ESBL projevují korezistenci k mnoha dalším třídám antibiotik, které se projevují v omezené volbě terapeutik. Svědčí o tom několik rizikových faktorů.

Hlavními rizikovými faktory pro kolonizaci a infekci způsobenou organismy produkujícími ESBL je dlouhodobá léčba antibiotiky, déle trvající hospitalizace na jednotkách intenzivní péče, pobyt v léčebnách, závažná onemocnění, pobyt v ústavech s hojným užíváním ceftazidimu a jiných cefalosporinů třetí generace a používání nástrojů, cévkování.¹⁸

6.1. Evoluce ESBL

První izolovaný kmen produkující ESBL byl objeven v Německu v průběhu osmdesátých let.¹⁸ Byl to enzym SHV-2 objeven u kmene *K. ozanae*, schopný hydrolyzovat nové beta-laktamy.¹⁵ Následně se ESBL objevily i ve Spojených státech. Rezistence organismů je nyní celosvětovým problémem. Hlavními kmeny produkujícími ESBL jsou kmeny z čeledi *Enterobacteriaceae* – *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* a *E. coli*. Dalšími organismy, které vykazují produkci širokospektrých beta-laktamáz, avšak již s nižší frekvencí, jsou druhy *Enterobacter* sp., *Salmonella* sp., *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* a *Pseudomonas aeruginosa*.¹⁸

Historie ESBL²⁰

1983 – první popis v Evropě

1988 – zprávy o šíření v USA

1990 – zvyšující se prevalence globálně

- JIP

- akutní péče

- LDN

2000 – problém nozokomiálních patogenů

6.2. Klasifikace

Většina ESBL obsahuje serin v aktivní místě a náleží tak do třídy A dle Amblerova schématu. Třída A zahrnuje enzymy TEM-1, SHV-1 a penicilinázu produkovanou *S. aureus*. Molekulární klasifikační schéma se stále užívá k charakterizování beta-laktamáz; avšak dostatečně nerozliší mnohé odlišné typy enzymů třídy A. Klasifikační schéma

Richmonda a Sykese bylo založeno na profilu substrátu a umístění genu kódujícího beta-laktamázu. Toto klasifikační schéma bylo utvořeno ještě před objevením ESBL a neposkytovalo rozlišení mezi původními TEM a SHV enzymy a jejich ESBL deriváty. Téměř nedávno bylo vypracováno klasifikační schéma Bushovou, Jacobym a Medeirosem, které kromě molekulární struktury a nukleotidové sekvence genů využívá biochemické vlastnosti enzymu k zařazení beta-laktamáz do funkčních skupin. Použitím tohoto schématu jsou ESBL definovány jako beta-laktamy schopné hydrolyzy oxyimino-cefalosporinů, které inhibuje kyselina klavulanová, a řadí se do funkční skupiny 2be.¹⁵

6.3. Typy širokospektrých beta-laktamáz

Nejvíce ESBL je odvozeno od TEM nebo SHV enzymů. V současnosti je více než 90 beta-laktamáz typu TEM a více než 25 SHV beta-laktamáz. V obou skupinách enzymů stačí několik bodových mutací ke vzniku nového ESBL fenotypu. Beta-laktamázy OXA a CTX-M rodin jsou obvykle zástupci inhibitor rezistentních beta-laktamáz, ale přesto existují mnohé enzymové varianty s ESBL fenotypovým projevem.

TEM a SHV beta-laktamázy jsou nejčastěji nacházeny u kmenů *E. coli* a *K. pneumoniae*; avšak jsou objevovány i u kmenů *Proteus* sp., *Providencia* sp., a dalších druhů čeledi *Enterobacteriaceae*.¹⁵

6.3.1. TEM

TEM-1 je nejčastěji se vyskytující beta-laktamáza u gramnegativních bakterií. Byla detekována u více než 90 % kmenů *E. coli* rezistentních k ampicilinu. Enzymy TEM-1 jsou schopné hydrolyzovat peniciliny a dřívější generace cefalosporinů. TEM-2, první derivát odvozený od TEM-1, se liší pouze substitucí jedné aminokyseliny. Prvním enzymem typu TEM-, který ukázal fenotyp ESBL byl TEM-3, poprvé hlášen v roce 1989. V následujícím roce po prvním hlášení bylo popsáno dalších 90 derivátů. Některé z těchto beta-laktamáz jsou inhibitor-rezistentní enzymy, ale většina z nových derivátů jsou ESBL.¹⁵

6.3.2. SHV

Beta-laktamáza SHV-1 je nejčastěji produkována kmenem *K. pneumoniae* a je zodpovědná za plazmidicky přenosnou rezistenci k ampicilinu až u 20% těchto kmenů. Na

rozdíl od beta-laktamáz typu TEM- existuje poměrně hodně derivátů SHV-1:SHV-2, SHV-3, SHV-4, SHV-5 označovaná jako CAZ-5 respektive CAZ-4. Doposud má většina derivátů odvozených od SHV- fenotyp ESBL. SHV enzymy podobně jako TEM-3 a TEM-4 mají vyšší afinitu k cefotaximu než k ceftazidimu.^{3, 15}

6.3.3. CTX

V 90. letech 20. století byl objeven nový typ beta-laktamáz s rozšířeným spektrem, na plasmidech kódovaný CTX-M, který přednostně hydrolyzoval cefotaxim.¹⁵

6.3.4. OXA

Dalším typem pocházejícím z rodiny beta-laktamáz je enzym OXA. Tyto beta-laktamázy se na rozdíl od TEM a SHV řadí do molekulární třídy D a funkční skupiny 2d. Enzym typu OXA uděluje beta-laktamáze rezistenci k ampicilinu a cefalotinu a je charakteristický hydrolytickou aktivitou k oxacilinu a cloxacilinu. Jsou slabě inhibovány kyselinou klavulanovou. Zatímco je většina beta-laktamáz produkována druhy *E. coli* a *K. pneumoniae*, širokospektré beta-laktamázy typu OXA produkují zejména druhy *P. aeruginosa*.¹⁵

7. Průkaz beta-laktamáz širokého spektra (ESBL)

Důležitost spolehlivé detekce organismů produkujících ESBL vede CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute; dříve NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards) ke stálému vyvíjení nových metod skriningových a konfirmačních testů a pravidel hlášení výsledků citlivosti testů k různým fenotypům rezistence.²¹

Především stále rostoucí šíření producentů ESBL z bakteriální čeledi *Enterobacteriaceae* nutí vyvíjet přesnější metody k průkazu těchto enzymů v klinických izolátech. Testy využívané v klinické mikrobiologii využívají inhibitory beta-laktamáz, obvykle klavulanát, v kombinaci s oxyimino-cefalosporiny jako jsou ceftazidim a cefotaxim. Kyselina klavulanová v těchto testech inhibuje ESBL a tak snižuje stupeň rezistence k cefalosporinům.¹⁵

7.1. Metody průkazu ESBL a fenotypu rezistence

Níže popsané metody průkazu beta-laktamáz rozšířeného spektra (ESBL) jsou v současné době doporučením Státního zdravotního ústavu Praha (SZÚ). V rutinní laboratorní praxi se mohou používat různé modifikace těchto metod, především z důvodu zjednodušení detekce ESBL v rutinní diagnostice.

7.1.1. Vyhledávání kmenů produkujících ESBL

Pro základní skrínění producentů ESBL lze použít metodu vyhledávání podle průměru inhibičních zón (IZ) okolo disků, nebo podle hodnot minimálních inhibičních koncentrací (MIC) indikátorových beta-laktamových antibiotik. Kmen podezřelý z produkce ESBL je takový, který má alespoň jednu hodnotu IZ nižší (nebo MIC vyšší), než je hodnota hraniční. Disková citlivost a stanovení MIC se provádí standardními postupy. Hraniční hodnoty pro diskovou citlivost jsou pro cefpodoxim ≤ 17 mm, pro ceftazidim ≤ 22 mm a pro aztreonam a cefotaxim ≤ 27 mm; hraniční hodnoty MIC jsou pro cefpodoxim > 4 mg/l a pro ceftazidim, aztreonam a cefotaxim > 1 mg/l.

7.1.2. Konfirmační metoda CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute, USA)

Tato metoda využívá srovnání průměru inhibičních zón, které vytváří testovaný kmen na Mueller-Hinton agaru okolo disků s určitým cefalosporinem a okolo disku obsahujícím kombinaci téhož cefalosporinu s klavulanovou kyselinou.

Hodnocení:

- Producent ESBL vytváří inhibiční zóny mezi diskem s cefalosporinem a diskem obsahujícím kombinaci téhož cefalosporinu s klavulanovou kyselinou; rozdíl průměrů ≥ 5 mm ve prospěch disku s kombinací.
- Produkce ESBL může být skryta, pokud kmen současně produkuje AmpC a to i v případě, že se použije cefalosporin 4. generace a tentýž cefalosporin v kombinaci s klavulanovou kyselinou. Pro průkaz ESBL je nutno produkci AmpC inhibovat.

7.1.3. Metoda DDST (Double Disk Synergy Test)

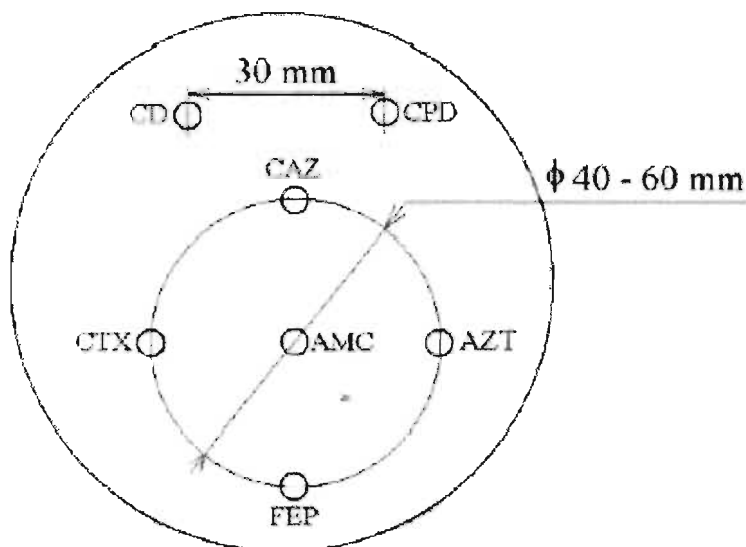
Metoda je založena na principu detekce deformace inhibičních zón, které vytváří testovaný kmen na Mueller-Hinton agaru mezi disky s cefalosporiny a aztreonamem, a diskem s amoxicilinem/klavulanovou kyselinou. Vzdálenost disků je v rozmezí 20-30 mm od středů, podle testovaného druhu a zkušenosti laboratoře. Doporučená kombinace a rozložení disků ukazuje Obrázek 1. Test se používá v rutinní diagnostice, je specifický a má význam pro volbu optimální antibiotické léčby, pokud se jedná o klinicky významný izolát.

Hodnocení (PŘÍLOHA B):

- Producent ESBL vytváří zvětšenou inhibiční zónu, obvykle ve tvaru „zátky od šampaňského“, kolem disku alespoň jednoho z antibiotik (aztreonamu, cefotaximu, ceftazidimu, cefepimu) na straně sousedící s diskem kombinace amoxicilin/klavulanová kyselina. (PŘÍLOHA C)
- Produkce ESBL může být skryta, pokud kmen současně produkuje AmpC. Pro průkaz ESBL je nutno produkci AmpC inhibovat. (PŘÍLOHA D)

Obrázek 1

Doporučené uspořádání disků při metodě DDST, kombinované s metodou CLSI
(převzato z práce Hrabák a spol.)²²



Vysvětlivky a zkratky:

Kódové označení disků (obsah disku):

AMC: kombinace amoxicilin/klavulanová kyselina (20/10 µg)

AZT: aztreonam (30 µg)

CAZ: ceftazidim (30 µg)

CPD: cefpodoxim (10 µg)

CD: kombinace cefpodoxim/klavulanová kyselina (10/1 µg)

CTX: cefotaxim (30 µg)

FEP: cefepim (30 µg)

7.1.4. E test

Tato metoda je stejně jako metoda DDST založena na průkazu synergického účinku mezi inhibitorem beta-laktamázy a cefalosporiny III. generace. Test využívá proužky napuštěné dvěma gradienty, na jednom konci ceftazidimem a na opačném ceftazidimem a klavulanátem.¹⁸ Hodnota MIC je interpretována jako bod průniku inhibiční zóny s okrajem proužku Etestu. Test je ESBL pozitivní, jestliže průměr MIC ceftazidimu a klavulanátu k MIC ceftazidimu je > 8 .²¹ Metoda je snadná pro praktické využití, ale někdy obtížná pro interpretaci výsledků.¹⁵ Nevýhoda Etestu spočívá v problému s prokazováním jiných druhů enzymů ESBL kromě TEM a SHV (např. CTX-M), kdy test může vykazovat falešně negativní výsledky.

7.1.5. Rychlá detekce ESBL

Výsledky produkce ESBL jsou k dispozici nejdříve za 2 dny po indikaci vyšetření citlivosti, čili za jeden den po odečtení MIC nebo průměru inhibičních zón. V rutinní praxi mikrobiologické laboratoře lze však zhruba 90% producentů ESBL odhalit za jeden den (zhruba za 18 hodin), současně s odečtením výsledků vyšetření citlivosti ostatních antibiotik. Postupuje se jako u metody DDST s tím rozdílem, že inokulum vyšetřovaného kmene se naočkuje rozřetrem na ½ Mueller-Hinton agaru, na kterou se umístí tři disky, obvykle ceftazidim, kombinace amoxicilinu s klavulanovou kyselinou a cefotaxim. Na druhé polovině plotny se stejným způsobem vyšetří další kmen. Je-li následující den výsledek negativní, postupuje se podle odstavce 7.1.1.²²

7.1.6. Detekce ESBL v přítomnosti AmpC

Beta-laktamázy typu AmpC jsou chromozomálně kódované enzymy. Kódují je vlastní geny ampC, které je mohou transferovat i na plazmidy, čímž se mohou vyskytovat i u druhů běžně nevlastnících tyto geny (*K. pneumoniae*). Dle Amblerova schéma se řadí do třídy C. V rutinní laboratoři se detekují obtížně.²⁰ Hydrolyzují peniciliny, cefamyciny, většinu cefalosporinů a monobaktamy, nehydrolyzují karbapenemy a nejsou inhibovány inhibitory beta-laktamáz.

- Enzymy typu AmpC inhibuje kyselina boritá, kloxacilin a další látky. Tyto inhibitory lze využít k selektivní inhibici enzymu AmpC.
- ESBL v přítomnosti AmpC lze detekovat na Mueller-Hinton agaru se 128 mg/l oxacilinu. Další postup metody a hodnocení je shodné jako u průkazu ESBL uvedeného výše.
- Pokud je průměr inhibičních zón okolo disků na plotně s Mueller-Hinton agarem s oxacilinem větší, než na Mueller-Hinton agaru bez oxacilinu, jedná se o produkci enzymu typu AmpC.

7.2. Interpretace výsledků

- Příklad fenotypu *K. pneumoniae* bez produkce ESBL viz PŘÍLOHA E. Jsou patrné velké inhibiční zóny, bez známek synergie mezi klavulanátem a testovanými antibiotiky.
- Charakteristické fenotypy citlivosti a rezistence lze rozeznat podle tvaru inhibičních zón kolem disků s beta-laktamovými antibiotiky na půdě Mueller-Hinton agaru. Při interpretaci výsledků je také potřeba brát v úvahu deformace zón, které nejsou způsobeny producenty ESBL. Jedná se například o rozšíření inhibiční zóny okolo disku cefepimu směrem k disku s amoxicilinem s klavulanovou kyselinou, které je obvykle způsobeno enzymem SHV-1 u druhu *K. pneumoniae*. Tato zóna má charakteristický tvar, připomínající vajíčko („egg-like“).
- Druh *K. oxytoca* inherentně produkuje enzym K1, který je inhibován klavulanovou kyselinou. Hyperprodukce tohoto enzymu, která se při použití metody DDST jeví jako vajíčku podobné rozšíření inhibiční zóny u disků s cefalosporiny anebo s aztreonamem směrem k disku kombinace amoxicilin/klavulanová kyselina, může být chybně odečtena jako produkce ESBL.

7.3. Sdělování výsledků

Producent širokospektré beta-laktamázy (ESBL) je pokládán za rezistentní ke všem penicilinovým antibiotikům, monobaktamům (aztreonamu) a k cefalosporinům všech generací bez ohledu na výsledky minimální inhibiční koncentrace nebo diskové citlivosti. Klinický účinek cefamycinu (cefoxitinu), a kombinace penicilinů s inhibitory beta-laktamázy (kyselina klavulanová, sulbaktam, tazobaktam), je nejistý.²²

7.4. Molekulárně-biologické metody průkazu ESBL

Výše uvedené metody založené na průkazu fenotypu mohou pouze prokázat přítomnost ESBL, přesné určení specifických beta-laktamázy s rozšířeným spektrem v klinickém materiálu je však komplikovanější.¹⁵ K analýze přítomných genů specifických pro daný enzym se využívá specifické nukleotidové sekvence.²¹ Při dřívější detekci genů beta-laktamázy se využívaly DNA sondy, které byly specifické pro enzymy TEM a SHV. Avšak používání DNA sond bylo někdy poněkud pracovně náročné. Snadnější a častěji používanou molekulární metodou užívanou k zjištění přítomnosti enzymů patřící do rodiny beta-laktamázy je PCR (polymerázová řetězová reakce) využívající oligonukleotidové primery specifické pro geny beta-laktamázy. Další molekulárně-biologické techniky, které se uplatňují v praxi jsou PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism), PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism), LCR (ligase chain reaction), oligotypizace nebo sekvenování nukleotidů.¹⁵

8. *Klebsiella* sp.

8.1. Charakteristika

Rod *Klebsiella* patří do čeledi *Enterobacteriaceae*.²³ Nejčastěji se vyskytující druhem je *K. pneumoniae*, v klinickém materiálu bývá rovněž přítomen druh *K. oxytoca*, ostatní druhy jsou méně významné.^{7,23} Klebsiely jsou nepohyblivé fakultativně anaerobní gramnegativní tyčky většinou výrazně opouzdřené polysacharidovým pouzdrem. Nalézají

se v zažívacím traktu a v dýchacích cestách.³ Přenášejí se fekálně orálně, ale i kontaktem, na krátké vzdálenosti snad i vzduchem.²³

8.2. Patogeneze

Klebsiely jsou podmíněně patogenní. Jsou běžnými původci močových infekcí, někdy způsobují bronchopneumonie i destrukci tkáně s tvorbou mnohočetných abscesů. Ze všeho nejvíce jsou klebsiely důležité jako původci nemocničních infekcí. Uplatňují se hlavně na novorozeneckých odděleních, u novorozenců mohou vyvolávat sepse a hnisavé meningitidy, a na jednotkách intenzivní péče, kde často kolonizují respirační trakt.^{3,7} Po chirurgických výkonech a po těžké močové infekci může vzniknout klebsielová sepse; klebsielová infekce je často spojena s bakteriemií, na niž pacienti umírají.⁷ Nemocniční klebsielové infekce se obvykle šíří prostřednictvím ventilátorů, inhalátorů, anesteziologických přístrojů nebo kontaminovaných infúzních roztoků.²⁴ Pacienti, kteří jsou v nemocnici léčeni antibiotiky, jsou velmi často klebsielami kolonizováni. Klinický význam kolonizace je zřejmě nepřímý. U pacientů v těžkém stavu, starých a kachektických nemocných se může rozvinout primární klebsielová bronchopneumonie.⁷

8.3. Citlivost na antibiotika a léčba

Kmeny izolované z klinického materiálu jsou primárně rezistentní k ampicilinu a amoxicilinu a citlivé k cefalosporinům, zvláště k novým derivátům, jako je cefuroxim a cefotaxim. Rezistence k chloramfenikolu a tetracyklinu je závislá na individuálním kmeni. Klebsiely jsou přirozeně citlivé ke gentamycinu a v nemocnicích jsou časté kmeny s přenosnou enzymovou rezistencí ke gentamycinu a některým cefalosporinům.⁷ Citlivost na antibiotika jako u všech podmíněných patogenů kolísá. Postupem doby přibývá vlivem antibiotické léčby rezistentních kmenů.³

Léčba

Nekomplikované klebsielové močové infekce dobře odpovídají na léčbu trimetoprimem, nitrofurantoinem, ko-amoxiklavem nebo perorálním cefalosporinem. Pneumonie a ostatní vážné infekce vyžadují energickou parenterální léčbu nejlépe podle aktuálního antibiogramu.⁷

8.3.1 Projekt surveillance antibiotické rezistence (EARSS)

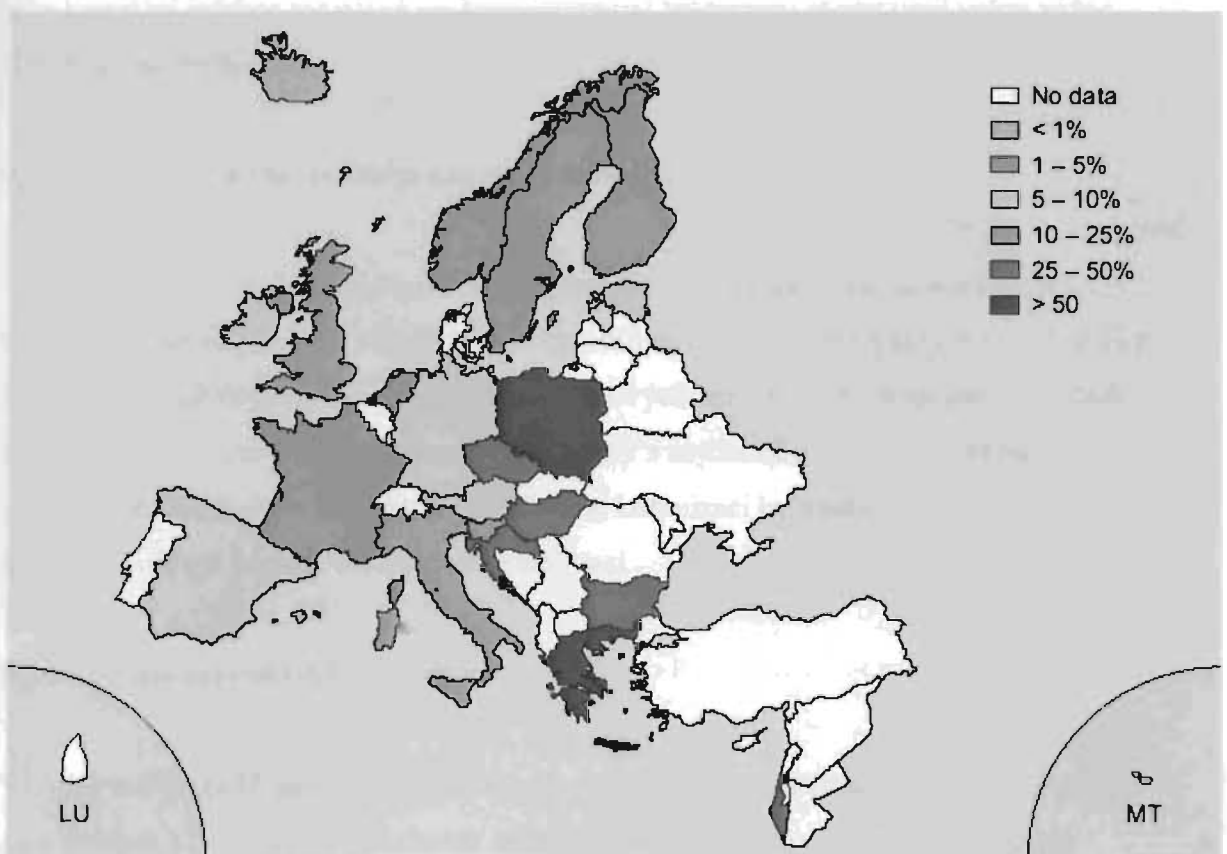
Pro účely EARSS zaznamenávají laboratoře zúčastněné v tomto projektu výsledky vyšetření citlivosti pouze k několika určitým antibiotikům, která jsou významná z hlediska léčby invazivní infekce způsobené daným původcem nebo pro epidemiologii AR.

Laboratoře CZ-EARSS postupují podle rutinních metod při vyšetřování vzorků pacientů a určování citlivosti k antibiotikům.

EARSS začalo v roce 2005 sbírat výsledky kmenů *K. pneumoniae* rezistentních k třetí generaci cefalosporinů (Obrázek 2), fluorochinolonům, aminoglykosidům a karbapenemům.

Obrázek 2

***K. pneumoniae*: poměr invazivních izolátů rezistentních k třetí generaci cefalosporinů v roce 2005 (převzato z EARSS)⁴**



Vysvětlivky:

Rezistence ke třetí generaci cefalosporinů je poněkud heterogenní napříč Evropou. Některé země hlásily poměry pod 5%, Finsko (2%), Francie (4%), Norsko (1%), Nizozemsko (4%) a Švédsko (1%), zatímco některé východoevropské země a Izrael hlásily 25% a vyšší poměr rezistentních kmenů: Bulharsko (50%), Chorvatsko (46%), Kypr (33%), Česká republika (32%), Řecko (61%), Maďarsko (31%), Izrael (38%) a Polsko (66%).⁴

9. Sledování výskytu nozokomiálních infekcí vyvolaných gramnegativními multirezistentními původci (*Klebsiella* sp.) produkujícími ESBL na oddělení JIP a ARO ve FN Motol

9.1. Úvod

Jedním z problémů současné medicíny je zvyšující se počet bakteriálních kmenů s nebezpečnými fenotypy rezistence, včetně *K. pneumoniae* s produkcí širokospektrých beta-laktamáz. K tomuto vývoji dochází i na specializovaných odděleních JIP a ARO, kde nozokomiální infekce vyvolané multirezistentními bakteriemi představují velmi vážné ohrožení pacientů.

9.1.1. Cíl studie a hlavní sledované ukazatele

Hlavním cílem sledování bylo zhodnocení časnosti a rizika kolonizace nemocniční bakteriální flórou pacientů přijatých na oddělení s intenzivní péčí (ARO). Konkrétně bylo sledováno osídlení sliznic dýchacích nebo močových cest *Klebsiella* sp. produkujících ESBL, které se toho času vyskytovaly jako jedny z nejčastějších původců NI na příslušných odděleních. Ve vztahu k předchozí kolonizaci byla také hodnocena pravděpodobnost rozvoje infekčních komplikací.

9.1.2. Zdroje informací pro analýzu

Bakteriologické monitorování pacientů v pravidelných intervalech. Mikrobiologická data získaná z počítačového software AMIS. Záznamy o infekcích v chorobopisech pacientů a ústní sdělení konzultanta pro antibiotickou léčbu.

9.2. Materiál a metody

9.2.1. Metodika sledování

Pacientům, přijatým na oddělení ARO, je odebírán materiál na bakteriologické vyšetření: v den přijetí a potom každý druhý nebo třetí den, v případě projevů infekce podle možnosti okamžitě. Pro účel pravidelného sledování bakteriální mikroflóry pacienta je biologický materiál odebírán z horních cest dýchacích (výtěr z nosu a nosohltanu), dále endotracheální aspirát (ETR), pokud je pacient připojen na umělé ventilaci, a u všech je kultivována moč. Dále, podle konkrétní situace, je materiál odebírán z případného infekčního ložiska jako stěr nebo sekret z operační rány, případně další materiály (sekret z drénů, mozkomíšni mok, punktáty z abscesů) a hemokultury u pacientů s celkovými příznaky infekce.

Biologický materiál je mikroskopicky a kultivačně vyšetřen a výsledky včetně postupů zaznamenány do programu AMIS používaného pro rutinní záznamy, ukládání, analýzu a tisk výsledků na Ústavu lékařské mikrobiologie FN v Motole.

Pacienti byly pro účel sledování rozděleni do 2 skupin :

A. pacienti přijatí přímo z komunity (terénu) - nejčastěji s diagnózou závažných poranění (polytrauma a/nebo poraněním hlavy či páteře), závažné komunitní pneumonie apod.

B. pacienti přeložení z jiných oddělení - z důvodu zhoršení klinického stavu vyžadujícího intenzivní péči. U těchto pacientů byla již předpokládána pravděpodobnost kolonizace nemocniční flórou v závislosti na podmínkách na oddělení, na kterém byli původně hospitalizováni.

V chorobopisech a také na podkladě ústních konzultací byla vymezena skupina pacientů, u kterých proběhla infekce v souvislosti s hospitalizací na oddělení ARO.

9.2.2. Odběr a transport biologického materiálu pro bakteriologické sledování

Materiál byl odebírán v souladu s rutinními postupy zavedenými na oddělení. Odběry se provádějí pravidelně každé pondělí, středu a pátek. Kromě toho u každého nemocného v den přijetí na oddělení ARO a také v případě známek infekce. Výtěry z nosohltanu a nosu byly odebírány na dacronový tampon. Odsátý sekret z dolních cest dýchacích (endotracheální aspirát) u pacientů na řízené ventilaci z injekční stříkačky aplikován do sterilní odběrové lahvičky.

Výtěry z ran se odebírají na sterilní dacronový tampon nebo, pokud je možné získat tekutý materiál, přímo do injekční stříkačky, která se řádně utěsněna a zabezpečena gumovou zátkou může současně použít pro transport na mikrobiologické oddělení. U takto odebraného materiálu je v případě podezření na anaerobní nebo smíšenou infekci třeba provést i anaerobní kultivaci.

Odběru krve na hemokultivační vyšetření je třeba věnovat maximální pozornost i z hlediska vysokého rizika kontaminace kožní mikroflórou (koaguláza negativní stafylokoky, *Corynebacterium* sp. ...). Správně provedená desinfekce místa odběru a technicky správný odběr krve patří proto k zcela zásadním úkonům, které mohou významně ovlivnit výsledek odběru ve smyslu omezení falešně pozitivních nálezů v hemokultuře, které mohou být v některých případech velmi obtížně hodnotitelné a přinášejí interpretační obtíže. Krev na hemokultivaci se odebírá nejčastěji z periferie (kubitální žíly). Pokud má pacient zavedeny cévní vstupy (centrální žilní katétr, arteriální katétr, periferní kanyla...) je vhodné odebírat krev z několika míst současně z důvodu odlišení klinicky významných nálezů od kožní kontaminace nebo kolonizace cévních vstupů. Pokud se cévní katetry odstraňují nebo vyměňují je také nezbytné jejich kultivační vyšetření a zhodnocení případných pozitivních nálezů v kontextu nálezů z hemokultur.

Odebraný biologický materiál na tamponech nebo v nádobkách musí být doručen do 2 hodin na Ústav lékařské mikrobiologie FN v Motole k dalšímu zpracování nebo uchován v transportní půdě (výtěry) nebo v hemokultivační nádobě (hemokultivační systém BACTEC) při pokojové teplotě.

9.2.3. Bakteriologické vyšetření

Biologický materiál se vyšetřuje podle lokálních standardních operačních postupů (SOP) na bakteriologické laboratoři .

Mikrobiologická laboratoř hraje klíčovou úlohu ve sledování, léčbě, kontrole a prevenci NI. Hlavní úkoly mikrobiologické laboratoře v této oblasti lze shrnout do následných vzájemně navazujících bodů :

1. Co nejrychlejší určení a přesná identifikace původců NI včetně stanovení citlivosti k antibiotikům *in vitro* a průkazu významných fenotypů rezistence (včetně produkce ESBL) v kontextu správné volby antibiotika u klinicky ověřených infekcí. Do této oblasti spadá i důraz na správnou techniku odběru biologického materiálu určeného k mikrobiologickému vyšetření, dodržení zásad a doporučené doby transportu příslušných vzorků do mikrobiologické laboratoře. Chyby a nedostatky v dodržování těchto principů mohou mít za následek získání chybných výsledků se všemi negativními důsledky pro pacienta ve smyslu racionální antibiotické léčby i pro aktuální epidemiologickou situaci na příslušném oddělení.

2. Mikrobiologické výsledky kromě jiného slouží jako primární zdroj dat pro sledování trendů ve výskytu a vývoji NI a zároveň časné informace podezření na infekci nozokomiálního původu. Rutinní surveillance NI zahrnuje denní přehled signifikantních původců nemocničních infekcí a je podkladem pro další mikrobiologické a zejména epidemiologické šetření.

3. Časná diagnóza NI je významná z hlediska preventivních opatření směřujících k zábraně dalšího diseminace příslušného typu nákazy na další pacienty s důrazem na vyhledávání zdrojů a cest šíření a realizaci účinných opatření.

4. Laboratoř má svůj podstatný význam v obdobích epidemického výskytu příslušné NI prostřednictvím přesné typizace izolátů (fenotypické nebo genotypické) sloužící jako zdroj pro určování epidemiologických souvislostí, identifikace zdrojů a způsobů přenosu.

5. Monitorování antibiotické rezistence, její lokální i celkové přehledy v definovaných časových obdobích, detekce závažných fenotypů rezistence apod. patří k dalším z pohledu epidemiologických sledování zásadním úlohám mikrobiologického pracoviště v nemocničním prostředí.

*Pro účel sledování byly k další analýze uchovány kmeny *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*. U těchto kmenů byly zpětně vyhodnoceny a srovnány výsledky citlivost k antibiotikům *in vitro* a to buď metodou diskově difusního testu nebo stanovením MIC (minimální inhibiční koncentrace) metodou v mikrotitrační destičce. U všech kmenů klebsiel byl rovněž proveden diskový test (DDST) na průkaz produkce ESBL beta-laktamáz.*

9.2.4. Specifikace a antibiogram sledovaných species

V Tabulce 1 jsou uvedeny charakteristické antibiogramy sledovaných species. Jedná se ve valné většině o rezervní antibiotika používaná k parenterální léčbě závažných infekcí. Antibiogram slouží jako informace pro výběr pro léčbu vhodných, (*in vitro*) citlivých přípravků, a také jako vodítko pro pravděpodobnou identitu kmenů se stejným fenotypem rezistence.

Tabulka 1

Specifikace a charakteristický fenotyp rezistence sledovaných oportunních patogenů

| | AMP/inh. | PIP/inh. | GEN | AMI | CIP | MER | IMI | CTX | CTZ | CEF | COT |
|------|----------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| KLPN | C/R | C/R | R | C/R | R | C | C | R | R | C/R | R |
| KLOX | C/R | C/R | R | R | R | C | C | R | R | C/R | R |

Zkratky:

KLPN – *K. pneumoniae*, KLOX – *K. oxytoca*

Antibiotika: AMP/inh – aminopenicilin s inhibitorem beta laktamáz, PIP/inh – piperacilin s inhibitorem beta laktamáz, GEN – gentamicin, AMI – amikacin, CIP – ciprofloxacin, MER – meropenem, IMI – imipenem, CTX – cefotaxim, CTZ – ceftazidim, CEF – cefepim, COT - ko-trimoxazol.

C – citlivý

R – rezistentní

9.2.5. Průkaz produkce ESBL

K prokázání fenotypu rezistence u izolovaných kmenů byla použita metoda difuzního diskového testu (DDST). Jelikož nová doporučení SZÚ vyšla až během sledování, byla

použita modifikace této metody, která byla v současné době zavedena v místě výkonu sledování na Ústavu lékařské mikrobiologie FN v Motole.

Průkaz ESBL metodou DDST

DDST byl proveden za podmínek viz PŘÍLOHA F na Mueller-Hinton agaru inokulovaném vyšetřovaným kmenem. Disky cefotaximu, ceftazidimu, cefriaxonu a aztreonamu byly umístěny ve vzdálenosti 20 a 30 mm (měřeno od středu disků) od centrálního disku obsahujícího amoxicilin/kys. klavulanovou (PŘÍLOHA G). Vizuální hodnocení proběhlo po nejméně 18 hodinové inkubaci. Kmeny s typickým rozšířením inhibiční zóny mezi cefotaximem, ceftazidimem, cefriaxonem, aztreonamem a amoxicilinem s kys. klavulanovou byly identifikovány jako producenti ESBL. Výsledky byly zaznamenány do počítačového softwaru AMIS a poté souhrnně zpracovány.

9.3. Výsledky a analýza sledování

9.3.1. Výsledky sledování výskytu nozokomiálních infekcí na oddělení ARO FN Motol vyvolaných kmeny *Klebsiella* sp.

V období od 1.12.2006 do 28.2.2007 bylo do sledování zahrnuto celkem 55 pacientů přijatých na oddělení ARO. Z tohoto počtu 30 (54,5%) pacientů bylo přijato z komunity, z nich 19 (63,3%) s diagnózou polytrauma, 4 (13,3%) s diagnózou bronchopneumonie a ve dvou případech se jednalo o komplikaci v pozdním období po transplantaci plic, ostatní (5) byli přijati s různými diagnózami jako bezvědomí nejasného původu, intoxikace apod. Celkem 25 pacientů bylo přeloženo z jiných oddělení, nejčastěji jednotek intenzivní péče.

U pacientů přijatých z komunity nebyly při vstupních výtěrech nalezeny žádné multirezistentní gramnegativní tyčky, kromě 2 pacientů s transplantovanými plícemi, z nichž jeden byl v dolních cestách dýchacích kolonizován multirezistentním kmenem *Pseudomonas aeruginosa* a druhý kmenem *Enterobacter cloacea*.

U nemocných překládaných z jiných oddělení bylo procento kolonizovaných podle předpokladu vyšší. Kolonizace kmenem *Staphylococcus aureus* (žádný z nich nevykazoval rezistenci k oxacilinu – MRSA) byla zjištěna celkově u 8 pacientů, hodnocení těchto nálezů ale nebylo předmětem sledování.

Tabulka 2

Kolonizace dýchacích a močových cest pacientů při přijetí na oddělení ARO sledovanými bakteriálními druhy gram negativních tyčků

| Soubor | Počet | Koloni- zace | Sledovaná species | Celkem kolonizovaných sledovanými druhy |
|---------------------------|-------|-----------------|---|--|
| Pacienti z komunity | 30 | 5* | <i>K. pneumoniae</i> (0) | 0 |
| Přeložení pacienti | 25 | 18* | <i>K. pneumoniae</i> (4) <i>K. oxytoca</i> (1) | 5 |

*další species kolonizující dýchací cesty pacientů, které nebyly v rámci sledování hodnoceny: *Enterobacter cloacea* (3), *E. coli* (2), *Pseudomonas aeruginosa* (3), *Acinetobacter sp.*, (3) *Stenotrophomonas maltophilia* (2), *Serratia marcescens* (2), *Alcaligenes sp.* (1), *Proteus mirabilis* (1).

V Tabulce 2 je uvedena postupná kolonizace vybranými bakteriálními druhy v závislosti na délce pobytu na oddělení ARO u skupiny pacientů přijatých z komunity a pacientů přeložených z jiných oddělení, kteří nebyly podle odběrů při přijetí na ARO kolonizováni stejnými bakteriálními druhy, které byly předmětem sledování.

Pro obtížnou interpretaci již kolonizovaných překládaných pacientů (celkem 9) nebyla tato podskupina již dále hodnotili. V tabulce je uváděn u souboru pacientů jen první den, kdy byla zjištěna kolonizace a nejsou uváděny opakované nálezy u stejného pacienta nebo následné nálezy dalších sledovaných species.

Tabulka 3

Kolonizace a infekce pacientů přijatých na oddělení ARO vybranými bakteriálními species (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*)

| Den | 3 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 11 | 12 | 13 | 18 | 21 | Celkem |
|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|--------|
| Pacienti z komunita Kolonizace (30) | 1 | 2 | - | 1 | - | - | 3 | 1 | 1 | - | 1 | 10 |
| Pacienti komunita Infekce (30) | - | - | 1 | - | - | 1 | - | - | - | 1 | - | 3 |
| Přeložení Kolonizace (16) | - | 1 | 1 | 1 | - | 2 | 1 | 2 | - | - | - | 8 |
| Přeložení Infekce (16) | - | - | - | 1 | - | - | 1 | - | - | 1 | - | 3 |

Jak vyplývá z tabulky z celkového počtu 46 do sledování zařazených pacientů se postupně kolonizovalo klebsielami 18 nemocných tj. 39% a infekce se rozvinula u 6 tj. celkem 33% z počtu kolonizovaných.

9.3.2. Prevalence ESBL-pozitivních kmenů na oddělení ARO a JIP

Ve sledovaném období od 1.10.2006 do 31.1.2007 bylo na odděleních JIP a ARO izolováno 182 kmenů *K. pneumoniae*. Produkce ESBL byla prokázána u 60 (33%) z nich. Na standardních oddělení bylo pozitivních ESBL kmenů 15,5% z celkového počtu 224 izolovaných. Výsledky srovnává Tabulka 4.

Tabulka 4

Počet izolovaných kmenů (%) – srovnání specializovaných oddělení ARO a JIP s ostatními odděleními

| | ARO, JIP | Ostatní oddělení |
|----------------|----------|------------------|
| ESBL negativní | 122(67) | 189 (84,4) |
| ESBL pozitivní | 60 (33) | 35 (15,6) |
| Celkem | 182 | 224 |

Z tabulky je patrné, že výskyt ESBL-pozitivních kmenů na odděleních ARO a JIP závažně převyšuje výskyt těchto kmenů na ostatních odděleních. Z výsledku se dá předpokládat šíření epidemických klonů v rámci oddělení. Přesnější vývoj ESBL-pozitivních kmenů by nám pomohlo určit molekulárně-biologické vyšetření u jednotlivých hospitalizovaných pacientů.

ESBL-pozitivní kmeny klebsiel byly zachyceny především v materiálu z dolních cest dýchacích (sputum, ETR,...) 27,7%, zdrojem 14,8% ESBL-pozitivních byla odebraná moč. Nezanedbatelným záchytem jsou materiály z katétrů a kanyl v 10,2%. (PŘÍLOHA H)

9.3.3. Analýza některých případů infekce

Pacient 1 byl přijat z komunity s mnohočetným poraněním po autonehodě, 5. den byla prokázána kolonizace ETR kmenem *K. pneumoniae* s produkcí ESBL., 9. den se u tohoto pacienta rozvinula ventilátorová pneumonie a podle antibiogramu identický kmen byl prokázán i v hemokultuře. Volba antibiotik pro léčbu vycházela z antibiogramu izolované klebsiely a byla léčebně úspěšná.

Obdobný byl průběh i u **pacienta 2**, který byl přijat z komunity po úrazu hlavy, 5. den po přijetí byl u něho izolován kmen *K. pneumoniae* produkcí ESBL v ETR a 6. den pravděpodobně stejný kmen i v moči. Tento den byla u něho diagnostikována počínající ventilátorová pneumonie. Léčba podle antibiogramu byla úspěšná.

Pacient 3 byl přijat z komunity pro krvácení do mozku spojené s bezvědomím. 18. den po přijetí se u něho rozvinula těžká sepse a z hemokultury byl izolován kmen *K. oxytoca* jehož primární zdroj se nepodařilo prokázat. Celkově závažný a prognosticky nepříznivý stav se nepodařilo zvládnout. Pacient byl také od 5. dne kolonizován multirezistentním kmenem *Pseudomonas aeruginosa* izolovaným z moče.

Pacient 4 byl přeložen z chirurgické JIP v těžkém stavu s peritonitidou. 7. den byl z drénů odvádějících sekret z břicha a současně z horních cest dýchacích izolován multirezistentní kmen *K. pneumoniae* s produkcí ESBL. Současně došlo k zhoršení klinického stavu a objevení se septických teplot. Kausální léčba cílená na kultivovaný kmen vedla ke zlepšení klinického stavu a dočasné stabilizaci pacienta.

Základním předpokladem úspěšné antimikrobní terapie je na prvním místě včasná a přesná klinická a bakteriologická diagnóza včetně zjištění fenotypu rezistence a na základě zjištěných výsledků stanovení přesné antibiotické léčby. Interpretace antibiogramu s vhodně volenou sestavou antibiotik a přesnou identifikací testovaného kmene může přinést řadu cenných informací ohledně mechanismů rezistence včetně určení základních druhů beta-laktamáz. Tento způsob umožňuje např. spolehlivou detekci širokospektrých beta-laktamáz (TEM, SHV) včetně ESBL a dalších enzymů.

Evoluce a šíření beta-laktamáz u gramnegativních tyček je důsledkem evoluce a spotřeby beta-laktamových antibiotik. Vedle novějších beta-laktamů zůstaly v používání i starší, takže v průběhu času jsou bakterie vystaveny účinku zvyšujícího se kvalitativního i kvantitativního počtu molekul těchto antibiotik. Kolísavé koncentrace, které se lokálně vytvářejí při současném používání různých beta-laktamů v nemocničním prostředí, jsou schopny rychle selektovat výhodné mutace, jejichž důsledkem může být výskyt různých ESBL. Jedinou doposud účinnou ochranou proti ztrátě účinku antibiotik v lokalitě zasažené výskytem ESBL (stejně jako u jakékoli neobvyklé rezistence) je pečlivé prověření antibiotických aplikací a důsledná eliminace všech, které jsou zbytečné.

V oblasti metod průkazu beta-laktamáz s rozšířeným spektrem stále zůstává problém přítomnosti dalších enzymů. Především enzym typu AmpC, který dokáže hydrolyzovat stejná antibiotika jako ESBL, ale není inhibován inhibitory beta-laktamáz. Při současném výskytu obou enzymů, může být detekce ztížena, stejně pak interpretace výsledků a přítomnost hledaných enzymů může zůstat neodhalena, kvůli zkreslenému či zdánlivě negativnímu fenotypu. Jak je uvedeno v aktuálních metodikách nabízí se zpřesnění průkazu těchto enzymů, které jsem vzhledem k času nestačila prakticky ověřit.

11. Závěr

Přesný a spolehlivý průkaz ESBL, stejně jako průkaz dalších epidemiologicky a klinicky významných fenotypů rezistence, patří dnes k důležitým úkolům nemocniční mikrobiologické laboratoře.

V blízké budoucnosti lze očekávat další zpřesnění detekce ESBL, velké možnosti v tomto ohledu přinášejí molekulární metody, jejichž rutinní aplikace by znamenala další významný diagnostický posun se všemi dalšími konsekvencemi.

Komplexnost celé problematiky, která je naznačena i v mé práci vyžaduje intenzivní kooperaci jednotlivých odborností, jako v případě NI zejména klinických specialistů, mikrobiologů a epidemiologů. Interdisciplinární přístup je základní podmínkou účinné a epidemiologicky bezpečné antibiotické léčby, jako i prevence závažných infekčních komplikací.

12. Seznam literatury

- (1) Lochmann, O.: *Základy antimikrobní terapie*. Praha, Triton 1994.
- (2) Urbášková, P.: Antibiotika a antibiotická rezistence z hlediska mikrobiologa. Dostupné z URL <http://www.medicina.cz/odborne/clanek.dss?s_id=3945> [cit. 28.10.2006]
- (3) Bednář, M.; Fraňková, V.; Schindler, J.; Souček, A.; Vávra, J.: *Lékařská mikrobiologie*. Praha, Marvil 1996.
- (4) EARRS. Dostupné z URL: <<http://www.szu.cz/cem/earss/earssver.html>> [cit. 28.2.2007]
- (5) Rozsypal, H.: *Obecná problematika antimikrobiální terapie*. Dostupné z URL: <<http://www1.lf1.cuni.cz/~hrozs/atbl.htm>> [cit. 28.10.2006]
- (6) Collignon, P. J.: *Antibiotic resistance*. Medical Journal of Australia. 177:6, 325-329 (2002)
- (7) Greenwood, D.; Slack, R. C. B.; Peutherer, J. F.; a kol.: *Lékařská mikrobiologie- Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha, Grada Publishing 1999.
- (8) Ferrari, M. J.; Turnidge, J. D.: *Section V. Antibacterial agents and susceptibility test methods*, 1037-1196. In: *Manual of clinical microbiology Vol. 1*. Editor Murray, P. R.; Baron, E. J.; Jorgensen, J. H.; Tenover, M. C.; Tenover, M. C.; ASM Press Washington, D. C., 2003, 1212p
- (9) Spížek, J.: *Rezistence na antibiotika*. Dostupné z URL: <<http://www.vesmir.cz/clanekT.php>> [cit. 28.10.2006]
- (10) Votava, M.: *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno, Neptun 2001.

- (11) Göpfertová, D.; Janovská, D.; Dohnal, K.; Melicherčíková, V.: *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena pro střední a vyšší odborné zdravotnické školy*. Praha, Triton 2002.
- (12) Livermore, D. M.: *β -lactamases in laboratory and clinical resistance*. Clin Microbiol Rev. 8, 557-584 (1995).
- (13) Nyč, O.; Lochmann O.; *Beta-laktamázy, jejich inhibitory a současný stav rezistence infekčních agens ve fakultní nemocnici Motol*. Remedia – Klinická mikrobiologie 2:5, 156-158 (1998).
- (14) Pisár M.: *Úloha blokátorov β -laktamázy pri liečbe infekcií dolných dýchacích ciest*. Dostupné z URL: <<http://www.apotheka.sk/default.asp?prg=article&id=4>> [cit. 27.2.2007]
- (15) Bradford, P. A.: *Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat*. Clinical Microbiology Reviews 14:4, 933-951 (2001)
- (16) Kolář, M.; Látal, T.; Čermák, P.: *Klinicko-mikrobiologické podklady racionální antibiotické léčby*. Praha, Trios 2002.
- (17) Mascaretti, O. A.: *Bacteria versus antimicrobial agents an integrated approach*. Washington D.C., ASM Press Washington, D. C. 2003.
- (18) Chaudhary, U.; Aggarwal, R.: *Extended spectrum β -lactamases (ESBL) – An emerging threat to clinical therapeutics*. Indian Journal of Medical Microbiology. 22:2, 75-80 (2004).
- (19) Bush, K.; Jacoby, G., A.; Medeiros, A., A.: *A functional classification Scheme for β -Lactamases and its correlation with molecular structure*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 39:6, 1211-1233 (1995).
- (20) Ježek, P.: *Možnosti detekce AmpC β -laktamáz v rutinní laboratoři*. Dostupné z URL: <www.bpp.cz/solan/PDF/blok1/4.pdf> [cit. 3.4.2007]

(21) Pfaller, M. A.; Segreti, J.: *Overview of the Epidemiological Profile and Laboratory Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases*. *Clinical Infectious Diseases*. 42:4, 153-163 (2006).

(22) Hrabák, J.; Vaniš V.; Bergerová, T.; Urbášková, P.: *Průkaz β -laktamáz širokého spektra (ESBL) a typu AmpC u enterobakterií*. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 16:1, 31-36 (2007).

(23) Votava, M. a kol.: *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno, Neptun 2003.

(24) Votava, M.; Ondrovčík, P.: *Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie*. Brno, Masarykova univerzita v Brně 1998.

13. PŘÍLOHY

PŘÍLOHA A

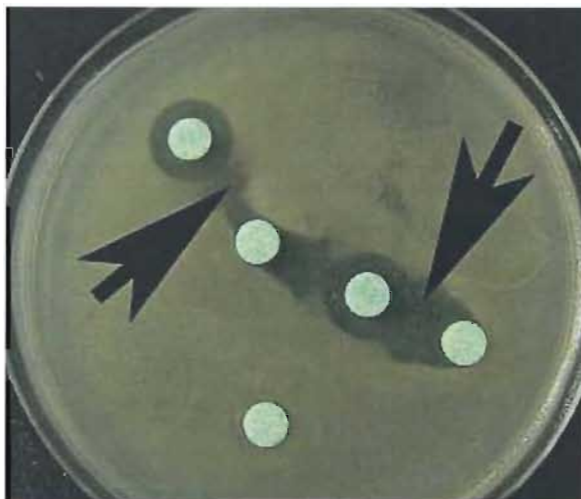
Klasifikace beta-laktamáz (upraveno podle Bushová a spol.)¹⁹

| Schéma Bush-Jacoby- Medeiros | Podskupiny | Amble- rovo schéma | Spektrum účinku | Klasifikační kritéria a příklady | Inhibice kys. klavula- novou |
|------------------------------------|------------|--------------------------|---|---|---------------------------------------|
| 1 | | C | Cefalosporiny | Chromozomální enzymy rezistentní ke všem beta- laktamům kromě karbapenemů | Ne |
| 2 | 2a | A | Peniciliny | Stafylokokové penicilinázy | Ano |
| | 2b | A | Cefalosporiny, peniciliny | Beta-laktamázy s úzkým spektrém účinku: TEM-1, | Ano |
| | 2be | A | Peniciliny, cefalosporiny s úzkým a rozšířeným spektrém | Beta-laktamázy se širokým spektrém TEM- 3 až TEM-26 (ESBL), SHV-2 | Ano |
| | 2br | A | Peniciliny | Beta-laktamázy TEM rezistentní | snížená |
| | 2c | A | Peniciliny, karbenicilin | PSE-1, PSE-3, PSE-4 | Ano |
| | 2d | D | Peniciliny, oxacilin | OXA-1, PSE-2 | Ano |
| | 2e | A | Cefalosporiny | Cefalosporinázy , enzymy | Ano |

| | | | | | |
|----------------------------------|----|----------------------|--|--|-----|
| | 2f | A | Peniciliny, karbapenemy, cefalosporiny | Karbapenemázy , enzymy Enterobacter cloacae | Ano |
| 3-metalo- β - laktamázy | | B | Většina beta- laktamů, karbapenem | Enzymy Xanthomonas maltophilia (L1) | Ne |
| 4 | | Neklasifi- kováno | peniciliny | Enzymy Pseudomonas cepacia | Ne |

PŘÍLOHA B

Průkaz produkce ESBL beta-laktamázy



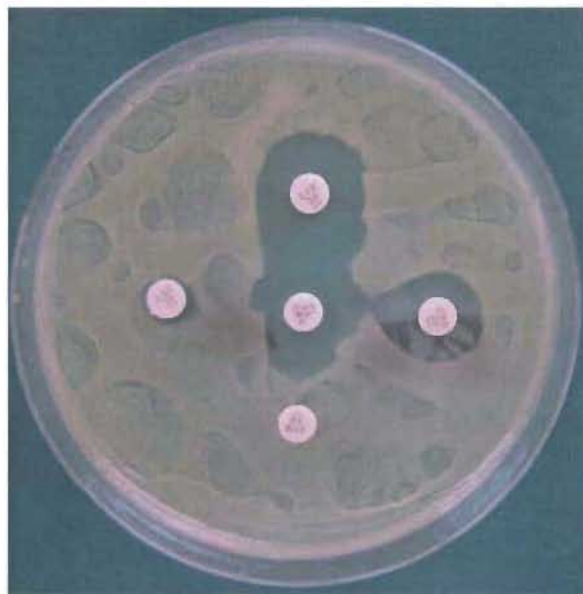
Na obrázku je znázorněn princip testu, kdy z disku, který obsahuje inhibitor beta-laktamázy (kyselinu klavulanovou), difunduje tato látka do okolí (agaru) a tam, kde se překryje s cefalosporinem, v tomto případě cefotaximem, inhibitor na sebe váže příslušnou beta laktamázu a tím chrání molekulu cefalosporinu. Vizualně se tento fenomén projeví jako vznik synergické inhibiční zóny charakteristického tvaru, viz označení šipkami.

PŘÍLOHA C

Příklady fenotypů rezistence k beta-laktamovým antibiotikům u kmene *Klebsiella pneumoniae* podle charakteru inhibičních zón

Fenotyp Charakter inhibičních zón

Produkce Synergie klavulanátu
ESBL s cefotaximem, jedná se o
fenotypový projev
produkce ESBL s vyšší
aktivitou na ceftazidim a
azteronam, pravděpodobně
enzym odvozený od SHV
nebo TEM beta-laktamázy



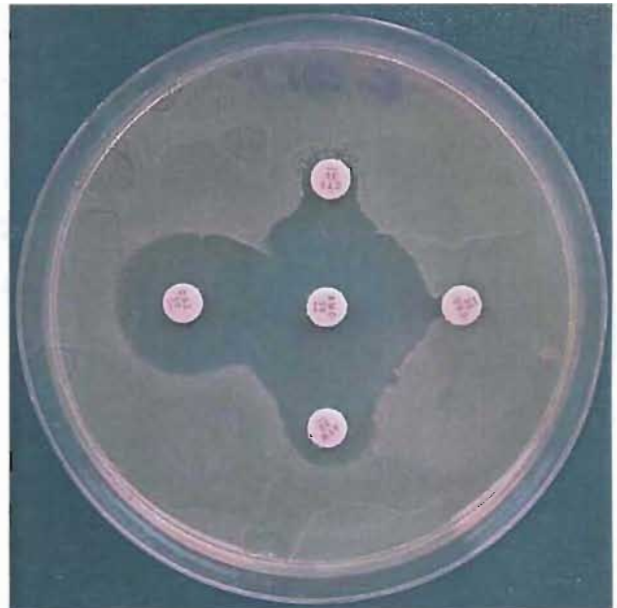
Produkce Charakteristicky rozšířená
ESBL inhibiční zóna v oblasti
difuze inhibitoru svědčí o
produkci ESBL vcelku
stejněměrně hydrolyzující
všechna čtyři testovaná
antibiotika



Produkce ESBL Prokazatelná synergie klavulanátu a všech testovaných antibiotik svědčí o přítomnosti ESBL se stejnou aktivitou na všechna čtyři testovaná antibiotika



Produkce ESBL Minimální zóna kolem cefotaximu a prokazatelná synergie napovídá pravděpodobně přítomnosti ESBL s vysokou aktivitou vůči cefotaximu a pravděpodobně se jedná o tzv. cefotaximázu (CTX-M)

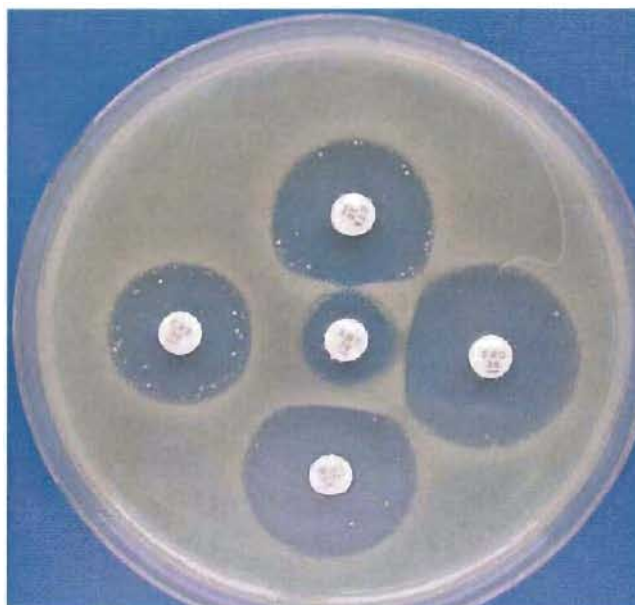


Vysvětlivky: CTX – cefotaxim, CRO – ceftriaxon, CAZ – ceftazidim, ATM – aztreonam, AMC – amoxicilin/klavulanát

PŘÍLOHA D

DDST - *K. pneumoniae*

| | |
|------------------|--|
| Fenotyp | Charakter inhibičních zón |
| Produkce AmpC | Oploštění inhibičních zón svědčí o antagonismu mezi klavulanátem a testovanými antibiotiky, což svědčí o produkci beta-laktamázy typu AmpC, která je indukována jak klavulanátem, tak cefalosporiny. Produkce ESBL může být rovněž přítomna, ale synergie může být potlačena právě nadprodukcí AmpC. |



Vysvětlivky: CTX – cefotaxim, CRO – ceftriaxon, CAZ – ceftazidim, ATM – aztreonam,
AMC – amoxicilin/klavulanát

PŘÍLOHA E

DDST - *K. pneumoniae*

Fenotyp Charakter
 inhibičních zón

Bez Jsou patrné velké
produkce inhibiční zóny,
ESBL bez známek
 synergie mezi
 klavulanátem a
 testovanými
 antibiotiky



Vysvětlivky: CTX – cefotaxim, CRO – ceftriaxon, CAZ – ceftazidim, ATM – aztreonam,
AMC – amoxicilin/klavulanát

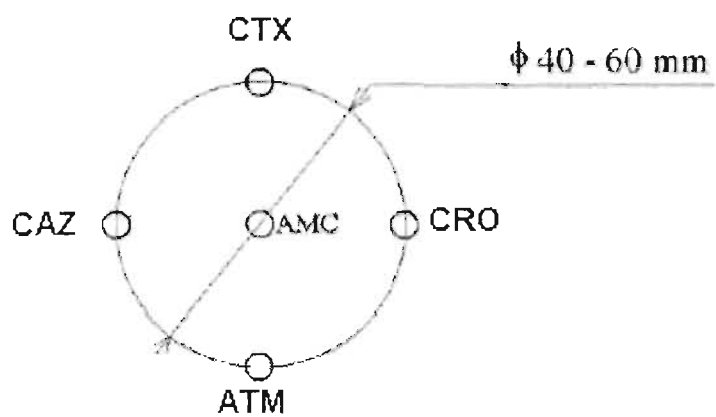
PŘÍLOHA F

Podmínky pro průkaz ESBL (převzato z Hrabák a spol.)²²

| | |
|---------------------|---|
| Půda | Mueller-Hinton agar (od firmy Oxoid) |
| Objem inokula | 2-5 ml ve fyziologickém roztoku |
| Příprava inokula | Přímá metody roztěrem kolonií (z kultury na krevním agaru staré nejvýše 24 hod.) |
| Koncentrace inokula | 0,5 dle McFarlandova zákalu (případně dále ředit 1:10 nebo 1:100); kolonie se mají okraji dotýkat, avšak nesplývat |
| Disky | Amoxicilin/kys. klavulanová (20/10 µg), cefotaxim (30 µg), ceftazidim (30 µg), cefriaxon (30 µg), aztreonam (30 µg) |
| Uspořádání disků | Viz PŘÍLOHA G |
| Ínkubace | 35 °C ± 2 °C v normální atmosféře |

PŘÍLOHA G

Uspořádání disků při metodě DDST



Kódové označení disků:

AMC: kombinace amoxicilin/klavulanová kyselina

ATM: aztreonam

CAZ: ceftazidim

CTX: cefotaxim

CRO: cefriaxon

PŘÍLOHA H

Výskyt ESBL-pozitivních kmenů *K. pneumoniae* v jednotlivých typech materiálu

| Klinický materiál | ESBL-pozitivní kmeny (%) |
|------------------------------|--------------------------|
| DCD (dolní cesty dýchací) | 30 (27,7) |
| moč | 16 (14,8) |
| katétry | 11 (10,2) |
| výtěr z rány | 10(9,3) |
| hemokultury | 10(9,3) |
| stolice | 6(5,5) |
| HCD (horní cesty dýchací) | 6(5,5) |
| punktát hrudní | 4 (3,7) |
| CŽK (centrální žilní katétr) | 4(3,7) |
| žluč | 3(2,8) |
| hnis | 2(1,9) |
| obsah žaludek | 2(1,9) |
| uretra | 1(0,9) |
| dřeň | 1(0,9) |
| cervix | 1(0,9) |
| stěr dekubitu | 1(0,9) |
| Celkem | 108(99,9) |