



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

**Fakulta biomedicínského inženýrství
katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

**Testování citlivosti bakterií k antimikrobním preparátům a metody
vyhledávání mechanismů rezistence**

**Antimicrobial susceptibility testing and methods of detecting resistance
mechanisms**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Hana Doležalová

Jana Marinčáková

Kladno, květen 2016

Z a d á n í b a k a l á ř s k é p r á c e

Student: **Jana Marinčáková**
Obor: Zdravotní laborant
Téma: **Testování citlivosti bakterií k antimikrobním preparátům a metody vyhledávání mechanismů rezistence**
Téma anglicky: Antimicrobial susceptibility testing and methods of detecting resistance mechanisms

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

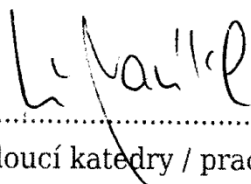
Testování citlivosti bakterií k antimikrobním látkám je základem práce bakteriologické laboratoře. Výstupem je získání podkladu pro racionální cílenou terapii pacienta. Pro interpretaci výsledku laboratorního testování je významné odhalit mechanismus rezistence. Rezistence bakterií k běžně používaným antimikrobním přípravkům je narůstajícím problémem léčby bakteriálních infekcí. Úkolem praktické části je osvojení zásad správné laboratorní praxe v identifikaci bakterií, dále provedení jednotlivých metod testování citlivosti bakterií k antimikrobním látkám (jako disková difúzní m. stanovení MIC v automatickém systému VITEK 2 nebo E-testem) a metod vyhledávání mechanismů rezistence bakterií.

Seznam odborné literatury:

- [1] URBÁŠKOVÁ, Pavla, Rezistence bakterií k antibiotikům - Vybrané metody, Praha: Trios, 1998, 120 s., ISBN 80-238-3106-2
- [2] SCHARFEN ml., Josef, Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii, Nukleus HK, 2013, 236 s., ISBN 978-80-87009-32-1
- [3] RELLER, Barth L., WEINSTEIN, Melvin, JORGENSEN, James H., FERRARO, Mary Jane, Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. Clinical Infectious Diseases, ročník vol. 49 (11), číslo December 01, s. 1749 1755, 2009, ISSN 1058 4838

zadání platné do: 30.09.2017

Vedoucí: MUDr. Hana Doležalová



.....
vedoucí katedry / pracoviště



.....
děkan

V Kladně dne 18.12.2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem **Testování citlivosti bakterií k antimikrobním preparátům a metody vyhledávání mechanismů rezistence** vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k bakalářské práci.

Neznám závažný důvod proti užití toho školního díla ve smyslu § 60 Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně dne 20. května 2016

Jana Marinčáková

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala paní MUDr. Haně Doležalové za pomoc a odborné vedení mé bakalářské práce. Zároveň i všem pracovníkům Oddělení klinické mikrobiologie Ústřední vojenské nemocnice v Praze, kteří mně vytvořili podmínky pro její zpracování.

Název bakalářské práce:

Testování citlivosti bakterií k antimikrobním preparátům a metody vyhledávání mechanismů rezistence.

Abstrakt:

Cílem této práce bylo seznámení se s principy a významem správné laboratorní praxe při stanovování antibiogramu, jako podkladu racionální cílené terapie a seznámení se s významem screeningu bakteriální rezistence pro omezení šíření rezistence v nemocničním prostředí. Metody použité k vyšetření citlivosti mikrobů zahrnují metody kvalitativní (disková difúzní metoda), kvantitativní (VITEK 2, E-test, diluční metody) a screeningové (screeningový agar pro screening MRSA, latex aglutinační test MRSA-Screen, KPC test, test DDST a jiné). Každý vzorek byl identifikován, byl k němu stanoven antibiogram a následně byl na základě údajů z antibiogramu podroben dalším testům za účelem potvrdit nebo vyvrátit naši domněnku o typu rezistence. V diskuzi je rozebrán antibiogram u jednotlivých typů rezistence u gram-pozitivních a gram-negativních bakterií.

Klíčová slova:

antimikrobní preparáty, vyšetření citlivosti, rezistence, antibiogram

Master's Thesis title:

Antimicrobial susceptibility testing and methods of detecting resistance mechanisms

Summary:

The aim of this thesis is to explore the principles and importance of correct laboratory procedures in determining an antibiogram as the basis for rational targeted therapy, and to examine the significance of antibiotic-resistance screening for reducing the spread of resistance in hospital environment. The methods used for microbial susceptibility testing include qualitative methods (disc diffusion method), quantitative ones (VITEK 2, E-test, dilution methods), and screening methods (screening agar for MRSA screening, latex agglutination test MSRA-Screen, KPC test, DDST test, and others). Each sample was identified, its antibiogram was determined, and subsequently was subjected to further tests based on the antibiogram data in order to confirm or dispute our hypothesis on the resistance type. The discussion examines antibiograms for the individual resistance types in gram-positive and gram-negative bacteria.

Key words:

antimicrobial agents, susceptibility testing, resistance, antibiogram

Obsah

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	9
1 ÚVOD	10
2 SOUČASNÝ STAV	11
2.1 BAKTERIE	13
2.1.1 Buněčná stěna	14
2.1.2 Cytoplasmatická membrána	15
2.1.3 Bakteriální genom	15
2.2 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY	17
2.2.1 Mechanismy účinku AML	19
Inhibice syntézy buněčné stěny	19
Inhibice cytoplasmatické membrány	20
Inhibice syntézy nukleových kyselin	21
Inhibice funkce ribosomů	21
Inhibice metabolismu kyseliny listové	21
Kombinovaný účinek AML	22
2.3 REZISTENCE BAKTERIÍ K ATB	22
2.3.1 Přirozená rezistence	23
2.3.2 Získaná rezistence	23
2.3.3 Mechanismy rezistence	25
Enzymatická inaktivace ATB	25
Změna cílové struktury	29
Snížení koncentrace ATB uvnitř buňky	29
3 CÍL PRÁCE	31
4 METODIKA	32
4.1 KVALITATIVNÍ METODY	32
4.1.1 Disková difúzní metoda	33
4.2 KVANTITATIVNÍ METODY	34
4.2.1 VITEK 2	34
4.2.2 E-test	35
4.2.3 Diluční metody	36
4.3 METODY SCREENINGU MECHANISMU REZISTENCE	37
4.3.1 Screeningový agar pro screening MRSA	37
4.3.2 Diskový difúzní test s cefoxitinem	37
4.3.3 Latex-aglutinační test MRSA-Screen	37

4.3.4 Screening produkce karbapenemas.....	38
4.3.5 Test KPC.....	39
4.3.6 Screeningový test produkce β -laktamas	40
4.3.7 Test DDST	41
4.4 KONTROLA KVALITY	42
4.5 ZÍSKÁNÍ POTŘEBNÝCH DAT	43
5 VÝSLEDKY	44
6 DISKUSE.....	50
7 ZÁVĚR.....	54
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	55
9 SEZNAM OBRÁZKŮ.....	60
10 SEZNAM TABULEK	61

Seznam symbolů a zkratek

AML – antimikrobní látka

AmpC – inducibilní β -laktamasa

ATB – antibiotikum

ESBL – širokospektré β -laktamasy (z angl. extended-spectrum beta-lactamases)

KPC – karbapenemasa produkovaná bakterií druhu *Klebsiella pneumoniae*
(z angl. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase)

MBL – metalo- β -laktamasy

MH – Müller-Hinton

MRSA – methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*

OXA – karbapenemasa

PBP – proteiny vážící penicilin (z angl. penicillin-binding proteins)

VRE – vankomycin-rezistentní enterokoky

1 Úvod

Během posledních 50 let se stala antibiotická rezistence vážným medicínským problémem v nemocnicích na celém světě. Rezistence na různé třídy antibiotik (ATB), včetně nedávno vyvinutých, byla zjištěna u téměř všech druhů gram-pozitivních a gram-negativních bakterií. (Inoue 1998, s. 502)

Screening kmenů vykazujících epidemiologicky významný mechanismus rezistence je v současných nemocničních zařízeních nezbytnou součástí léčebně preventivní péče. Umožňuje kontrolovat šíření rezistence v rámci daného zařízení.

Testování citlivosti bakterií k antimikrobním preparátům je významné pro správné zvolení cílené léčby. *„Cílená léčba vychází ze znalosti etiologického agens a jeho citlivosti k antibiotikům, má co nejužší spektrum a je selektivně zaměřena na prokazaného původce infekce. Je klinicky účinná, klinicky i epidemiologicky bezpečná a také nákladově efektivní.“* (Jindrák 2014, s.189) Používání nevhodných ATB způsobuje mnohem častěji vznik rezistentních kmenů. Navíc při předávání genetické informace mezi bakteriemi může dojít ke vzniku multirezistentních kmenů. (Inoue 1998, s. 502)

Význam epidemiologické bezpečnosti je v zabránění vzniku antimikrobiální rezistence a jejího šíření. ATB mohou postupně ztrácet svou účinnost a vést ke vzniku subpopulací odolných mikrobů. Tento fakt je významný nejen z hlediska komunitních nálezů, ale také nálezů nozokomiálních, kdy v nemocnicích je větší selekční tlak ATB a desinfekcí. (Jindrák 2014, s. 188) (von Nussbaum a kol. 2006)

2 Současný stav

Bakteriální rezistence je v současnosti jeden z palčivých problémů medicíny. Roste počet nově rezistentních bakterií a počet ATB, které už na jednotlivé druhy bakterií v důsledku rezistence nepůsobí. Mnoho původců infekcí v současné době odolává léčbě preparáty, které byly dříve účinné. Nejzávažnější jsou pak infekce způsobené multirezistentními mikroorganismy, pro které v současnosti neexistuje účinné ATB. Bakterie, jakožto živé organismy, se neustále dynamicky vyvíjejí. To přispívá k získání rezistence a odolání mechanismům účinku ATB. Rozvoj a šíření rezistence je podporován selekčním tlakem plošně podávaných ATB a to zejména mimo humánní medicínu – v zemědělství a veterinární medicíně. V EU se proto zavádějí programy pro restrikci používání AML v těchto oblastech. Ve zdravotnictví je nutno snažit se o co nejčasnější deeskalaci ze širokospektré preemptivní terapie na terapii cílenou. Cílená léčba vyžaduje průkaz původce infekce a preferenci ATB volby, což je nejlépe provedeno pomocí vyšetření citlivosti prokázaného původce infekce. (Urbášková 2012, s. B6)

EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) je dlouhodobý a první nezávislý projekt surveillance ATB rezistence invazivních izolátů bakterií na národní a Evropské úrovni. Data jsou sbírána z laboratoří v jednotlivých zemích s cílem shromažďovat srovnatelné a validní údaje o ATB rezistenci pro veřejné zdravotnictví a rychle identifikovat vznik nové ATB rezistence na území Evropy. Koordinaci EARS-Net zajišťuje ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (Státní zdravotní ústav, 2011)

Trendy v rezistenci gram-pozitivních bakterií: V České republice se provádí sledování rezistence komunitních respiračních a močových patogenů. Mezi komunitní gram-pozitivní patogeny patří pneumokoky, streptokoky a *Staphylococcus aureus* (MSSA i MRSA – methicilin citlivý i rezistentní) (respirační patogeny). Dle EARS-Net je rezistence *Streptococcus pneumoniae* k makrolidům ve většině zemí Evropy častější než rezistence k penicilinům. Počet izolátů *S. pneumoniae* rezistentních k penicilinům byl v roce 2014 v České republice na hodnotě 3 % z celkového počtu izolátů. Při působení makrolidů bylo rezistentní asi 7 % ze všech izolátů *S. pneumoniae*. Za posledních 15 let byl v České republice počet izolovaných rezistentních kmenů

S. pneumoniae kolísavý, stále ovšem došlo ke zvýšení. V roce 2000 byl výskyt rezistentních kmenů na našem území 0 až 1 %. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2015)

Dle SZÚ (Státní zdravotní ústav) vykazovalo v ČR v roce 2014 rezistenci k erytromycinu 6,7 % izolátů *Streptococcus pyogenes* a ke klindamycinu 4,1 % všech izolátů.

Dle studie EARS-Net se výskyt methicilin-rezistentního *Staphylococcus aureus* (MRSA) v ČR výrazně zvýšil za posledních 15 let. Největší nárůst byl mezi roky 2000 a 2005 kdy se procento výskytu rezistentních izolátů více než ztrojnásobilo. V posledních letech se situace stabilizovala - v roce 2014 se hodnota MRSA v České republice pohybovala kolem 13 % z celkového počtu invazivních izolátů (z hemokultur). Procento výskytu MRSA je významně odlišné v jednotlivých zemích Evropy v roce 2014. Hodnoty se pohybují mezi 1 % až 56 %, s nižšími hodnotami v severní Evropě a rostoucími směrem k jihu a jihovýchodu. Vysoký výskyt MRSA přitěžuje celkové klinické a ekonomické situaci v nemocnicích. Výsledkem jsou prodloužené pobyty pacientů a vyšší mortalita. Vyskytuje se jak MRSA komunitní, tak nemocniční a liší se v antibiogramu. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2015)

Vankomycin-rezistentní *Enterococcus faecalis* má v České republice nízké procento výskytu. Dle EARS-Net se kromě výrazného zvýšení v roce 2013 (4,1 %) množství rezistentních izolátů drží pod 1 %. U dalšího vankomycin-rezistentního enterokoka (VRE), *Enterococcus faecium*, se v posledních letech daří snižovat procento výskytu rezistentních izolátů. Od roku 2012 kleslo procento výskytu v České republice na třetinu. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2015)

Trendy v rezistenci gram-negativních bakterií: Mezi komunitní gram-negativní patogeny patří *Haemophilus influenzae* (respirační patogen) a *Escherichia coli* (močový patogen). Dle SZÚ bylo v ČR v roce 2014 až 16,5 % ze všech izolátů rezistentních k ampicilinu a 1,7 % bylo rezistentní k amoxicilinu v kombinaci s kyselinou klavulanovou. V roce 2011 byl dle SZÚ nárůst v počtu rezistentních izolátů *E. coli*. Rezistentní k ampicilinu bylo 43,4 % izolátů *E. coli*. (Státní zdravotní ústav, 2011)

Stále se snižující citlivost invazivních gram-negativních bakterií k několika klíčovým skupinám ATB je velice znepokojivá a ohrožuje bezpečnost pacientů. Vysoké procento výskytu producentů širokospektrých β -laktamas (ESBL) a multirezistentních gram-negativních bakterií je obzvláště znepokojivé, protože k léčbě závažných infekcí už zbývá málo alternativ. Výskyt rezistentních gram-negativních bakterií se zvýšil kvůli častějšímu používání karbapenemů, a to přispělo ke vzniku a rozšíření bakterií produkujících karbapenemázy. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2015)

Celkově, nejvíce znepokojivý trend v Evropě v roce 2014 byl spojený s výskytem rezistence u gram-negativních bakterií jako *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Acinetobacter* spp. U *E. coli* a *K. pneumoniae* byl zaznamenán souvislý růst rezistence ke klíčovým skupinám ATB. Dle EARS-Net byla většina izolátů rezistentní k alespoň jedné z testovaných skupin ATB. Mnoho izolátů vykazovalo kombinovanou rezistenci k cefalosporinům 3. generace, fluorochinolonům a aminoglykosidům. Během let 2010 až 2013 došlo k výraznému nárůstu rezistence k cefalosporinům 3. generace u *E. coli* a *K. pneumoniae* a mnoho z těchto kmenů bylo producenty ESBL a byly rezistentní i k dalším skupinám ATB. Navíc došlo ke zvýšení výskytu kombinované rezistence (kombinace ATB: fluorochinolony, cefalosporiny 3. generace a aminoglykosidy) a rezistence ke karbapenemům u *K. pneumoniae*. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2015) Rychlé šíření karbapenemas typu KPC je závažným problémem. Infekce způsobené kmeny, které produkují karbapenemasy, mají dost omezené možnosti léčby. Výjimkou nejsou ani kmeny zcela rezistentní ke všem dostupným ATB. To významně komplikuje léčbu pacienta a zvyšuje náklady nemocnic. (Carrère 2010) (Hrabák 2009)

2.1 Bakterie

Existence bakterií pravděpodobně začala před více než 3,5 miliardy let. Jsou prokaryotickými (jednobuněčnými) organismy s poměrně krátkou generační dobou a binárním dělením. Například generační doba *Escherichia coli* při vhodných podmínkách v laboratorním médiu je 20 – 30 minut. (Goering 2016, s. 17) Volně žijících bakterií je ohromně mnoho, ale jen poměrně malá část z nich je patogenní. Většina z těchto patogenních bakterií je dobře prostudována, ovšem objevují se stále

nové. Porozumění morfologii, stavbě, metabolickým procesům a funkcím bakterií je důležité pro účinnou ochranu před patogenními zástupci. (Goering 2016, s. 13)

2.1.1 Buněčná stěna

Primární strukturální vlastností bakterií je jejich buněčná stěna. Funkce buněčné stěny je pro bakterii nenahraditelná ve funkci podpory udržení morfologie bakterie. Hlavním komponentem buněčné stěny je peptidoglykan. Kdyby bakterii chyběla efektivně fungující buněčná stěna, byla by bakterie schopna přežít pouze v médiu o stejném osmotickém tlaku jako její vnitřní prostředí. Proteiny vážící penicilin (Penicillin-binding proteins, PBP) jsou skupina enzymů zodpovědná za sestavení, údržbu a řízení komponent peptidoglykanové struktury. Tyto proteiny jsou většinou zakotveny ve vnitřní bakteriální membráně s jejich aktivními místy natočenými do periplazmatického prostoru. Důvod, proč se tyto proteiny nazývají PBP, pochází z minulosti. Všechny tyto proteiny jsou kovalentně měněny peniciliny na jejich aktivních místech obsahujících zbytky serinu. (Massova 1998)

Peptidoglykan je složen z vrstev polysacharidových řetězců, které jsou navzájem napříč pospojované krátkými peptidy. Ve vrstvě peptidoglykanu jsou zakotvené polysacharidy a aminokyseliny, které mají silně nabitý polární postranní řetězec, a tím činí povrch bakterie silně hydrofilní. Hydrofilnost povrchu chrání gram-pozitivní bakterie například před účinkem žluči. Gram-negativní bakterie mají navíc nad tenkou vrstvou peptidoglykanu vnější membránu, ve které jsou obsaženy lipoproteiny, lipid A a lipopolysacharidy, které činí povrch bakterie hydrofobní. Aby mohly do bakterie vstupovat molekuly hydrofilní povahy (výživa složená z cukrů a aminokyselin) je transport zaručen pomocí speciálních kanálků složených z proteinů zvaných poriny. Úloha lipoproteinů ve vnější stěně gram-negativních bakterií je pevná vazba vnější stěny na vrstvu peptidoglykanu. Lipid A slouží k ukotvení podlouhlé molekuly lipopolysacharidu, ta vyčnívá nad vnější stěnu a je antigenní strukturou bakterie. Antigen O je specifický pro daný druh nebo serotyp bakterie svou vysokou variabilitou složením z různých sacharidů. Lipopolysacharid je zároveň endotoxinem, za většinu toxické aktivity je zodpovědná lipidová část lipid A. (Goering 2016, s. 14) (Votava 2005, s. 42)

Na povrchu, nad buněčnou stěnou, se může nacházet vrstva polysacharidů s velkou molekulovou hmotností tvořící slizovité pouzdro kolem bakterie, a je významným faktorem virulence. Příkladem může být *Streptococcus pneumoniae*, kdy infekce způsobené mikroblem s glykokalyx (pouzdrům) mívají těžký průběh, ovšem neopouzdrěné mutanty infekce nezpůsobují. Glykokalyx také chrání bakterii před fagocytózou imunitními buňkami hostitele. Další struktura, která se nachází nad buněčnou stěnou, je pilus. Pili slouží k navázání a udržení kontaktu dvou bakterií při konjugaci (sex pili) nebo s hostitelskou buňkou. (Goering 2016, s. 14)

Buněčná stěna je velmi pevnou strukturou, která odolá vysokému osmotickému tlaku a je zodpovědná za výsledný tvar bakterie. Znalost tvaru bakterií příslušných kmenů může být nápomocná při identifikaci. Zároveň poškození buněčné stěny, i ve formě ztenčení či porušení její komplexní struktury, vede k lýze a tedy smrti buňky.

Mezi buněčnou stěnou a cytoplasmatickou membránou se nachází periplasmatický prostor. Nachází se zde enzymy potřebné pro předběžné rozštěpení velkých molekul živin jako jsou aminokyseliny, oligosacharidy nebo krátké peptidy. Některé z těchto enzymů jsou schopny svou hydrolytickou aktivitou štěpit, a tím inaktivovat, ATB. (Goering 2016, s. 16)

2.1.2 Cytoplasmatická membrána

Cytoplasmatická membrána ohraničuje cytoplasmu se všemi organelami a živinami v ní rozpuštěnými a zastupuje řadu významných funkcí. Je složena z dvojité vrstvy fosfolipidů s vnořenými různými proteiny. Tyto proteiny se podílejí v procesu transportu živin do buňky a katabolitů a extracelulárních enzymů z buňky, v procesu respirace, v procesu syntézy složek jak membrány samotné, tak buněčné stěny a glykokalyxu. Cytoplasmatická membrána je i místem ukotvení bílkovin rotoru bakteriálního bičíku. Transport molekul do buňky se většinou uskutečňuje pomocí aktivního transportu, na který musí bakterie vynaložit energii, aby překonala sílu směru koncentračního spádu. (Votava 2005, s. 42)

2.1.3 Bakteriální genom

Genom, chápán jako soubor veškeré DNA daného organismu, je u bakterií ve formě nukleoidu (jaderného ekvivalentu) a DNA organel dědicích svou vlastní DNA

(plasmidy, mitochondrie, chloroplasty). Genetická informace může být kódována na bakteriálním chromosomu, který je primárním rezervoárem genetické informace, nebo také na mobilních genetických elementech. Tyto elementy, kterými jsou plasmidy a bakteriofágy, jsou schopny přenášet genetickou informaci mezi bakteriemi. (Goering 2016, s. 22)

„*Plasmidy jsou nezávislé, samostatně se replikující, cirkulární dvojřetězcové DNA.*“ (Goering 2016, s. 22) Mají různou velikost, replikují se různými způsoby a počet jejich kopií v buňce se liší podle druhu plasmidu. Zpravidla lze říct, že kopií malých plasmidů je více. Plasmidy nejsou schopny replikace ve všech druzích bakterií, ale některé plasmidy mají rozšířené hostitelské spektrum. Kromě genů pro replikaci mohou obsahovat *tra* geny usnadňující výměnu mezi bakteriemi. Genetické informace přenášené plasmidy obvykle obsahují fenotypovou výhodu pro hostitelskou bakterii, protože tak mají větší pravděpodobnost přijetí. Takovou výhodou může být gen pro rezistenci k antimikrobiálním látkám (AML), přítomný na konjugativním plasmidu R, nebo gen kódující toxiny a jiné bílkoviny zvyšující virulenci bakterie. Předání genetické informace plasmidovou DNA probíhá procesem konjugace, kdy se bakterie spojí pomocí sex-specifické pili. (Goering 2016, s. 23)

Bakteriofágy jsou viry bakterií. Mohou existovat uvnitř i mimo bakterii a na rozdíl od plasmidů často způsobují destrukci hostitelské bakterie. Uvnitř bílkovinné kapsidy obsahují nukleovou kyselinu, kterou infikuje bakterii. Bakterie poté začne replikovat virovou DNA a proteiny zatímco o svůj chromosom přijde vlivem destrukce. Tento způsob infekce praktikuje virulentní lytický bakteriofág. Dochází k destrukci hostitelské bakterie a vyplavení značného množství kopií viru. Případně může dojít k integraci virové DNA do bakteriálního chromosomu, ten se pak replikuje i s novým vloženým úsekem, a tak je pasivně přenášen. Takto se chová mírný bakteriofág, procesem lyzogenie. Výsledkem je dočasně přežívající bakterie. Přesto oba typy bakteriofágů způsobují lýzu hostitelské bakterie a díky této skutečnosti se v současné době spekuluje nad využitím bakteriofágů jako přirozených antimikrobiálních agens. Bakteriofágové také mají schopnost zabudovat část bakteriální DNA do své DNA a při infekci následující bakterie tuto část DNA přenést na nového hostitele. Tak probíhá proces transdukce. (Goering 2016, s. 24) (Schindler 2014, s. 32)

Genotyp je soubor vlastností charakterizující danou bakterii, které zdělila od mateřské buňky. Genotyp může mutovat (měnit nukleotidovou sekvenci) a tím měnit vlastnosti bakterie. Mutace mohou vznikat jak spontánně tak indukovaně. Vznik genu pro rezistenci může být způsoben mutací oběma způsoby. V každé bakteriální populaci se vyskytuje několik mutant každé vlastnosti. Bakterie navíc umí regulovat expresi genů a tak dokáží optimálně využít podmínky prostředí. (Schindler 2014, s. 32) (Goering 2016, s. 33)

Genetická informace je uložena ve formě sekvence nukleotidů dlouhé dvouřetězcové cirkulární molekule DNA. Ribosomy, označovány jako 70S u prokaryot, hrají významnou roli v procesu proteosyntézy. Svedbergova jednotka S vyjadřuje sedimentační koeficient makromolekul (ribosomů a jejich podjednotek) při stanovení velikosti molekul pomocí ultracentrifugy. Ribosomy jsou cílovou strukturou působení ATB ze skupiny aminoglykosidů.

2.2 Antimikrobiální látky

AML všeobecně působí proti mikroorganismům a toto označení zahrnuje ATB, chemoterapeutika, virostatika, antivirotika, antimykotika a další. V léčbě bakteriálních infekcí se využívají ATB a chemoterapeutika rozdělovány podle původu na přírodní (ATB) a syntetická (chemoterapeutika). AML se liší svou chemickou povahou, původem, mechanismem účinku a způsobem použití. Na základě těchto vlastností lze AML rozdělit na β -laktamy, glykopeptidy, aminoglykosidy, linkosamidy, polypeptidy, chinolony, fluorochinolony, makrolidy, tetracykliny, chloramfenikoly, azalidy, chemoterapeutika, antituberkulotika a antimykotika. (Julák 2006, s. 103) Zpravidla se ale AML klasifikují podle (1) toho, zda je jejich účinek bakteriostatický nebo baktericidní, podle (2) místa účinku, nebo podle (3) chemické struktury. (Goering 2016, s. 462)

Mnohé z AML mají mikrobiální původ, jsou často produkovány plísněmi, zejména streptomycety, případně pak bakteriemi. Často jsou chemicky modifikovány, pro zlepšení jejich antibakteriálních a farmakologických vlastností, nebo zcela vyrobeny synteticky (např. sulfonamidy nebo chinolony). V případě, že je AML připravena pouze chemicky jedná se o chemoterapeutikum. (Votava 2005, s. 235) Dává se přednost

pojmu antimikrobiální nebo antimikrobní látky jelikož zahrnují všechny látky, které inhibují růst nebo ničí mikroorganismy. (Goering 2016, s. 461)

Účinek AML může být baktericidní nebo bakteriostatický. Baktericidní účinek znamená rychlé usmrcení mikroorganismu zatímco bakteriostatický účinek způsobí zastavení růstu eventuálně množení mikroorganismu. Daný mikroorganismus není bakteriostatickým účinkem usmrcen a může tedy po vysazení AML znovu zahájit množení. (Julák 2006, s. 105) Baktericidní účinek je irreverzibilní a působí rychleji. Klinický účinek lze pozorovat obvykle do 48 hodin. (Votava 2005, s. 235)

Stupeň účinku dané AML závisí na její povaze (cidní nebo statické působení), citlivosti mikroorganismu, koncentraci a době působení dané AML. Některé AML působí cidně jen na některé druhy bakterií, na ostatní působí statickým účinkem. Příkladem může být působení chloramfenikolu na *Escherichia coli*, kdy dojde k inhibici růstu, zatímco *Haemophilus influenzae* usmrcuje. (Goering 2016, s. 463) Pro praktické účely jsou tyto vlastnosti shrnuty ve stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC), tedy nejmenší koncentrace AML, při které není možné množení dané bakterie, a minimální baktericidní koncentrace (MBC), tedy nejmenší koncentrace AML, při které daná bakterie umírá. (Julák 2006, s. 105)

Cílové struktury působení AML se více či méně liší od cílů v hostitelských buňkách. Tato skutečnost umožňuje inhibici buněk bakterií a zároveň ochranu před působením AML na ekvivalentní hostitelské buněčné cíle (selektivní toxicita). (Goering 2016, s. 463)

Podmínkou pro použití AML jako léčiv je jejich selektivní toxicita pro daného mikroba. Podaná dávka by měla mikroba usmrtit nebo alespoň inhibovat bez poškození makroorganismu. Poměr mezi dávkou, která je toxická pro makroorganismus a dávkou, která je účinná na mikroba, se nazývá chemoterapeutický index. Vyjadřuje selektivní toxicitu tak, že čím je hodnota indexu vyšší, tím je AML pro makroorganismus méně toxická. S klesající toxicitou se otevírá možnost použití AML systémově a nejen místně. (Votava 2005, s. 235) Selektivní toxicita je výsledkem rozdílu mezi metabolismy mikroba a hostitelských buněk. V ideálním případě nepůsobí AML na buňky makroorganismu, ale selektivně ovlivňují specifické procesy mikroorganismů. Takového účinku se dosahuje snadněji u mikroorganismů prokaryotních vzhledem

k odlišnosti od hostitele (eukaryotního organismu). (Goering 2016, s. 461) (Hynie a kol. 1996, s. 315)

Chemická struktura AML je velice rozmanitá a klasifikace pouze na jejím základě by byla nepraktická. Ovšem v kombinaci s cílovou strukturou poskytne vhodnou pracovní klasifikaci. (1) Inhibitory buněčné stěny: β -laktamy a glykopeptidy (2) Inhibitory syntézy bílkovin: aminoglykosidy, tetracykliny, chloramfenikol, makrolidy, linkosamidy, oxazolidinony a fusidová kyselina (3) Inhibitory syntézy nukleových kyselin: chinolony, rifamyciny (4) Antimetabolity ovlivňující syntézu nukleových kyselin: sulfonamidy, trimethoprim (5) Inhibitory funkce cytoplasmatické membrány: lipopeptidy, polymyxiny

2.2.1 Mechanismy účinku AML

Mechanismus účinku AML se liší na základě rozdílnosti skladby a velikosti molekul AML. Shoduje-li se základní struktura ATB, shoduje se i mechanismus účinku. Cílovou strukturou nazýváme citlivé místo buňky, kde se AML váže a zabraňuje funkci a návazným pochodům. Více než polovina užívaných ATB působí na buněčnou stěnu bakterie. Zhruba čtvrtina ATB inhibuje syntézu bílkovin. Mnohé interferují se syntézou DNA a zabraňují replikaci bakteriálního chromozomu, čímž zabraňují i množení buněk. (Schindler 2014, s. 52)

Podle mechanismu účinku lze AML rozdělit do několika skupin: (1) Inhibitory syntézy bakteriální stěny. (2) Inhibitory cytoplasmatické membrány. (3) Inhibitory syntézy nukleových kyselin. (4) Inhibitory funkce ribosomů. (5) Inhibitory funkce kyseliny listové. (Julák 2006, s. 106)

Inhibice syntézy buněčné stěny

Proces syntézy buněčné stěny může být ovlivněn pěti skupinami ATB, z nichž nejvýznamnější jsou β -laktamy a glykopeptidy. Stěnový peptidoglykan je syntetizován ve třech stupních a v každém tomto stupni může být proces syntézy ovlivněn jiným ATB. V prvním stupni se syntetizují nízkomolekulární prekurzory a dipeptidy a tripeptidy, tato syntéza může být inhibována ATB fosfomycinem. Ve druhém stupni dochází k přenosu prekurzorů přes membránu za katalýzy enzymy. Tento stupeň může být inhibován polypeptidovým ATB. V případě, že prekurzory projdou membránou

může dojít k inhibici tvorbou komplexů jejich C-terminálního D-alaninu s glykopeptidovým ATB např. vankomycinem. V posledním, třetím, stupni dochází ke konečné polymerizaci a připojení nově syntetizovaného peptidoglykanu ke stěně pomocí enzymů transpeptidáz. Transpeptidázy patří mezi PBP a tak mohou být inhibovány β -laktamovými ATB. Bakterie s narušenou buněčnou stěnou podléhá lýze. (Julák 2006, s. 106) (Schindler 2014, s. 53) (Johnson 2013)

Různé skupiny bakterií obsahují různé PBP. β -laktamová ATB mají rozdílný účinek u gram-pozitivních, gram-negativních i u anaerobních bakterií. Na základě povahy PBP je určena povaha morfologických změn bakterií při působení ATB. Pokud se ATB naváže na enzym účastnící se tvorby septa při dělení bakterií, enzym nepracuje správně a nedojde k rozdělení dceřiných buněk. Vzniká dlouhá vláknitá forma bakterie, která následně umírá. Při vazbě ATB na jiný PBP vzniká výduť bakteriální stěny a buňka lyzuje. Při inhibici jednoho i více enzymů převádějících jednotky prekurzorů buněčné stěny přes membránu dojde k akumulaci těchto prekurzorů. Dochází tak k aktivaci autolytického systému a buňka lyzuje. (Julák 2006, s. 106) (Goering 2016, s. 466)

β -laktamová ATB jsou nejvýznamnější a největší skupinou látek působících proti syntéze buněčné stěny. Obsahují β -laktamový kruh a některé podskupiny se vyznačují strukturou kruhu, který je připojený k β -laktamovému kruhu, a postranními řetězci připojenými k těmto kruhům. Konkrétně u penicilinu jde o pětičlenný kruh, u cefalosporinů o šestičlenný. (Goering 2016, s. 466)

Glykopeptidy jsou další významnou skupinou. Působí pouze proti gram-pozitivním mikroorganismům, na gram-negativní zpravidla nepůsobí. Základním glykopeptidovým ATB je vankomycin, jehož hlavní využití je při léčbě infekcí způsobených rezistentními stafylokoky, zejména multirezistentní *Staphylococcus aureus* a *S. epidermidis*. (Goering 2016, s. 466) (Julák 2006, s. 113)

Inhibice cytoplasmatické membrány

Cytoplasmatická membrána má úlohu difúzní bariéry pro vodu, ionty a živiny a umožňuje jejich transport mezi prostředími, které membrána odděluje. Pokud dojde k dezorganizaci membrány, dojde k poruše její permeability a tím k volnému pohybu vody, iontů i živin následovaném smrtí buňky. ATB jsou kationtové, aniontové nebo

neutrální povahy, jsou membránově aktivní a způsobují tvorbu pórů v membráně. Využívají se zejména ATB polypeptidová, např. polymyxin B je nejběžnější zástupcem s klinickým použitím. Kvůli obavám z nedostatku účinných ATB pro léčbu infekcí způsobených gram-negativními bakteriemi s mnohočetnou rezistencí se obnovil zájem o kombinovanou léčbu polymyxin/kolistin. (Julák 2006, s. 107) (Goering 2016, s. 484) (Hynie 2001, s. 40)

Novou třídou ATB působících na cytoplasmatickou membránu jsou lipopeptidy. Zástupcem této skupiny je daptomycin s baktericidním účinkem proti řadě gram-pozitivních bakterií a dokonce i vankomycin-rezistentních kmenů *Enterococcus faecalis* a *E. faecium* a methicilin-rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* a *S. epidermidis*. Zároveň je rezistence proti daptomycinu v současnosti vzácná. (Goering 2016, s. 484)

Inhibice syntézy nukleových kyselin

AML mohou inhibovat syntézu nukleových kyselin v různých fázích průběhu. Ve fázi syntézy purinových a pyrimidinových nukleotidů (působením analogů nukleových bazí a nukleosidů), fázi rozplétání dvouřetězcové DNA nebo interferují s polymerasami (působením skupiny chinolonů). Mohou způsobit rozlomení a destrukci řetězců DNA (působením imidazolů). AML mohou také bránit templátové funkci DNA, tím, že tvoří s DNA intrusivní sloučeniny. (Julák 2006, s. 107) (Schindler 2014, s. 53)

Inhibice funkce ribosomů

Navázáním AML na podjednotky ribosomů mohou narušit proces proteosyntézy. Různé skupiny ATB se vážou na jiná místa ribosomu. Aminoglykosidy se vážou na 16S rRNA menší ribosomální podjednotky. Makrolidy pak na větší podjednotku ribosomu. K tomuto typu inhibice dochází částečně i v lidských buňkách. Kromě inhibice samotné syntézy bílkovin mohou použité AML interferovat s molekulami m-RNA nebo t-RNA. (Julák 2006, s. 107) (Schindler 2014, s. 53) (Cattoir 2016)

Inhibice metabolismu kyseliny listové

Všechny buňky, jak prokaryotické, tak eukaryotické, potřebují redukované foláty jako kofaktory enzymů při biosyntéze rozsáhlého spektra buněčných komponent. Tetrahydrofolát slouží jako donor jednonukleotidové jednotky v řadě biosyntetických

procesů zahrnujících vznik methioninu, purinů a thyminu. Zatímco požadavek na přítomnost folátů v buňkách je univerzální, způsob získávání folátů u prokaryot a eukaryot se liší. Savci vlastní aktivní transportní systém využívající na membránu vázané proteiny určené k transportu folátů. Vzhledem k neschopnosti rostlin a většiny mikroorganismů přijímat kyselinu listovou ze svého okolí, musí foláty syntetizovat *de novo*. Právě tento rozdíl mezi savci a mnoha patogeními mikroorganismy činí biosyntézu folátů vhodným cílem pro působení AML (např. sulfonamidů). Inhibice metabolismu kyseliny listové sekundárně působí na syntézu nukleových kyselin. (Bermingham 2002, s. 637) (Bednář a kol. 1996, s. 168)

Kombinovaný účinek AML

Ideálně pro léčbu stačí pouze jeden přípravek AML, který je vhodný pro účinné zahubení daného mikroba bez ohrožení pacienta. Za jistých okolností je ovšem vhodné použít kombinaci ATB: (1) pro zajištění synergického účinku (zesílení), (2) pro zabránění nebo zpomalení vzniku perzistentních mikrobů, např. při léčbě tuberkulózy, (3) při léčbě polymikrobiálních infekcí, při kterých jsou různí mikrobi rozdílně citliví, (4) při rychlém nasazení léčby u život ohrožujících stavů, kdy není možné čekat na laboratorní identifikaci infekčního agens, např. při sepsi. (Goering 2016, s. 488)

Znalost mechanismu účinku jednotlivých ATB je nutná nejen kvůli synergii, ale i kvůli zabránění antagonistickému účinku. Účinek kombinace ATB lze určit pomocí difúzní zkoušky nebo zkouškou ředěním. Zkoušky *in vitro* ovšem nemusí odpovídat účinkům *in vivo*, potažmo je náročnější účinky potvrdit. Synergii lze snadno prokázat při zkoušce *in vitro*, je ale obtížné ji potvrdit *in vivo* v těle pacienta. Antagonismus lze jen zřídka potvrdit *in vivo*. (Goering 2016, s. 488)

2.3 Rezistence bakterií k ATB

Rezistence bakterií k ATB je výsledkem evoluce, vývojového procesu. Ve snaze o přežití vznikly u prokaryot obranné mechanismy proti působení škodlivých látek v jejich prostředí. Vzhledem k jednoduchosti a dynamičnosti prokaryotního organismu netrvá vývoj obranných genetických a fenotypových znaků rozdílného charakteru příliš dlouho. Množina těchto genů, které chrání bakterie před účinky podávaného ATB, se nazývá rezistom. (Schindler 2014, s. 54)

2.3.1 Přirozená rezistence

Rezistenci lze rozlišit z hlediska původu na přirozenou (primární) a získanou (sekundární). Přirozená rezistence vyplývá z morfologie a funkce buňky. Například když chybí cílová struktura pro působení ATB (jako úplná absence buněčné stěny u *Mycoplasma* znemožňuje působení β -laktamů), když buňka nemá transportní systém, kterým by přenesla ATB do nitra buňky, nebo když je buněčná stěna pro ATB nepropustná (například kvůli shodnému náboji ATB a povrchu buněčné stěny nebo kvůli velikosti molekuly ATB). (Schindler 2014, s. 54)

Jelikož β -laktamy mají jako cílovou strukturu buněčnou stěnu, je přirozeně rezistentní ten druh mikroorganismu, který buněčnou stěnu nemá (*Mycoplasma*), nebo který má buněčnou stěnu vysoce nepropustnou (mykobakterie a intracelulární patogeny jako *Brucella* nebo *Legionella*).

Případem přirozené rezistence může být i neschopnost ATB proniknout buněčnou stěnou kvůli jeho fyzikálním vlastnostem. Například kvůli velikosti molekul ATB, jako je tomu u glykopeptidů. Glykopeptidy nemohou účinně pronikat vnější membránou do peptidoglykanu gram-negativních bakterií, protože jejich molekuly jsou příliš velké. (Goering 2016, s. 471)

Cefalosporiny mají negativní náboj stejně jako buněčná stěna díky lipopolysacharidům a různým karboxylovým kyselinám zabudovým v její struktuře. Proto je pro cefalosporiny obtížné dosáhnout buněčné stěny. Gram-pozitivní bakterie mají ve struktuře své buněčné stěny silnou vrstvu peptidoglykanu, jehož molekuly jsou navzájem pospojovány jako síť. U některých druhů bakterií je tato síť volnější a ATB tedy mohou poměrně snadno pronikat touto sítí a problém nepropustnosti stěny gram-pozitivních bakterií pro ATB neexistuje. Další významnou roli v určování propustnosti membrány hraje hydrofilita molekul ATB. Vzhledem k faktu, že buněčná stěna je lipofilního charakteru mají hydrofilní ATB potíže s proniknutím do vnitřního prostředí. (Inoue 1998, s. 503)

2.3.2 Získaná rezistence

Sekundární rezistence je získaná, ať už mutací stávajících genů nebo přijutím genu nového od druhé bakterie. Během dělení buněk dochází spontánně

k chromosomovým mutacím. K přenosu genu rezistence dochází pomocí plasmidu, transpozonů nebo přenosem genových kaset. K šíření rezistence přispívá selekční tlak ATB. Selekční tlak ATB způsobuje potlačení té části populace bakterií, která je citlivá, a díky tomu se rezistentní buňky mohou bez zábran množit. Vzniká tak rezistentní populace a rezistence se může přenášet v rámci generace nebo na potomstvo. (Schindler 2014, s. 55) (Julák 2006, s. 119)

Bakterie mohou předávat svou genetickou informaci třemi mechanismy. (1) Konjugací, kdy dojde k přenosu molekuly DNA mezi donorovou a recipientní bakterií. Bakterie musí být v těsném kontaktu, ten je zajištěn pomocí pili na povrchu buněk nebo adherinů. (2) Transformace, kdy bakterie pohltí volnou nukleovou kyselinu z prostředí a následně ji začlení do svého genomu. (3) Transdukce, kdy dojde k přenosu genetické informace o rezistenci jako součásti nukleové kyseliny bakteriofága infikujícího bakterii. (Urbášková 2012, s. B6)

Konjugaci se přikládá největší význam v šíření genů ATB rezistence. Je to z důvodu větší pravděpodobnosti uskutečnění, protože poskytuje lepší ochranu před okolím a také zvyšuje pravděpodobnost přijetí nového genu recipientní bakterií. Konjugace je v přírodě běžným způsobem přenosu genetické informace a nejčastěji je přenos uskutečněn pomocí plasmidů. Přítomnost nového plasmidu je pro bakterii energetická zátěž a tak se ho sama zbavuje, což způsobí vyředění plasmidů z populace v průběhu reprodukce. Důležitá je přítomnost *tra* genů, protože zodpovídají za tvorbu sex pili a následně konjugačního můstku. (von Wintersdorff 2016) (Schindler 2014, s. 56) (Porton a kol. 2011)

Při pokusech bakteriolog Frederick Griffith zaznamenal, že určité bakterie se zdály být schopny přijetí, začlenění a funkční exprese fragmentů volné DNA, proces nazvaný transformace. Aby se tento proces mohl uskutečnit musí být splněno několik podmínek. Musí být přítomna volná nukleová kyselina v extracelulárním prostředí, recipientní bakterie musí být schopna tuto DNA přijmout a daná DNA musí být po pohlcení stabilizována. Stabilizace může proběhnout buď začleněním do genomu recipientní bakterie nebo recirkulací. (von Wintersdorff 2016) (Thomas 2005)

Pomocí transdukce mohou bakteriofágy přenášet své geny, které jsou výhodné pro hostitelské bakterie, a zároveň podpořit vlastní přežití a rozmnožení. To přiděluje

bakteriofágům velký význam v tvarování mikrobiomu v kterémkoliv prostředí. (Modi 2013)

Přenášení rezistence z rodičovské generace na potomstvo se nazývá vertikální přenos rezistence. Přenos genů podmiňujících rezistenci v rámci jedné generační vrstvy se nazývá horizontální přenos. (Schindler 2014, s. 55)

2.3.3 Mechanismy rezistence

Mikroby dosahují rezistence třemi způsoby: (1) Enzymatická inaktivace ATB, (2) Změna cílové struktury, receptorů nebo metabolické dráhy, (3) Snížení koncentrace ATB uvnitř buňky mechanismy: zhoršení průniku ATB do buňky nebo aktivní exkrece. (Julák 2006, s. 120)

Enzymatická inaktivace ATB

Bakterie produkují vlastní enzymy, které modifikují nebo rozkládají ATB. Příkladem může být produkce β -laktamasy, jejichž substrátem je β -laktamový kruh. Po otevření β -laktamového kruhu se penicilin mění na neúčinnou kyselinu penicilinovou a ATB se nemůže navázat na cílovou strukturu, kterou jsou PBP. Zcela tedy inaktivují penicilin a cefalosporiny. β -laktamasy jsou enzymy schopné hydrolyzovat amidy, amidiny a jiné vazby mezi atomem dusíku a uhlíku. (Kolář 2002)

Enzymy mohou být vylučovány do okolí jako exoenzymy (u gram-pozitivních bakterií) nebo vázány v periplasmatickém prostoru (u gram-negativních bakterií), kde účinně chrání PBP. Hojné využívání β -laktamů zapříčinilo postupný vznik desítek β -laktamů až se v 70. letech 20. století objevily širokospektré β -laktamasy (ESBL). Ty štěpí široké spektrum β -laktamových ATB včetně cefalosporinů 3. generace a monobaktamu. K přenosu genů pro β -laktamasy se uskutečňuje pomocí plasmidů a nové druhy vznikají bodovými mutacemi. β -laktamasy indetifikujeme podle substrátu, např. penicilinasy, cefalosporinasy, karbapenemasy. (Jarlier 1988) (Schindler 2014, s. 57)

Schéma funkční klasifikace bylo navrženo Karen Bush v roce 1989 a rozšířeno 1995. Byly přidány nové podskupiny jako výsledek identifikace a rozšíření hlavních β -laktamových rodin. Klasifikace dle Bush je založena na preferenci substrátu a citlivosti k inhibitorům. Toto členění je pouze fenotypové. Při vzniku bodových

mutací se může fenotypový projev měnit, tím dojde ke změně substrátové specifity a citlivosti k ATB, a změní se tedy i zařazení do skupiny. V současné době se používají dva klasifikační systémy pro β -laktamasy: třídy a skupiny. (Kolář 2002)

Třídy:

Molekulární klasifikace je založena na sekvenci aminokyselin a dělí β -laktamasy do tříd dle Amblera. Při rozčlenění β -laktamas do tříd se bere ohled na charakter substrátů a inhibitorů, tak, aby výsledné třídy korelovaly s fenotypem klinických izolátů. (Bush 2010)

Karbapenemasy jsou β -laktamasy s mnohostrannými hydrolytickými schopnostmi. Představují nejvíce všestrannou rodinu β -laktamas. Jsou schopny hydrolizovat peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy. Mnoho z těchto enzymů je schopno hydrolyzovat téměř všechny hydrolyzovatelné β -laktamy a zároveň jsou odolné proti všem komerčně dostupným inhibitorům β -laktamas. Bakterie produkující karbapenemasy mohou způsobit závažná onemocnění, při kterých aktivita těchto enzymů činí β -laktamy neúčinnými. Karbapenemasy spadají do tříd A, B a D. Skupina karbapenemas třídy A zahrnuje další rodiny enzymů včetně převládající rodiny KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), nalézanou většinou na plasmidech *Klebsiella pneumoniae*. Třída D obsahuje β -laktamasy typu OXA, často detekované u *Acinetobacter baumannii*. (Queenan 2007) (Nordmann 2002)

Třída A: Enzymy této třídy jsou převážně určeny k rychlé deacylaci (hydrolyze) β -laktamů. Kódovány jsou většinou plasmidy (výjimkou jsou bakterie *Klebsiella* sp., *Proteus vulgaris*, *Bacteroides* sp., u kterých jsou chromosomálně kódované). Producenty jsou gram-pozitivní i gram-negativní bakterie. Nejčastějšími enzymy čeledi *Enterobacteriaceae* jsou TEM 1 a SHV 1. Pokud dojde k mutaci těchto původních enzymů dojde k produkci ESBL a jejich následnému rozšíření. V současné terapeutické praxi je šíření ESBL závažným problémem. (Kolář 2002)

Třída B: Enzymy třídy B účinkují na karbapenemy. Rezistence je rozšířena i na ostatní β -laktamy, kromě monobaktamů, a účinek těchto enzymů není reverzibilní účinkem inhibitorů. Jsou kódovány na plasmidech a jsou transferabilní. Enzym IMP 1 je produkován bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. (Kolář 2002)

Třída C: Obsahuje β -laktamasy typu AmpC, které jsou rezistentní k cefalosporinům 1. a 2. generace a k širokospektrým penicilinům. Jsou kódovány na chromosomu. Při spontánní mutaci genu ampR dojde k inhibici represorových molekul, které tlumí expresi genu ampC, a dochází ke kontinuální nadprodukci molekul AmpC. Tím vzniká rezistence k cefalosporinům 3. generace. Účinek enzymů je obvykle nereverzibilní inhibitory. Odolnými jsou karbapenemy (jmenovitě imipenem, meropenem) a cefalosporiny 4. generace (cefepim, cefpirom). (Kolář 2002)

Třída D: Obsahuje β -laktamasy typu OXA, které jsou kódované na plasmidech. Jsou produkovány některými enterobakteriemi. (Kolář 2002)

Třídy A, C a D využívají reaktivní serinové reziduum v aktivním místě k zformování acyl-enzymu a zhydrolyzování substrátu. Třída B zaštiťuje metalo-enzymy, které obsahují ve svém aktivním místě alespoň jeden ion zinku spolu s rezidui histidinu a/nebo cysteinu. (Bush 2010)

Skupiny:

Enzymy jsou spojovány do skupin na základě jejich schopnosti hydrolyzovat určité třídy β -laktamů a inaktivovat nástroje inhibice β -laktamas – klavulanová kyselina, sulbaktam a tazobaktam. V zásadě spolu skupiny a třídy korelují. (Bush 2010)

Skupina 1: Cefalosporinasy, patří do molekulární třídy C a jsou zakódovány na chromosomech mnoha enterobakterií. Jsou více aktivní při působení cefalosporinů než benzylpenicilinu a jsou obvykle rezistentní k inhibici kyselinou klavulanovou. Mají vysokou afinitu k aztreonamu na rozdíl od třídy A cefalosporinů. U mnoha organismů, včetně *Enterobacter cloacae* a *Pseudomonas aeruginosa*, exprese AmpC je nízká, ale vyvolatelná při vystavení bakterií určitým β -laktamům, jako amoxicilin, ampicilin, imipenem a klavulanová kyselina. Pokud jsou cefalosporinasy produkovány ve velkých množstvích může vznikat rezistence vůči karbapenemům, zvláště pak ertapenemu. (Bush 2010)

Skupina 2: Serinové β -laktamasy, zahrnující třídy A a D, představují nejrozsáhlejší skupinu β -laktamas. Tyto enzymy preferují hydrolyzu benzylpenicilinu a mnoha penicilinových derivátů. Naopak špatně hydrolyzují cefalosporiny, karbapenemy a monobaktamy. Většina je kódována na chromosomu, výjimkou jsou stafylokokové penicilinasy, které jsou kódované na plasmidu. Skupina 2 je rozdělena na 8 podskupin

podle substrátové specifity. Podskupina 2be je tvořena enzymy se širokým spektrem, aktivními proti penicilinům a cefalosporinům (stejně jako podskupina 2b) a navíc umí hydrolyzovat jednu nebo více oxyimino- β -laktamů, jako cefotaxim, ceftazidim a aztreonam. Stále jsou ovšem inhibovány klavulanovou kyselinou, čehož se využívá při detekci v klinické laboratoři. Podskupina 2ce obsahuje širokospektré karbeniciliny. (Bush 2010)

Skupina 3: Metalo- β -laktamasy (MBL) jsou unikátní skupinou β -laktamů jak strukturně, tak funkčně. Obvykle jsou produkovány společně s druhou nebo třetí skupinou. Liší se od zbylých β -laktamů svým požadavkem na přítomnost zinkového iontu v aktivním místě enzymu. Dříve byly rozpoznatelné díky jejich schopnosti hydrolyzovat karbapenemy, ale nyní mají tuto schopnost i některé serinové β -laktamasy. Na rozdíl od serinových β -laktamů mají MBL malou afinitu a hydrolytickou schopnost vůči monobaktamům a nejsou inhibovány kyselinou klavulanovou ani tazobaktamem. Jsou inhibovány ionty kovů chelatačních činidel jako EDTA. Původně se geny pro MBL vyskytovaly na chromosomu. Od doby co se geny pro MBL objevily na vyměnitelných (mobilních) buněčných elementech, začaly se díky evolučnímu tlaku objevovat v mnoha druzích hostitelů. Výsledkem jsou enzymové rodiny s několika tucty unikátních variant. Podskupina 3b obsahuje menší množství MBL, které přednostně hydrolyzují karbapenemy oproti penicilinům a cefalosporinům. Nejúčinnější hydrolyza karbapenemů probíhá, pokud je zinkovým iontem obsazeno pouze jedno vazebné místo enzymu. Pokud je obsazeno i druhé vazebné místo dochází k inhibici aktivity enzymu. Toto chování enzymu je kontrastní k ostatním podskupinám MBL. (Bush 2010)

V současnosti se ze systému vynechává skupina 4, která byla v dřívější klasifikaci zmiňována. Enzymy, které do této skupiny spadaly, budou pravděpodobně zařazeny do jedné z předchozích až budou zcela charakterizovány. (Bush 2010)

Dalším příkladem enzymatické inaktivace ATB může být rozklad chloramfenikolu pomocí acetyltransferasy, nebo rozklad aminoglykosidů pomocí acetyltransferas, fosfotransferas a nukleotidyltransferas. (Julák 2006, s 120)

Změna cílové struktury

Pokud nemají na bakterii působit ATB působící na buněčnou stěnu, musí dojít ke změně PBP. Je tomu tak například u penicilin-rezistentních kmenů *Streptococcus pneumoniae*. Jejich PBP mají změněnou strukturu a penicilin se na ně obtížně váže. Dalším významným příkladem je methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), který syntetizuje PBP typu 2a, který má mnohem nižší afinitu k β -laktamům, a tak může tento enzym pokračovat v syntéze. Mimo methicilin je navíc rezistentní ke všem penicilinům, cefalosporinům a karbapenemům. (Julák 2006, s. 120)

Bakterie se také chrání specifickou methylací RNA a znemožňují tak navázání ATB. Tento mechanismus se uplatňuje při rezistenci na erytromycin nebo linkomycin. Může docházet i ke změně struktury DNA-gyrasy a tak opět zabránění vazbě ATB. (Julák 2006)

Snížení koncentrace ATB uvnitř buňky

Za účelem snížení koncentrace ATB uvnitř buňky se bakterie snaží o snížení propustnosti buněčné stěny nebo využívá systém aktivního vypuzení ATB. Míra propustnosti buněčné stěny závisí od jejího charakteru a charakteru ATB. Nepolární ATB mohou být odražena při průchodu polární lipidovou dvojvrstvou zvýšením hustoty polárních polysacharidových řetězců lipopolysacharidů. Polární ATB jsou vpouštěna do buňky přes poriny. Snížením počtu porinů nebo jejich propustnosti může buňka snížit koncentraci ATB uvnitř. Příkladem může být rezistence některých enterobakterií nebo *Pseudomonas aeruginosa* k aminoglykosidům prostřednictvím změny vlastností porinů. (Julák 2006, s. 120)

Aktivní vypuzení ATB pomocí efluxních pump je pro bakterii energeticky náročné. Efluxní pumpy mohou být substrátově specifické nebo mohou přenášet spektrum strukturně nepodobných látek, včetně ATB různých tříd. Takové pumpy jsou spojovány s multirezistencí. Geny pro efluxní pumpy jsou přítomny jak v citlivých, tak i v rezistentních bakteriích. V některých případech může být systém pump indukován substrátem. Dříve citlivá bakterie vytváří nadprodukcí pump a stává se rezistentní. To se může stát dvěma způsoby, buď (1) je zvýšena exprese bílkoviny efluxní pumpy nebo (2) v dané bílkovině došlo k substituci aminokyseliny (jedné nebo více) a bílkovina je nyní více efektivní ve své funkci. (Piddock 2006)

Přesto, že jsou geny a bílkoviny pro efluxní pumpy přítomny ve všech bakteriích a podmiňují rezistenci, nemusí to nutně znamenat, že daná bakterie bude rezistentní k použité léčbě. Nemusí být rezistentní k použitému ATB nebo klinicky bezpečné koncentraci. Rezistence zprostředkovaná efluxními pumpami je z klinického hlediska závislá na druhu bakterie, ATB a infekce. (Piddock 2006)

3 Cíl práce

Seznámení se s principy a významem správné laboratorní praxe při stanovování antibiogramu, jako podkladu racionální cílené terapie a seznámení se s významem screeningu bakteriální rezistence pro omezení šíření rezistence v nemocničním prostředí.

4 Metodika

Účinek AML na bakterie je možné zjistit několika laboratorními metodami, které mají při řádném a pečlivém postupu srovnatelné výsledky.

Vyšetření citlivosti k AML musí být prováděno v souladu se zásadami správné laboratorní praxe. Příprava k testování zahrnuje tyto nezbytné složky: (1) Interní kontrola kvality, to znamená testování každé nové šarže kultivačních pūd, ATB disků a ostatních diagnostik (např. karet VITEK 2) pomocí definovaných sbírkových kmenů. (2) Dodržení předepsané denzity inokula a kultivačních podmínek pro daný bakteriální druh. Vyšetření je vždy prováděno na výrobcem nebo autorizovanou firmou validovaných přístrojích a použité reagentie jsou IVD se značkou shody CE.

4.1 Kvalitativní metody

Kvalitativní metody mají za cíl zařadit bakteriální populaci do kategorie citlivý nebo rezistentní k danému ATB. Měří se tedy aktivita ATB podle průměru inhibičních zón vytvořených působením ATB obsaženého v discích na Petriho misce souvisle pokryté povlakem kmene vyšetřované bakterie po předepsané době inkubace při optimálních kultivačních podmínkách pro daný bakteriální druh. Hodnocení výsledků je na základě měření velikosti inhibičních zón a následném porovnání jejich velikosti s referenčními hodnotami. Průměr inhibičních zón se liší u jednotlivých ATB podle jejich rychlosti difúze z disku a také jsou v obráceném poměru k MIC. V rutinním provozu se užívá spojení „vyšetření citlivosti“ pro zjišťování aktivity ATB. (Urbášková 2010)

Podle výsledků můžeme bakteriální kmen zařadit do kvalitativní kategorie jako (1) klinicky citlivý, pokud použité ATB je dostatečně aktivní a má vysokou pravděpodobnost úspěchu při použití k terapii, (2) klinicky rezistentní, pokud použité ATB nemá dostatečnou aktivitu a má vysokou pravděpodobnost selhání při použití k terapii, a (3) klinicky intermediárně rezistentní, pokud je úspěšnost terapie použitým ATB nejistá. Kvalita výsledků se odráží od přísného dodržení postupu metody, přesného měření průměrů inhibičních zón a také se ověřuje systémem kontrol. Výsledek ovšem nepostačuje pro výběr a stanovení dávek ATB pro léčbu některých

infekcí, jako například sepse (otrava krve), meningitis (zánět mozkových blan) nebo endokarditis (zánět vnitřního povrchu srdce). (Urbášková 2010) (Scharfen 2013)

4.1.1 Disková difúzní metoda

Pro vyšetření citlivosti k AML u bakterií, které jsou nenáročné (i pro některé náročnější) a rychle rostoucí, se využívá disková difúzní metoda. Výhodou této metody je snadná a jednoduchá příprava, díky čemuž je nejpoužívanější metodou v rutinní praxi. Nevyžaduje žádné speciální přístrojové vybavení, je pružná ve volbě vyšetřovaných ATB díky dostupnosti kvalitních disků a vyhovuje většině klinických požadavků na vyšetření citlivosti. Náklady, oproti jiným metodám vyšetření citlivosti, jsou nižší a zároveň jsou výsledky ve většině případů dostatečně spolehlivé pro předpovězení klinické účinnosti ATB. (Urbášková 1998)

Nevýhodou je nemožnost použití pro vyšetření mikrobů s nízkou rychlostí růstu, mikrobů vyžadujících speciální kultivační podmínky a pro anaerobní bakterie. Výsledek je významně ovlivněn koncentrací inokula, to je ovšem ošetřeno měřením zákalu fyziologického roztoku s rozmíchanou kulturou pomocí denzitometru. Také staré nebo směsné kultury mohou ovlivnit výsledek. Použitá bakteriální kultura by neměla být starší než 24 h. Disková difúzní metoda může také selhat v průkazu klinicky významné rezistence některých bakterií a je nutné doplnit ji provedením speciálního vyšetření. (Urbášková 1998)

U diskové difúzní metody se aplikuje obecný postup a podle typu vyšetření se použijí jiné disky (jiná ATB) v různém počtu s rozdílným uspořádáním na Petriho misce. U všech vyšetření jsme tedy přímo připravili inokulum z 3 až 5 kolonií čisté kultury z agarové plotny. Pomocí sterilního vatového tamponu jsme přenesli kolonie do zkumavky se 3 ml fyziologického roztoku. Hustotu inokula jsme zkontrolovali pomocí denzitometru a případně upravili na zákal 0,5 stupně McFarlanda (přibližná koncentrace buněk v 1 ml roztoku by měla být mezi 1,5 a $3 \cdot 10^8$). Ihned bez prodlevy jsme naočkovali plotnu Müller-Hintonova agaru (MH agar) pomocí tamponu, který jsme použili k rozmíchání kultury. Fyziologický roztok s kulturou jsme aplikovali ve třech směrech svírající úhel 60 stupňů a dbali na pečlivé a kompletní pokrytí agarové plotny. Po lehkém zaschnutí povrchu jsme umístili příslušný počet daných ATB disků pomocí sterilní pinzety nebo pomocí aplikátoru ATB disků (raznice). Poté jsme plotny, otočené víčkem dolů, umístili do termostatu vyhřátého na teplotu $35 \pm 1^\circ\text{C}$ a nechali inkubovat

v předepsaných podmínkách 18 až 24 h, přičemž jsme dbali na umístění maximálně šesti ploten na sebe kvůli rovnoměrné distribuci tepla.

4.2 Kvantitativní metody

Výsledkem kvantitativních metod je koncentrace ATB, která je účinná proti testovanému kmenu. Jedná se o určení MIC. MIC je taková koncentrace ATB, při které se zastaví růst bakterie.

4.2.1 VITEK 2

VITEK 2 je plně automatizovaný systém určený k identifikaci a stanovení citlivosti klinicky relevantních bakterií. Využívá diagnostické karty, které obsahují ATB a testovací média v množství o jednotkách mikrolitru. Jsou dostupné karty k vyšetření citlivosti rychle rostoucích gram-pozitivních a aerobních gram-negativních bakterií. Tedy zástupce rodu *Enterobacteriaceae*, stafylokoků, enterokoků, streptokoků, nefermentujících bakterií a kvasinek. (Reller 2009)

Před zahájením přípravy na testování izolátů pomocí přístroje VITEK 2 je třeba vytemperovat karty a fyziologický roztok na laboratorní teplotu. K načtení diagnostických karet a požadovaných vyšetření citlivosti slouží tzv. stanička. Stanička je propojena s přístrojem VITEK 2 a laboratorním informačním systémem. Důležité je správné zadání písmene a čísla kmene, i pořadí kmenů na daném čísle. Pořadí kmenů je uděleno během odečtu stanice plotnám, které jsou určeny k přípravě karet. Správné spárování kmene s kartou je zásadní pro bezchybný přenos dat z přístroje zpět do laboratorního informačního systému. Tedy spárování výsledků se vzorky.

Připravili jsme si stojánek se zkumavkami do staničky. Do zkumavky jsme pomocí dávkovače dali 3 ml roztoku. Pomocí sterilního vatového tamponu jsme odebrali několik kolonií čisté a čerstvé kultury a rozmíchali ji ve zkumavce s roztokem. Denzitometrem jsme zjistili hustotu inokula a případně upravili přidáním dalších několik kolonií na hustotu 0,53 – 0,73 stupně McFarlanda. Při vyšší hustotě jsme zkumavku i s roztokem vyhodili a připravili nové inokulum. Zkumavku jsme po změření umístili zpět do stojánku, načtli čárový kód příslušné diagnostické karty pomocí čtečky a umístili kartu do stojánku tak, aby pipetovací hadička byla umístěna ve zkumavce s inokulem. Dbali jsme na to, abychom se pipetovací hadičky nedotkli,

protože by došlo ke kontaminaci inokula a ke zkreslení výsledků. Zároveň se po přípravě inokula kontroluje sterilita použitého roztoku a čistota použité kultury. Sterilním tamponem, který byl použit k rozmíchání inokula, jsme udělali čáru přes krevní agar (v případě stafylokoků) nebo MacConkeyův agar (v případě gram-negativních tyčků) a plotny umístili do termostatu. Druhý den jsme zkontrolovali, že použité kultury byly čisté a fyziologický roztok, použitý k přípravě inokula, byl sterilní.

Při zadávání vyšetření citlivosti současně s identifikací jsme vložili do stojánku navíc prázdnou zkumavku, ke které jsme přiřadili citlivostní kartu. Identifikace v informačním systému je stejná, liší se kód diagnostické karty. Po zadání potřebných údajů do informačního systému a umístění potřebných zkumavek a karet do stojánku jsme přesunuli stojánek ze staničky do přístroje VITEK 2 a spustili testování. Po zhruba 10 – 15 minutách přístroj zpracoval vzorky a bylo možné stojánek se suspenzí vyjmout. Výsledky byly automaticky odeslány do laboratorního informačního systému.

4.2.2 E-test

E-test je kvantitativní metoda vyšetření citlivosti bakterií, která kombinuje principy diskové difúzní metody a diluční metody. Hlavní výhodou je jednoduchost provedení testu umožňující pružné stanovení MIC jednotlivých ATB. E-test lze provést na různých půdách, což umožňuje jeho využití pro testování mikrobů s různými růstovými nároky. Je proto vhodný k vyšetření MIC u růstově náročných bakterií, anaerobů. Další výhodou je spolehlivější odhalení kontaminace kmenů než při použití bujonové diluční mikrometody. Lépe také detekuje heterorezistenci a v rutinní praxi se využívá k doplnění nebo upřesnění výsledků získaných diskovou difúzní metodou.

Pro vysokou cenu se E-test využívá v rutinní praxi pouze v případech, kdy není výsledek diskové difúzní metody spolehlivý. Výsledky mohou být významně ovlivněny koncentrací inokula.

Vlastní E-test se provádí pomocí plastického proužku, na kterém je nanášeno testované ATB v suchém stavu ve vzestupné koncentraci na jedné straně. Na druhé straně je kontinuální stupnice, která slouží k odečítání MIC. Jako u diskových difúzních metod se vyšetřovaný kmen bakterie naočkuje na celou plochu MH agaru v rovnoměrné

vrstvě. S E-testem se manipuluje pomocí sterilní pinzety a po přiložení na agar se nesmí s proužkem dále manipulovat – posouvat ani sundavat. Po příslušné době inkubace je možné odečíst výsledky. Kolem proužku se vytvoří zóna inhibice ve tvaru elipsy a kde okraj elipsy protíná okraj proužku je možné odečíst na kalibrované odečítací škále hodnotu MIC.

Pomocí sterilního tamponu jsme přenesli několik izolovaných kolonií z čisté kultury do fyziologického roztoku a rozmíchali je. Inokulum by mělo této chvíli obsahovat přibližně $1,5$ až $3 \cdot 10^8$ buněk v 1 ml fyziologického roztoku. Aktuální hustotu inokula jsme zjistili změřením zákalu pomocí denzitometru. Zákal byl 0,5 stupně McFarlanda. Následně jsme koncentraci inokula upravili tak, aby výsledná koncentrace byla 10^4 až 10^5 buněk, a to zředěním původního inokula fyziologickým roztokem 1:10. Inokulum jsme naočkovali na MH agar pomocí vatového tamponu postupným rozetřením ve třech směrech, přičemž jsme vždy plotnu otočili přibližně o 60° . Nechali jsme inokulum zcela zaschnout a poté jsme přiložili E-test pomocí sterilní pinzety. Zkontrolovali jsme, že se E-test dotýká agarů celým povrchem. Misky jsme dali inkubovat do termostatu otočené víčkem dolů a nevrstvili více jak šest misek na sebe kvůli rovnoměrné distribuci tepla. Po potřebné době inkubace jsme odečetli výsledek podle místa, kde okraj inhibiční zóny protínal okraj proužku E-testu.

4.2.3 Diluční metody

Diluční metody jsou kvantitativními testy, které slouží ke zjištění MIC. MIC se hodnotí v agarových půdách obsahující zvolené koncentrace ATB. Obvykle se připraví více koncentrací jednoho ATB (12-15) řaděných dvojnásobně geometrickou řadou. Na agarovou plotnu se naočkuje standardní inokulum vyšetřovaných bakterií a po příslušné době inkubace je možné odečíst MIC. Jedná se o vysoce standardizovanou, referenční metodu k vyhodnocování přesnosti ostatních metod vyšetření citlivosti. Lze pomocí ní vyšetřit citlivost velkých souborů kmenů za stejných podmínek. Je to spolehlivá metoda k hodnocení účinnosti nových ATB a v porovnání s diluční mikrometodou spolehlivěji odhaluje kontaminaci kmenů a lépe detekuje heterorezistenci.

Na přípravu může být metoda časově pracná a nákladná. Není tedy praktická pro vyšetření citlivosti malého množství nebo jednotlivých kmenů.

4.3 Metody screeningu mechanismu rezistence

Screening slouží k zachycení rezistence u podezřelých vzorků. Metody musí být co nejcitlivější aby žádný vzorek nebyl vyhodnocen jako falešně negativní.

4.3.1 Screeningový agar pro screening MRSA

Screeningový agar pro screening MRSA je MH agar s přidaným 4% chloridem sodným a oxacilinem o koncentraci 6 mg/l. Inokulum o hustotě 0,5 stupně dle McFarlanda jsme připravili přímou metodou (3 až 5 kolonií jsme pomocí sterilního tamponu rozmíchali ve zkumavce se 3 ml fyziologického roztoku). Následně jsme inokulum zředili v poměru 1:10 fyziologickým roztokem. Kličkou kalibrovanou na 10 µl jsme naočkovali inokulum na výseč MH agaru a plotnu dali inkubovat do termostatu na 24 hodin.

Pokud vyrostou na agaru dvě a více kolonií je testovaný kmen rezistentní k oxacilinu. Při negativním výsledku u koaguláza negativních stafylokoků je doba inkubace prodloužena o dalších 24 hodin.

Existují screeningové agary i pro VRE nebo pro producenty KPC.

4.3.2 Diskový difúzní test s cefoxitinem

Při podezření na MRSA se provádí test na principu diskové difúzní metody za použití ATB disku s 30 µg cefoxitinu. Breakpoint pro MRSA je 22 mm. Pokud je inhibiční zóna okolo disku rovna nebo menší než 22 mm je vyšetřovaný kmen podezřelý z rezistence k methicilinu. Komunitní izoláty mají inhibiční zónu nejméně 20 mm. Konfirmace se provádí pomocí latex-aglutinačního testu.

Standardním postupem jsme připravili přímé inokulum, které jsme naočkovali na MH agar a do 15 minut jsme aplikovali ATB disk s 30 µg cefoxitinu do středu Petriho misky. Misku jsme dali inkubovat do termostatu na 24 hodin. Výsledek jsme odečetli změřením inhibiční zóny.

4.3.3 Latex-aglutinační test MRSA-Screen

Rychlé latex-aglutinační testy využíváme k identifikaci a konfirmaci kolonií ze selektivních agarů. Test se skládá z inertních latexových částic, které jsou

senzibilizovány monoklonální protilátkou proti PBP2 a reagentů k rychlé extrakci PBP2 s bakteriální stěny. Extrakty jsou připraveny povařením inokula *S. aureus* v alkalickém prostředí, následovaném neutralizací a centrifugací. Supernatant je poté smíchán s latexovým reagentem na testovací kartě. Během tří minut může být viditelné shlukování nebo aglutinace, což značí přítomnost PBP2.

Tato metoda identifikace je nenáročná finančně, provedením, nevyžaduje speciální pomůcky a poskytuje výsledky do 15 minut. Potřebný materiál je součástí komerčně vyráběného kitu.

Do mikroependorfovy zkumavky jsme nakapali čtyři kapky extrakčního reagentu 1 a pomocí sterilní mikrobiologické kličky kalibrované na 1,5 μ l vnesli dostatečné množství kolonií vyšetřovaného kmenu do zkumavky (dostatečného množství dosáhneme dvěma aplikacemi kličkou). Uzavřenou zkumavku jsme umístili do blokového termostatu. Po třech minutách jsme zkumavku vytáhli z termostatu a nechali vychladnout při pokojové teplotě. Po vychladnutí jsme přidali jednu kapku extrakčního reagentu 2, dobře promíchali a dali centrifugovat při 3000 otáčkách po dobu pěti minut. Vzniklý supernatant jsme použili k latexové aglutinaci.

Pro každý vzorek jsme označili dvě reakční místa ve tvaru kruhu na testovací kartě (test a kontrola). Na každé místo jsme pomocí automatické pipety umístili 50 μ l supernatantu s testovaným kmenem. Na jedno reakční místo jsme přidali jednu kapku roztoku senzibilizovaného latexu a na druhé místo jednu kapku roztoku kontrolního latexu. Promíchali jsme reagenty se supernatantem pomocí čisté špejle (vždy jedna pro jeden vzorek) přičemž jsme směs rozprostřeli po celé ploše reakčního místa. Kartou jsme kroužili v ruce a do tří minut byla v případě positivity viditelná aglutinace. V kontrolním reakčním místě nesmí dojít k aglutinaci, v opačném případě je výsledek chybný.

4.3.4 Screening produkce karbapenemas

Cílený screening produkce karbapenemas se provádí u vzorků, kde lze očekávat přítomnost bakterií rodu *Enterobacteriaceae* (vzorky jako výtěr z recta) a samozřejmě u suspektních kmenů. Screening karbapenemas se provádí pomocí vyšetření na principu diskové difúzní metody s diskem obsahujícím 10 μ g ertapenemu a diskem s 30 μ g temocilinu. Interpretace výsledků je podle stanovených breakpointů pro každé použité

ATB. Pokud je inhibiční zóna okolo ATB disku s ertapenemem do 22 mm jedná se o rezistentní kmen. Při průměru inhibiční zóny 25 mm a vyšší je vyšetřovaný kmen citlivý. Ovšem při průměru inhibiční zóny mezi 22 a 25 mm je kmen suspektní z produkce KPC a je nutno provést test KPC, případně další confirmaci. Breakpoint průměru inhibiční zóny pro disk s temocilinem je 12 mm. Pokud je tedy průměr do 12 mm je vyšetřovaný kmen producentem karbapenemas. Vysoký stupeň rezistence k temocilinu (průměr inhibiční zóny méně než 11 mm) je fenotypovým indikátorem produkce karbapenemasy OXA-48. Není to ovšem dostatečně specifický indikátor a je nutno provést další confirmaci. Kmeny suspektní z produkce KPC nebo MBL se zasílají ke confirmaci do referenční laboratoře.

Připravili jsme inokulum z čisté, čerstvé kultury vyšetřovaného kmene a naočkovali jej na MH agar. Pomocí sterilní pinzety jsme umístili ATB disky temocilinu a ertapenemu minimálně 2 cm od sebe. Plotny jsme dali inkubovat do termostatu po dobu 24 h a následně odečetli výsledky změření inhibičních zón.

4.3.5 Test KPC

Test KPC se používá pro detekci producentů karbapenemas. Využívá se rozdílů mezi inhibičními zónami pěti ATB disků jejichž složení je:

disk (1) obsahuje 10 µg meropenemu, označen MRP10

disk (2) obsahuje 10 µg meropenemu + inhibitor metalo-β-laktamas (DPA-dipikolinová kyselina), označen MRPD

disk (3) obsahuje 10 µg meropenemu + KPC a AmpC inhibitor (kyselina boritá), označen MRPBO

disk (4) obsahuje 10 µg meropenemu + AmpC inhibitor (kloxacin), označen MRPCX,

disk (5) obsahuje 30 µg temocilinu, označen TEMOC.

Interpretace výsledků je založena na rozdílu mezi inhibiční zónou okolo disku se samotným karbapenemem a kolem disků s kombinací karbapenemu s inhibitorem jednotlivých typů β-laktamas. Pokud je zóna okolo disku (2) více nebo právě o 5 mm větší než okolo disku (1) se samotným karbapenemem jedná se o kmen produkující MBL. Pokud je zóna okolo disku (3) více nebo právě o 4 mm větší než okolo disku (1) jedná se o producenta KPC. Pokud má disk (3) rozdíl v průměru inhibiční zóny 4 mm a více, a disk (4) rozdíl v průměru inhibiční zóny 5 mm a více ve srovnání s diskem (1),

jedná se o producenta AmpC se sníženou propustností membrány způsobenou ztrátou porinů. Pokud kolem disku (5) s temocilinem chybí inhibiční zóna nebo je její průměr do 12 mm je testovaný kmen suspektní z produkce karbapenemasy OXA-48.

Po naočkování vyšetřované, čisté, čerstvé kultury na MH agar jsme rovnoměrně rozmítli ATB disky diagnostické sady Rosco Diagnostica pomocí sterilní pinzety a dali plotny, otočené víčkem dolů, inkubovat do termostatu na 18 až 24 h. Poté jsme odečetli výsledky pomocí měření průměrů inhibičních zón okolo jednotlivých disků a jejich následném porovnání oproti průměru inhibiční zóny okolo disku (1) obsahující pouze karbapenem. Průměr inhibiční zóny okolo disku (5) jsme hodnotili samostatně.

4.3.6 Screeningový test produkce β -laktamas

Screeningový test produkce β -laktamas se využívá pro průkaz ESBL a β -laktamasy typu AmpC u gram-negativních tyček z rodu *Enterobacteriaceae*. Detekce ESBL se provádí u kmenů *Enterobacteriaceae* se sníženou nebo hraniční citlivostí k cefalosporinům 3. generace, u kterých je produkce ESBL pravděpodobná. Sníženou citlivost si lze všimnout podle menšího průměru inhibičních zón (stačí i jedna hodnota) nebo podle vyšších hodnot MIC, než které jsou stanovené breakpointy. U producentů ESBL je často průměr inhibiční zóny kole cefoxitinového disku větší, než kolem disku s cefalosporinem 3. generace. β -laktamasy typu AmpC jsou produkovány některými druhy bakterií konstitutivně nebo jsou inducibilními enzymy, to znamená, že jsou produkovány bakteriemi teprve při kontaktu s vhodným, indukujícím, ATB (cefotaxim, imipenem) nebo s inhibitory β -laktamas (kyselina klavulanová).

Využívají se čtyři ATB disky označené písmeny A až D jejichž složení je:
A-disk obsahuje 10 μ g cefpodoximu,
B-disk obsahuje 10 μ g cefpodoximu + ESBL inhibitor,
C-disk obsahuje 10 μ g cefpodoximu + AmpC inhibitor,
D-disk obsahuje 10 μ g cefpodoximu + ESBL inhibitor + AmpC inhibitor.

Interpretace výsledků vychází z rozdílu mezi inhibiční zónou kolem disku A (samotný cefpodoxim) a kolem ostatních disků (cefpodoxim v kombinaci s inhibitorem jednotlivých typů β -laktamas). Nejdříve se porovnává inhibiční zóna okolo disku A vzhledem k ostatním inhibičním zónám zbylých disků (B, C a D). Pokud je rozdíl průměrů inhibičních zón do 2 mm je výsledek testu negativní a testovaný kmen

nevykazuje aktivitu ESBL ani AmpC. Pokud je rozdíl průměrů inhibičních zón disků B-A a D-C větší nebo roven 5 mm a každý z rozdílů D-B a C-A menší než 5 mm, jedná se o ESBL. Pokud je rozdíl průměrů inhibičních zón disků B-A a D-C menší než 5 mm a každý z rozdílů D-B a C-A větší nebo roven 5 mm, jedná se o AmpC. Pokud je rozdíl průměru inhibičních zón D-C větší nebo roven 5 mm, ale rozdíl B-A menší než 5 mm, jedná se o kombinaci ESBL s AmpC.

Po naočkování vyšetřované, čisté a čerstvé kultury na MH agar jsme rovnoměrně rozmístili 4 ATB disky pomocí sterilní pinzety. Použili jsme ATB disky testovací sady MASTDISCS ID určené k detekci produkce enzymů AmpC a/nebo ESBL, obsahující cefpodoxim o množství 10 µg a potřebnou kombinaci ATB s inhibitorem. Plotny, otočené víčkem dolů, jsme umístili do termostatu k inkubaci po dobu 18 až 24 hodin. Druhý den jsme odečetli výsledky pomocí měření inhibičních zón kolem jednotlivých disků a porovnali jsme je mezi sebou podle návodu pro interpretaci výsledků.

4.3.7 Test DDST

Double Disk Synergy Test je metoda založená na detekci deformace inhibičních zón vytvořených kolem ATB disků mezi disky s cefalosporiny a aztreonamem, a diskem s amoxicilinem v kombinaci s kyselinou klavulanovou. Disky musí být umístěny do vzdálenosti 20 až 30 mm podle testovaného druhu. Interpretace výsledků je na základě tvaru deformované inhibiční zóny. Pokud je vyšetřovaný kmen producentem ESBL vzniká zvětšená inhibiční zóna kolem alespoň jednoho z disků s aztreonamem, cefotaximem, ceftazidimem nebo cefepimem na straně sousedící s diskem s kombinací amoxicilinu s kyselinou klavulanovou. Vzniká tak charakteristický tvar „zátky od šampaňského“. Pokud je vyšetřovaný kmen producentem AmpC vzniká deformovaná inhibiční zóna podobná tvaru písmene „D“ u aztreonamu nebo u některého z cefalosporinů na straně, která sousedí s diskem s kombinací amoxicilinu s kyselinou klavulanovou (případně cefoxitinu nebo imipenemu). Pokud vyšetřovaný kmen produkuje současně ESBL i AmpC může být produkce ESBL skryta. Je tedy nutné pro průkaz ESBL inhibovat produkci AmpC pomocí kyseliny borité nebo kloxacilinu, případně lze přidat oxacilin do MH agaru. V tom případě, pokud jsou inhibiční zóny větší než na MH agaru bez oxacilinu, jedná se o produkci AmpC. (Hrabák 2008)

Námi použité ATB disky:

disk s označením B obsahoval 10 µg cefpodoximu,

disk s označením C obsahoval 10 µg cefpodoximu + kyselina klavulanová,

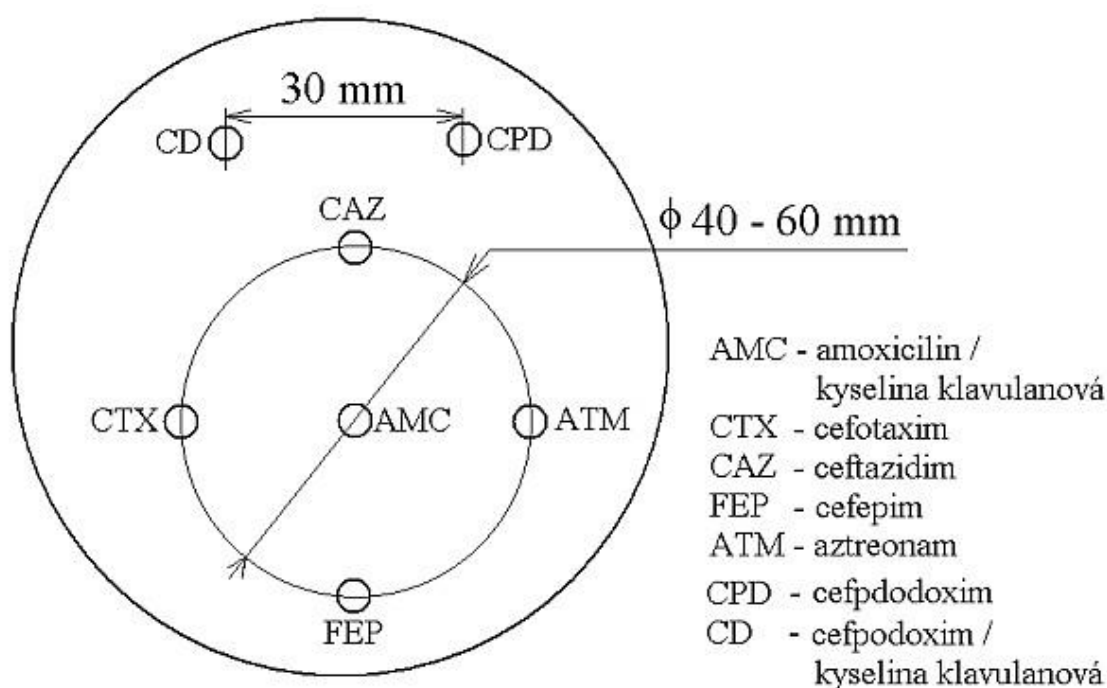
disk s označením CAZ obsahoval 30 µg ceftazidimu,

disk s označením AMC obsahoval 30 µg amoxicilinu + kyselina klavulanová,

disk s označením FEP obsahoval 30 µg cefepimu,

disk s označením COX obsahoval 5 µg cefotaximu.

Po naočkování vyšetřované, čisté, čerstvé kultury na MH agar jsme rozmístili pomocí sterilní pinzety ATB disky podle obrázku 1. Plotny otočené víčkem dolů jsme umístili do termostatu po dobu 18 až 24 h a poté jsme odečetli výsledky.



Obrázek 1: Rozložení ATB disků při provedení testu DDST (Hrabák 2008)

Disk s označením CD na obrázku 1 představuje disk C ve výčtu použitých disků, CPD odpovídá disku B, CTX odpovídá disku COX.

4.4 Kontrola kvality

Nezbytnou podmínkou optimalizace diagnostiky je dodržování zásad správné laboratorní praxe, jejíž nedílnou součástí je i kontrola kvality. Je nutné pracovat s výrobcem ověřenými diagnostiky a zároveň kontrolovat, že kvalita zůstává zachována i v aktuálních laboratorních podmínkách.

V rutinní praxi je kontrola kvality diagnostických souprav zajištěna výrobcem, kterou výrobce dokládá certifikátem (osvědčením kvality). Používají se komerční soupravy validované výrobcem se značkou shody IVD/CE nebo s prohlášením o shodě. Komerční soupravy se kontrolují pomocí sbírkových kmenů v laboratorních podmínkách uživatele. Kontrolují se ATB disky pomocí referenčních sbírkových kmenů. Provádí se kontrola jak každé nové šarže ATB disků, tak pravidelná kontrola již používaných disků v raznicích. Tato kontrola slouží pro ověření zachování vlastností aktuálně používaných disků v laboratorních podmínkách. Kontrolují se E-testy a růstové vlastnosti půd určených pro testování citlivostí. Vždy se kontroluje každá nová šarže - komerční soupravy, E-testy, půdy pro testování citlivostí. Důležitou součástí kontroly kvality je i dodržování a monitorování skladovacích podmínek a kontrola doby expirace komerčních diagnostických souprav a kitů používaných při vyšetřeních.

4.5 Získání potřebných dat

Při použití diskových difúzních testů jsme změřili inhibiční zóny okolo jednotlivých ATB disků. Měřili jsme vždy ve dvou na sebe kolmých směrech a vypočetli průměrnou hodnotu průměru inhibiční zóny v milimetrech. Zóna inhibice musí být zřetelná, pouhé prosvětlení souvislého nárůstu bakterie není dostačující (platí i pro E-test). Rozhodnutí, od kdy se jedná o bakterii citlivou/rezistentní k danému ATB (nebo inhibitoru), určují tzv. klinické breakpointy antibiotik. Pro Evropu jsou breakpointy stanoveny organizací EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

5 Výsledky

Jednotlivé vzorky jsme identifikovali, zhotovili jsme k nim antibiogramy a na jejich podkladě případně provedli další testy k potvrzení nebo vyvrácení rezistence.

Tabulka 1: Identifikace vzorku č. 1, provedené testy, výsledky a hodnocení

Vzorek č.: 1	Identifikace: MRSA	
Testy	Výsledky	Hodnocení
Screeningový agar pro MRSA	nárůst růžově zbarvených kolonií	pozitivní
VITEK 2	MRSA	MRSA
Diskový difúzní test s cefoxitinem	inhibiční zóna: 0 mm	MRSA
Latex-aglutinační test	aglutinace	pozitivní

Vzorek č. 1 jsme identifikovali jako MRSA pomocí screeningového agaru pro MRSA. Potvrzení správné identifikace a antibiogram jsme stanovili pomocí přístroje VITEK 2. Následně jsme provedli confirmaci diskovým difúzním testem s cefoxitinem a komerčním latex-aglutinačním testem. Výsledky byly pozitivní.

Tabulka 2: Identifikace vzorku č. 2, provedný test, výsledek a hodnocení

Vzorek č.: 2	Identifikace: <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
Testy	Výsledky	Hodnocení
VITEK 2	přirozená rezistence k ampicilinu	divoký kmen <i>K. pneumoniae</i>
DDST	inhibiční zóny: více jak 17 mm	negativní

Vzorek č. 2 jsme identifikovali jako *Klebsiella pneumoniae* pomocí přístroje VITEK 2 a zhotovili jeho pomocí také antibiogram. Z antibiogramu vyplývala přirozená rezistence k ampicilinu. Při testu DDST nedošlo k inhibici růstu vyšetřovaného kmene u všech ATB disků, nevyskytovaly se žádné deformace inhibičních zón a rozdíl průměru inhibičních zón okolo disku s cefalosporinem a disku s cefalosporinem v kombinaci s kyselinou klavulanovou byl méně než 5 mm.

Tabulka 3: Identifikace vzorku č. 3, provedené testy, výsledky a hodnocení

Vzorek č. 3	Identifikace: <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
Testy	Výsledky	Hodnocení
VITEK 2	rezistence k cefalosporinům 3. generace	ESBL pozitivní
Screeningový test produkce β -laktamas	B-A a D-C \geq 5 mm D-B a C-A < 5 mm	ESBL pozitivní

Tabulka 4: Výsledky screeningového testu produkce β -laktamas vzorku č. 3

Průměr inhibiční zóny (mm)							
Disk A	Disk B	Disk C	Disk D	B-A	D-C	D-B	C-A
0	18	0	19	18	19	1	0

Vzorek č. 3 byl identifikován jako *Klebsiella pneumoniae* pomocí přístroje VITEK 2. Antibiogram jsme stanovili kvalitativní diskovou difúzní metodou a zároveň kvantitativní automatickou metodou VITEK 2. V diskovém difúzním testu byly malé nebo žádné zóny u cefalosporinů 3. generace a zároveň velká zóna u cefamycinu cefoxitinu. Rovněž zjišťujeme vyšší hodnoty MIC u cefalosporinů 3. generace. To vše naznačuje produkci ESBL. Podrobili jsme tedy vzorek screeningovému testu produkce β -laktamas, který potvrdil, že vyšetřovaný kmen byl producentem ESBL.

Tabulka 5: Identifikace vzorku č. 4, provedené testy, výsledky a hodnocení

Vzorek č. 4	Identifikace: <i>Escherichia coli</i>	
Testy	Výsledky	Hodnocení
VITEK 2	citlivý na všechna testovaná ATB	divoký kmen <i>E. coli</i>

Vzorek č. 4 byl identifikován jako *Escherichia coli* pomocí přístroje VITEK 2, pomocí nehož byl stanoven i antibiogram. Vyšetřovaný kmen byl citlivý ke všem testovaným ATB, neměl žádné přirozené ani získané rezistence.

Tabulka 6: Identifikace vzorku č. 5, provedené testy, výsledky a hodnocení

Vzorek č.: 5	Identifikace: <i>Escherichia coli</i>	
Testy	Výsledky	Hodnocení
VITEK 2	rezistence k cefalosporinům 3. a 4. generace	ESBL pozitivní
Screeningový test produkce β -laktamas	B-A a D-C \geq 5 mm D-B a C-A < 5 mm	ESBL pozitivní

Tabulka 7: Výsledky screeningového testu produkce β -laktamas vzorku č. 5

Průměr inhibiční zóny (mm)							
Disk A	Disk B	Disk C	Disk D	B-A	D-C	D-B	C-A
0	20	0	20	20	20	0	0

Vzorek č. 5 byl identifikán jako *Escherichia coli* metodou VITEK 2. Po provedení vyšetření citlivosti diskovou difúzní metodou a na základě antibiogramu získaného pomocí přístroje VITEK 2 jsme zjistili sníženou citlivost k cefalosporinům 3. generace. Proto jsme izolovaný kmen podrobili screeningovému testu produkce β -laktamas, který potvrdil, že vyšetřovaný kmen byl producentem ESBL.

Tabulka 8: Identifikace vzorku č. 6, provedené testy, výsledky a hodnocení

Vzorek č.: 6	Identifikace: <i>Escherichia coli</i>	
Testy	Výsledky	Hodnocení
VITEK 2	intermediární až rezistentní ke karbapenemům	suspektní producent OXA-48
Test KPC	disk s temocilinem: inhibiční zóna 0 mm	producent OXA-48
E-test	imipenem: 1 mg/l meropenem: 1 mg/l	karbapenemy v citlivé kategorii, ale vyšší hodnoty MIC

Vzorek č. 6 byl identifikován jako *E. coli* pomocí přístroje VITEK 2. Vzorek byl suspektní z produkce KPC kvůli vyšším hodnotám MIC u karbapenemů (u *Enterobacteriaceae* divokých kmenů jsou nejčastěji <0,25) Pozitivní byl screeningový test produkce karbapenemas s disky temocilinu a ertapenemu. Podrobila jsem tedy izolát testu KPC na produkci karbapenemas pomocí ATB disků Rosco Diagnostica.

Výsledek byl pozitivní, testovaný kmen byl producentem karbapenemas OXA-48. Kmen byl zaslán ke confirmaci (pomocí PCR metod) do referenční laboratoře, která produkci karbapenemasy OXA-48 potvrdila.

Tabulka 9: Identifikace vzorku č. 7, provedené testy, výsledky a hodnocení

Vzorek č. 7	Identifikace: <i>Enterobacter cloacae</i>	
Testy	Výsledky	Hodnocení
VITEK 2	rezistence k cefalosporinům 3. generace	producent AmpC
Screeningový test produkce β -laktamas	B-A a D-C < 5 mm D-B a C-A \geq 5 mm	producent AmpC

Tabulka 10: Výsledky screeningového testu produkce β -laktamas vzorku č. 7

Průměr inhibiční zóny (mm)							
Disk A	Disk B	Disk C	Disk D	B-A	D-C	D-B	C-A
0	0	15	14	0	1	14	15

Vzorek č. 7 jsme identifikovali pomocí přístroje VITEK 2 jako *E. cloacae*. Z antibiogramu vyplynula rezistence k cefalosporinům 3. generace, proto jsme podrobili vzorek screeningovému testu produkce β -laktamas. Výsledek ukazoval na produkci AmpC.

Tabulka 11: Identifikace vzorku č. 8, provedené testy, výsledky a hodnocení

Vzorek č. 8	Identifikace: <i>Enterobacter cloacae</i>	
Testy	Výsledky	Hodnocení
MALDI-TOFF	<i>E. cloacea</i>	<i>E. cloacea</i>
VITEK 2	snížená citlivost k cefalosporinům 3. generace	producent AmpC
Screeningový test produkce β -laktamas	B-A a D-C < 5 mm D-B a C-A \geq 5 mm	producent AmpC
DDST	zóna inhibice pouze u disku cefepimu	nelze hodnotit

Tabulka 12: Výsledky screeningového testu produkce β -laktamas vzorku č. 8

Průměr inhibiční zóny (mm)							
Disk A	Disk B	Disk C	Disk D	B-A	D-C	D-B	C-A
0	0	13	14	0	1	14	13

Vzorek č. 8 byl identifikován metodou MALDITOFF i VITEK 2 jako *E. cloacae*. Bylo provedeno vyšetření citlivosti diskovou difúzní metodou a metodou VITEK 2 a byla zjištěna snížená citlivost k cefalosporinům 3. generace, při nízké MIC (<1) u zástupce cefalosporinů 4. generace. Izolovaný kmen jsem podrobila screeningovému testu produkce β -laktamas a testu DDST. Cílem bylo zjistit, zda je vyšetřovaný kmen producentem ESBL nebo β -laktamas typu AmpC. Screeningový test produkce β -laktamas potvrdil produkci AmpC. U testu DDST se objevila inhibiční zóna pouze u disku cefepimu a produkci AmpC a ESBL nelze hodnotit.

Tabulka 13: Identifikace vzorku č. 9, provedené testy, výsledky a hodnocení

Vzorek č. 9	Identifikace: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Testy	Výsledky	Hodnocení
VITEK 2	rezistence ke karbapenemům	suspektní z produkce MBL nebo OXA-48
Test KPC	MRPDP-MRP10 \geq 5 mm	producent MBL

Vzorek č. 9 byl identifikován jako *P. aeruginosa* pomocí přístroje VITEK 2. Z antibiogramu vyplynula rezistence ke karbapenemům, vyšetřovaný kmen byl tedy suspektní z produkce karbapenemas MBL nebo OXA-48. Podrobili jsme tedy izolát testu KPC. Průměr inhibiční zóny okolo disku (2), označeného MRPDP a obsahující meropenem v kombinaci s inhibitorem MBL, byl větší o více než 5 mm ve srovnání s inhibiční zónou okolo disku (1), označeného MRP10 a obsahující pouze meropenem. Z tohoto rozdílu vyplývá, že vyšetřovaný kmen byl suspektní z produkce MBL.

Kmen byl zaslán ke confirmaci (pomocí PCR metod) do referenční laboratoře, která produkci karbapenemasy nepotvrdila. Jednalo se o kombinovaný neenzymový mechanismus rezistence.

Tabulka 14: Identifikace vzorku č. 10, provedené testy, výsledky a hodnocení

Vzorek č. 10	Identifikace: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Testy	Výsledky	Hodnocení
VITEK 2	rezistence k většině ATB	multirezistence

Vzorek č. 10 byl identifikován jako *Pseudomonas aeruginosa* pomocí přístroje VITEK 2. Z antibiogramu vyplývala rezistence ke všem testovaným ATB kromě kolistinu. Vyšetřovaný kmen byl tedy multirezistentní.

6 Diskuse

Princip agarové difúzní metody byl použit již na konci 19. století. Ve 20. letech 20. století představil Fleming metodu testování účinnosti antiseptických roztoků proti mikrobům na principu agarové difúze. Do agaru v Petriho misce vyřízl úzký pruh, který naplnil antiseptickým roztokem. Reddish poté techniku upravil tak, že vyřízl do agaru kruhy o malém průměru, což umožnilo testování více koncentrací nebo různých roztoků najednou. Ve čtyřicátých letech byl poprvé použit nosič ATB ve formě napuštěného filtračního papíru nebo tablet. AML se začaly také přidávat přímo do agaru, vznikla tedy agarová diluční metoda. Provádění agarové diluční metody bylo pro rutinní vyšetření příliš časově náročné a těžkopádné. Přešlo se tedy k použití pouze breakpointové koncentrace ATB k rozlišení citlivých a rezistentních bakterií. Vzhledem k několika faktorům, ovlivňujícím výsledky vyšetření citlivosti, došlo v 60. letech ke standardizaci metod. Spolehlivost vyšetření citlivosti by tedy měla být u obou metod (agarová difúzní a agarová diluční metoda) na stejné úrovni. (Wheat 2001)

V 70. letech se začaly vyvíjet automatizované metody pro snížení časové i ekonomické náročnosti provedení metod. Mezi ostatními vznikl i předchůdce dnes používaného systému VITEK 2, který používal dehydrované reagentie uzavřené v plastických kartách. (Wheat 2001)

Dnes používané metody jsou stejně spolehlivé a citlivé. Provedení trvá kratší dobu a je zjednodušeno použitím komerčně vyráběných ATB disků a agarů s přídavkem ATB.

K zamezení šíření rezistence v rámci zdravotnického zařízení zavádí ústavní hygienicko-epidemiologické oddělení ve spolupráci s mikrobiologií a jednotlivými klinickými obory preventivní opatření. Vychází přitom ze znalosti výskytu rezistencí v rámci daného zařízení. Tato opatření zahrnují cílený screening určitých typů rezistence. Při pozitivním screeningu následují příslušná režimová opatření s cílem zamezit šíření epidemiologicky závažného kmene. V rámci pracoviště, kde jsme prováděli praktické testy, se provádí cílený screening MRSA ze stěrů z nosu a krku a screening karbapenemas z výtěrů z recta u vybraných skupin přijímaných pacientů (překlady, operanti, pacienti na JIP apod.). Vzhledem k tomu, že pracoviště nemá

hematoonkologické oddělení, kde se předpokládá vyšší výskyt VRE, tento typ rezistence se zde cíleně nevyhledává a objevuje se jen sporadicky.

Mimo tento cílený epidemiologický screening se v rámci testování klinických vzorků od pacientů, při podezřelém antibiogramu, doplňují screeningové a konfirmační testy. Při jejich pozitivitě, tedy záchytu kmene s epidemiologicky závažným typem rezistence, se ohlašuje hygienicko-epidemiologickému oddělení a opět následují režimová opatření k zamezení šíření kmene.

Odhalení určitého typu rezistence má význam i pro interpretaci antibiogramu jako podkladu cílené terapie. I když se podle zásad EUCAST interpretují hodnoty MIC „as read“ (tedy pouze ve vztahu k breakpointu, bez zohlednění mechanismu rezistence), při klinické interpretaci se mechanismus rezistence zohlední spolu s farmakokinetikou a farmakodynamikou daného ATB a individuálním stavem a diagnózou pacienta. Cílem je optimální cílená individualizovaná kausální léčba, která je zároveň optimální z hlediska ekologického vlivu. Tedy že vyvíjí minimální selekční tlak vedoucí ke vzniku rezistentních kmenů.

Vzorkem č. 1 byl výtěr z nosu pacienta. Jednalo se o cílený screening MRSA z epidemiologických důvodů. Vzorek byl naočkován na screeningový selektivní agar pro MRSA. Po nárůstu kolonií (pozitivním výsledku) byl vzorek identifikován (metodou MALDITOF a VITEK 2), antibiogram byl vyšetřen diskovou difúzní metodou a pomocí přístroje VITEK 2. Konfirmace byla provedena komerčním latex-aglutinačním testem MRSA-Screen, s jednoznačným výsledkem stanovení. Aglutinace potvrdila předešlé výsledky, tedy že vyšetřovaným kmenem byl MRSA.

Antibiogram vzorku č. 1 vykazoval pro MRSA typickou rezistenci k cefoxitinu (disk pro stanovení oxacilinové rezistence) a tedy z toho vyplývající rezistenci ke všem β -laktamovým ATB. Dále rezistenci k erytromycinu, jakožto zástupci makrolidových ATB, a ke klindamycinu, jakožto zástupci linkosamidů. V citlivé kategorii zůstávají glykopeptidy (vankomycin, teicoplanin), linezolid a chloramfenikol, někdy i rifampicin či kotrimoxazol. Tento citlivostní vzorec je charakteristický pro nemocniční kmeny MRSA. Komunitní kmeny mají často zachovanou citlivost k makrolidům a linkosamidům. Zóna okolo cefoxitinu u komunitních kmenů se často pohybuje okolo breakpointu. U nemocničních MRSA je jasně v kategorii rezistence.

U invazivních MRSA infekcí zůstávají lékem volby glykopeptidová ATB, nejčastěji vankomycin. Linesolid je další možnou alternativou léčby – vhodný je zejména u MRSA abscedující pneumonie či u infekcí kostí (osteomyelitidy, spondylodiscitidy).

Ve světě byl již izolován kmen MRSA, který byl zároveň rezistentní i k vankomycinu a teicoplaninu. Zasáhnout v léčbě proti takovému původci je již svízelné a šíření takto multirezistentních bakterií vzbuzuje obavy z nástupu postantibiotické éry.

U gram-negativních tyčiček jsme se seznámili s antibiogramem divokých kmenů, tedy takových, které vykazují pouze přirozenou rezistenci charakteristickou pro daný druh a nemají žádnou získanou rezistenci. U takových se obvykle neprovádí doplňkové testy. (Pro vlastní edukaci jsme tyto testy provedli s negativním výsledkem.) Takové kmény pocházejí většinou od pacientů z komunity (uroinfekty, komunitní klebsiellová pneumonie apod.).

Z klinického materiálu od pacientů z JIP, kteří jsou dlouhodobě hospitalizováni a zpravidla mají ATB léčbu jsme zachytili kmény bakterií ze skupiny *Enterobacteriaceae* vykazující získanou rezistenci k cefalosporinovým ATB – typu AmpC nebo ESBL. Léčba invazivních infekcí takovými kmény znamená zpravidla podání karbapenemů. Proto je zachování citlivosti karbapenemových ATB klíčové pro léčbu infekcí spojených s nemocniční péčí. Proto se i provádí na pracovišti, kde jsme prováděli laboratorní zkoušky, screening producentů karbapenemas z výtěru z recta.

Z tohoto pravidelného epidemiologického screeningu producentů karbapenemas jsme zachytili *Escherichia coli* s produkcí karbapenemasy OXA-48. Screeningový test produkce karbapenemas s disky temocilinu a ertapenemu byl pozitivní. Tento výsledek podpořil i antibiogram, komerční test a konfirmace v referenční laboratoři.

Další kmen rezistentní ke karbapenemům byl zachycen z klinického materiálu od pacienta z JIP. Jednalo se o *Pseudomonas aeruginosa* se smíšeným typem neenzymové rezistence.

U infekcí způsobených kmény rezistentními ke karbapenemům je léčba svízelná. Citlivé zůstávají někdy aminoglykosidy – zejména amikacin nebo tobramycin, často

zůstává zachována citlivost pouze ke kolistinu. Takové kmeny se vyskytují nejvíce v Asii (Indie, JV Asie). Jejich rozšíření, podobně jako u multirezistentních MRSA kmenů a kmenů VRE, by znamenalo nástup postantibiotické éry – tedy konec účinnosti AML.

7 Závěr

Provedením testů, pomocí kterých je možné stanovit antibiogram, na vybraných vzorcích jsme se seznámili s principy a významem správné laboratorní praxe při stanovování antibiogramu. Pochopili jsme význam antibiogramu pro nastavení racionální cílené terapie, kde antibiogram pro daný vyšetřovaný kmen umožňuje deeskalaci ze širokospektré preemptivní léčby na léčbu cílenou. Cílená terapie napomáhá k omezení vzniku a šíření rezistence používáním co nejužšího spektra ATB volby. Preference pro ATB volby je nejlépe zjištěna vyšetřením citlivosti prokázaného původce infekce.

8 Seznam použité literatury

BERMINGHAM, Alun, Jeremy P. DERRICK. The folic acid biosynthesis pathway in bacterie: evaluation of potential for antibacterial drug discovery. *BioEssays* [online]. 21 June 2002, Vol. 24, issue 7, pp. 637 – 648, ISSN: 1521-1878. [vid. 09 March 2016]. Dostupné z doi: 10.1002/bies.10114.

BUSH, Karen, George A. JACOBY. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 7 December 2009, Vol. 54, issue 3, pp. 969-976, ISSN: 1098-6596. [vid. 28 March 2016]. Dostupné z doi: 10.1128/AAC.01009-09

CARRËR, Amélie, Laurent POIREL, M. YILMAZ, et al. Spread of OXA-48-Encoding Plasmid in Turkey and Beyond. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 19 January 2010, Vol. 54, issue 3, pp. 1369-1373, ISSN: 1098-6596. [vid. 30 March 2016]. Dostupné z doi: 10.1128/AAC.01312-09

CATTOIR V. Mechanisms of Antibiotic Resistance. 2016 Feb 10. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* [online]. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016. [vid. 13 March 2016].

Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK333414/>

ECDC. [online]. European Centre for Disease Prevention and Control. [vid. 30. March 2016]. Dostupné z: <http://ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx>

GOERING, Richard V, Hazel M DOCKRELL, Mark A ZUCKERMAN a Peter L CHIODINI, JULÁK, Jaroslav (ed.). *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Překlad Jan Bobek, Renáta Čermáková, Karel Holada, Zora Mělková, Tibor Moško, Jan Novák, Ludmila Prokešová, Jiřina Suchanová. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2016. ISBN 978-80-7387-928-0.

HRABÁK, Jaroslav, Václav VANIŠ, Tamara BERGEROVÁ, Pavla URBÁŠKOVÁ. Průkaz beta-laktamáz širokého spektra (ESBL) a typu AmpC u enterobakterií. *SZÚ*. [online] 18. červen 2008. [vid. 08. duben 2016]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/prukaz-beta-laktamaz-sirokeho-spektra-esbl-a-typu-ampc-u>

HRABÁK, Jaroslav, Helena ŽEMLIČKOVÁ. Výskyt multirezistentních gramnegativních bakterií v českých nemocnicích – upozornění na problém šíření bakterií produkujících transferabilní karbapenemázy. *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie. SZÚ*. [online] 2009, roč. 18, č. 3. ISSN: 1803-6422. [vid. 11. duben 2016]. Dostupné z: http://www.sneh.cz/_soubory/_clanky/12.pdf

HYNIE, Sixtus. *Farmakologie pro bakalářské studium, Díl 2*. 2. přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 1996. ISBN 80-7184-185-4.

HYNIE, Sixtus. *Farmakologie v kostce*. 2. vyd. Praha: Triton, 2001. ISBN 80-7254-181-1.

INOUE, Matsuhisa, Akio KUGA, Chieko SHIMAUCHI, Hisakazu YANO and Ryouichi OKAMOTO. Why do antimicrobial agents become ineffectual? *Yonsei Medical Journal*. [online]. December 1998, Vol. 39, issue 6, pp. 502–513, ISSN: 0513-5796. [vid. 03 March 2016]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.3349/ymj.1998.39.6.502>

JARLIER, V., M. H. NICOLAS, G. FOURNIER. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews on infectious diseases*. [online]. 1988, Vol. 10, issue 4, pp. 967-878, ISSN: 0162-0886. [vid. 20 March 2016]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3263690>

JOHNSON, Jarrod W., Jed F. FISHER, Shariar MOBASHERY. Bacteria cell-wall recycling. *Annals of the New York Academy of Sciences*. [online]. January 2013, Vol. 1277, pp. 54-75, ISSN: 1749-6632. [vid. 30 March 2016]. Dostupné z doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06813.x

JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN: 80-246-1270-4.

KOLÁŘ, Milan, Tomáš LÁTAL, Pavel ČERMÁK. *Klinicko-mikrobiologické podklady racionální antibiotické léčby*. Praha: Trios, 2002. 110 s. ISBN: 80-238-9301-7.

MASSOVA, Irina, Shariar MOBASHERY. Kinship and Diversification of Bacterial Penicillin-Binding Proteins and β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*

[online]. January 1998, Vol. 42, issue 1, pp. 1 – 17, ISSN: 1098-6596. [vid. 06 March 2016]. Dostupné z: <http://aac.asm.org/content/42/1/1.full#content-block>

MODI S. R., LEE H. H., SPINA C. S., COLLINS J. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature*. [online]. 11 July 2013, Vol. 499, issue 7457, pp. 219–222. ISSN: 0028-0836. [vid. 14 March 2016]. Dostupné z doi: 10.1038/nature12212

NORDMANN, P., L. POIREL. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection*. [online]. June 2002, Vol. 8, issue 6, pp. 321-331. ISSN: 1469-0691. [vid. 30 March 2016]. Dostupné z doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00401.x>

von NUSSBAUM, Franz, Michael BRANDS, Berthold HINZEN, et al. Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry – Exodus or Revival? *Angewandte Chemie International Edition*. [online]. 4 August 2006, Vol. 45, issue 31, pp. 5072-5129. ISSN: 1521-3773. [vid. 03 March 2016]. Dostupné z doi: 10.1002/anie.200600350

PIDDOCK, Laura J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. [online]. April 2006, Vol. 19, issue 2, pp. 382-402. ISSN: 1098-6618. [vid. 16 March 2016]. Dostupné z doi: 10.1128/CMR.19.2.382-402.2006

PORTON, A., L. POIREL, P. NORDMANN. Plasmid-mediated transfer of the bla(NDM-1) gene in Gram-negative rods. *FEMS Microbiology Letters*. [online]. November 2011, Vol. 324, issue 2, pp. 111-111thoma6. ISSN: 1574-6968. [vid. 13. March 2016]. Dostupné z doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02392.x.

QUEENAN, AM, K. BUSH. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. July 2007, Vol. 20, issue 3, pp. 440-458. ISSN: 1098-6618. [vid. 30 March 2016]. Dostupné z doi: 10.1128/CMR.00001-07

RELLER, L. Barth, Melvin WEINSTEIN, James H. JORGENSEN, Mary Jane FERRARO. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. [online]. 2009, Vol. 49, issue 11, pp. 1749-1755. ISSN: 1537-6591. [13 March 2016]. Dostupné z doi: 10.1086/647952

SCHARFEN, Josef. *Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii*. Praha: Nucleus HK, 2013. Mikrobiologie. ISBN 978-80-87009-32-1.

SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014. Sestra (Grada). ISBN: 978-80-247-4771-2.

SZÚ [online]. Státní zdravotní ústav. [30 March 2016]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/>

THOMAS C. M., NIELSEN K. M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. [online]. September 2005, Vol. 3, issue 9, pp. 711–721, ISSN: 1740-1526. [vid. 14. March 2016]. Dostupné z doi: 10.1038/nrmicro1234

URBÁŠKOVÁ, Pavla. *Rezistence bakterií k antibiotikům. Vybrané metody*. vyd. Praha: Trios, 1998. ISBN 80-238-3106-2.

URBÁŠKOVÁ, Pavla, Helena ŽEMLIČKOVÁ, Jaroslav HRABÁK. Jaké breakpointy používat pro interpretaci výsledků vyšetření citlivosti bakterií k antibiotikům? *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie*. SZÚ [online] 2010, roč. 19, č. 9, s. 266-267, ISSN: 1803-6422. [vid. 05. duben 2016]. Dostupné z:

http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/19_2010/09_zari/266_breakpointy.pdf

URBÁŠKOVÁ, Pavla, Jaroslav HRABÁK, Helena ŽEMLIČKOVÁ. Antibiotická rezistence bakterií – hrozba selhání léčby infekcí neustále sílí. *Medical Tribune*. [online]. 07. února 2012, roč. 8, č. 2, s. B6 – B7, ISSN: 1214-8911. [vid. 08. březen 2016]. Dostupné z: <http://www.tribune.cz/clanek/25673-antibioticka-rezistence-bakterii-hrozba-selhani-lecby-infekci-neustale-sili>

VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-86850-00-5.

WHEAT, Philip F. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. [online]. 2001, Vol. 48, Suppl. 1, pp. 1-4. ISSN: 1460-2091. [vid. 10 May 2016]. Dostupnost z doi: 10.1093/jac/48.suppl_1.1

von WINTERSDORFF, C. J. H., J. PENDERS, J. M. VAN NIEKERK, et. al.
Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal
Gene Transfer. *Front. Microbiol.* [online]. 19 February 2016, Vol. 7, issue 173, ISSN:
1664-302X. [vid. 14. březem 2016]. Dostupné z doi: 10.3389/fmicb.2016.00173

9 Seznam obrázků

Obrázek 1: Rozložení ATB disků při provedení testu DDST (Hrabák 2008)..... 42

10 Seznam tabulek

Tabulka 1: Identifikace vzorku č. 1, provedené testy, výsledky a hodnocení	44
Tabulka 2: Identifikace vzorku č. 2, provedný test, výsledek a hodnocení	44
Tabulka 3: Identifikace vzorku č. 3, provedené testy, výsledky a hodnocení	45
Tabulka 4: Výsledky screeningového testu produkce β -laktamas vzorku č. 3	45
Tabulka 5: Identifikace vzorku č. 4, provedené testy, výsledky a hodnocení	45
Tabulka 6: Identifikace vzorku č. 5, provedené testy, výsledky a hodnocení	46
Tabulka 7: Výsledky screeningového testu produkce β -laktamas vzorku č. 5	46
Tabulka 8: Identifikace vzorku č. 6, provedené testy, výsledky a hodnocení	46
Tabulka 9: Identifikace vzorku č. 7, provedené testy, výsledky a hodnocení	47
Tabulka 10: Výsledky screeningového testu produkce β -laktamas vzorku č. 7	47
Tabulka 11: Identifikace vzorku č. 8, provedené testy, výsledky a hodnocení	47
Tabulka 12: Výsledky screeningového testu produkce β -laktamas vzorku č. 8	48
Tabulka 13: Identifikace vzorku č. 9, provedené testy, výsledky a hodnocení	48
Tabulka 14: Identifikace vzorku č. 10, provedené testy, výsledky a hodnocení	49