



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

---

Fakulta biomedicínského inženýrství  
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Multirezistentné kmene v nemocniciach**

**Multiresistant stems in hospitals**

Bakalárska práca

Študijný program: Specializace ve zdravotnictví

Študijný obor: Zdravotní laborant

Vedúci práce: MUDr. Táňa Lázničková

**Miroslava Bodnárová**

---

**Kladno 2017**

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

Student:                   **Miroslava Bodnárová**  
Obor:                        Zdravotní laborant  
Téma:                       **Multirezistentní kmeny v nemocnicích**  
Téma anglicky:        Multidrug-resistant strains in hospitals

### Zásady pro vypracování:

Bakalářská práce pojednává o aktuální tématice vzrůstající rezistence bakteriálních kmenů na antibiotickou léčbu na půdě českých nemocnic. V teoretické části budou rozpracovaná témata o složení bakteriální buňky a mechanismech přenosu rezistence na dceřiné bakterie. Dále bude pojednáno o typech a chemickém složení antibiotických přípravků. Práce se soustředí především na kmeny bakterií, u kterých je problém s rostoucí rezistencí. Náplní praktické části je popsat metodiku identifikace rezistentních kmenů a statistické zhodnocení laboratorních výsledků rezistence bakteriálních kmenů v českých nemocnicích. K tomuto vyhodnocení budou použity výsledky laboratoří klinické mikrobiologie Synlab v Praze za období roku 2016.

### Seznam odborné literatury:

- [1] VOTAVA, Miroslav, Lékařská mikrobiologie obecná, Brno: Neptun, 2001, ISBN 80-902896-2-2
- [2] BEDNÁŘ, Marek, Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie, ed. 1. vydání, Praha: Marvil, 1996, ISBN 80-238-0297-6
- [3] ŠRÁMOVÁ, Helena, Nozokomiální nákazy, ed. 3. vyd. , Praha: Maxdorf, c2013. Jessenius, ISBN 978-80-7345-286-5
- [4] JINDRÁK, Vlastimil, Dana HEDLOVÁ a Pavla URBÁŠKOVÁ, Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnicích, ed. 1. vyd. , Praha: Mladá fronta, 2014. Aeskulap, ISBN 978-80-204-2815-8

Zadání platné do:   11.09.2018

Vedoucí:                MUDr. Táňa Lázničková

.....  
vedoucí katedry / pracoviště

.....  
děkan

V Kladně dne 11.09.2016

## Prehlásenie

Prehlasujem, že som bakalársku prácu s názvom Multirezistentné kmene v nemocniciach vypracovala samostatne len s použitím prameňov, ktoré uvádzam v zozname bibliografických odkazov.

Nemám závažný dôvod proti použitiu tohto školského diela v zmysle § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o práve autorskom, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon), v znení neskorších predpisov.

V Kladně dne 18.05.2017

.....  
Miroslava Bodnárová

## **Podakovanie**

Týmto sa chcem poďakovať v prvom rade vedúcej mojej bakalárskej práce MUDr. Táni Lázničkovej za poskytnutie materiálov a rady k úspešnému dokončeniu tohto diela. Rovnako sa chcem poďakovať pani Mgr. Jaroslave Chvojkovej za trpezlivosť a pomoc s drobnými korekciami, ktoré boli potrebné v práci urobiť. V neposlednom rade sa chcem poďakovať pánovi Ing. Štěpánovi Kratochvílovi za pomoc pri zosumarizovaní dát pre praktickú časť mojej práce.

## **Abstrakt**

Bakteriálna rezistencia sa stala významným faktorom v dĺžke a kvalite liečby nozokomiálnych infekcií. V tejto práci je pojednávané o dôležitej problematike v antibakteriálnej terapii, nakoľko sa každoročne ukazuje zvýšený výskyt rezistentných kmeňov. Úlohou tohto diela je v teoretickej časti zhrnúť informácie o princípoch vzniku rezistencie a mechanizme účinku antimikrobiálnych látok. Ďalej je pojednávané o rizikách spojených s rezistenciou baktérií pri nozokomiálnych infekciách.

V praktickej časti je zahrnutý popis metodiky identifikácie mikroorganizmov a stanovenie ich citlivosti voči antibakteriálnym preparátom. Následne boli vybrané najvýznamnejšie bakteriálne kmene, ktoré boli príčinou nemocničných nákaz v Nemocnici s poliklinikou v Mělníku a bola u nich preukázaná rezistencia k používaným antibiotikám.

Vo výsledkoch je zhodnotená miera rezistencie a citlivosti voči antibiotikám týchto kmeňov za obdobie prvého kvartálu roku 2016. Výsledky sú zozbierané z výsledkov laboratórií Synlab v Prahe. Tieto sú následne porovnávané so situáciou v Európe a vo svete.

## **Kľúčové slová**

Rezistencia; antibakteriálne látky;  $\beta$ -laktamázy; nozokomiálne nákazy; surveillance.

## **Abstract**

Bacterial resistance became a major element in length and quality of medical treatment in hospitals. This work deals with problems in antibacterial therapy, as there is higher occurrence of resistant strains every year. Theoretical part focuses on informations about origin and mechanism of resistance to antimicrobial agents. Further there it is dealt with risks of this resistance in hospital-acquired infections (HAI).

Practical part involves methods for identification of bacteria and susceptibility testing for antibacterial agents. From all the infections, some strains were selected here, that were important in HAI and they were tested for susceptibility. Results of resistant strains had been collected from patients of Mělník hospital.

Susceptibility of these strains had been evaluated for clinically important antibiotics from January to April 2016. Results came from Synlab microbiological laboratories in Prague. Those had been then compared to situation in other European countries.

## **Keywords**

Resistance; antimicrobial treatment;  $\beta$ -lactamase; hospital-acquired infections; surveillance.

## Obsah

1	Úvod .....	9
2	Súčasný stav.....	10
2.1	Bakteriálna bunka.....	10
2.1.1	Povrchové štruktúry .....	10
2.1.2	Vnútorne štruktúry .....	13
2.1.3	Genetické faktory podmieňujúce rezistenciu.....	15
2.2	Antibiotická terapia.....	16
2.2.1	Mechanizmus účinku.....	17
2.2.2	Vybrané druhy antibiotických preparátov .....	20
2.2.3	Rezistencia baktérií .....	26
2.2.4	Surveillance .....	27
2.3	Nozokomiálne nákazy .....	28
2.3.1	Epidemiológia nozokomiálnych infekcií .....	30
2.3.2	Vybraní pôvodcovia nemocničných nákaz .....	33
3	Cíl práce.....	39
4	Metodika .....	40
4.1	Gramovo farbenie a mikroskopické vyšetrenie vzoriek .....	41
4.2	Kultivácia.....	42
4.3	Identifikácia baktérií .....	44
4.3.1	Biochemické testy .....	44
4.3.2	Identifikácia pomocou MALDI-TOF .....	44
4.4	Testy citlivosti na antibiotiká .....	44
4.4.1	Diskový difúzny test.....	45

4.4.2	Dilučná metóda .....	46
5	Výsledky.....	47
6	Diskusia .....	53
7	Záver .....	56
8	Zoznam použitých skratiek.....	57
9	Zoznam použitej literatúry.....	59
10	Zoznam použitých obrázkov.....	63
11	Zoznam použitých tabuliek.....	64



# 1 ÚVOD

V boji s mikroorganizmami sa už vyše polstoročia využívajú antibakteriálne preparáty. Z historického hľadiska bol v tomto smere prevratný objav penicilínu. Už predtým sa však objavili zmienky o čínskych liečiteľoch, ktorý pre liečbu infekcií nôh u amerických indiánov používali určitý druh plesní. Tiež Tyndall v 19.storočí zistil, že zákal baktérií sa vyjasní, ak sa na povrchu nechá narásť pleseň. (1)

Užitočnosť antibiotík je však limitovaná rezistenciou niektorých kmeňov, čo predpovedal už i Fleming. To sa potvrdilo v 50-tych rokoch, kedy kmene *S.aureus* boli bežne rezistentné na penicilín. V rokoch 80-tych sa vyskytli i methicilín a oxacilín rezistentné kmene (MRSA) a následne sa v 90-tych rokoch objavili kmene vankomycín rezistentné (VRSA). Táto rezistencia sa potom medzidruhovo preniesla na kmene enterokokov (VRE). (1)

Rezistencia baktérií na antibiotiká komplikuje terapiu pacientov po tom, ako bol mikroorganizmus už izolovaný a identifikovaný. To vedie k problémom pri výbere vhodnej antibakteriálnej terapie zvlášť u imunokomprimovaných pacientov. (2) Antibiotická odolnosť voči antibiotikám tak následne spôsobuje zvýšenie mortality a morbidity, či nákladov na zdravotnú starostlivosť. Je preto nutná cielená, systémová a odborná aplikácia opatrení ako na národnej, regionálnej, tak i lokálnej úrovni. Tie by mali byť v súlade s Odporúčením Rady EÚ (2002/77/ES) o obozretnom používaní antimikrobiálnych látok v lekárstve a Odporúčením Rady EÚ z roku 2009 o bezpečnosti pacientov vrátane prevencie a kontroly infekcií spojených so zdravotnou starostlivosťou. (3)

## 2 SÚČASNÝ STAV

### 2.1 Bakteriálna bunka

Baktérie sú prokaryotické organizmy, ktorých veľkosť sa zvyčajne pohybuje od 1 do 5  $\mu\text{m}$ . Od eukaryotických organizmov ich odlišuje niekoľko znakov, z ktorých najvýraznejším je absencia jadrovej membrány a typického eukaryotického jadra. (1) Ďalšími znakmi sú, u väčšiny, kružnicový typ deoxyribonukleovej kyseliny (DNA), prítomnosť bunkovej steny, priebeh replikácie, transkripcie i translácie v cytoplazme, či absencia mnohých bunkových organel. Patria k najstarším organizmom na Zemi a vedia si obstaráť energiu z anorganických zdrojov. Niektoré evolúciou stratili túto schopnosť a uspôsobili sa na život závislý na hostiteľovi. (4)

Morfológiu baktérií je možné skúmať mikroskopicky, čo sa v diagnostike dodnes používa. Veľkosť medicínsky významných kmeňov je okolo niekoľkých  $\mu\text{m}$  a majú rozmanitý tvar – koky, tyčky, vlákna, vývršky atď. Tvar baktérií je pritom často špecifický pre jednotlivé druhy a rody baktérií a využíva sa pri ich identifikácii. (5)

#### 2.1.1 Povrchové štruktúry

Baktérie sú od okolitého prostredia oddelené cytoplazmatickou membránou a rôzne hrubou bunkovou stenou. Niektoré baktérie vytvárajú puzdro, ktoré slúži okrem iného ako obrana proti fagocytóze. Súčasťou vonkajších povrchov sú pili (*fimbrie*) a bičíky (*flagella*). (1)

#### Cytoplazmatická membrána

Plazmaléma je, podobne ako u eukaryotických organizmov, zložená zo semipermeabilnej fosfolipidovej dvojvrstvy a bielkovín. Jej hlavnou funkciou je udržiavanie podmienok vnútorného prostredia a obrana voči vonkajším vplyvom.

Súčasťou membrány sú tiež mnohé enzýmy využívajúce sa na metabolizmus živín a produkciu energie. (1) Obsahuje tiež permeázy a pumpy, ktoré slúžia na transport živín do bunky a transport metabolitov von. Niektoré bielkoviny slúžia na syntézu bunkovej steny, ako napr. transpeptidázové enzýmy, ktoré sú častým cieľom napríklad  $\beta$ -laktámových antibiotík. (4)

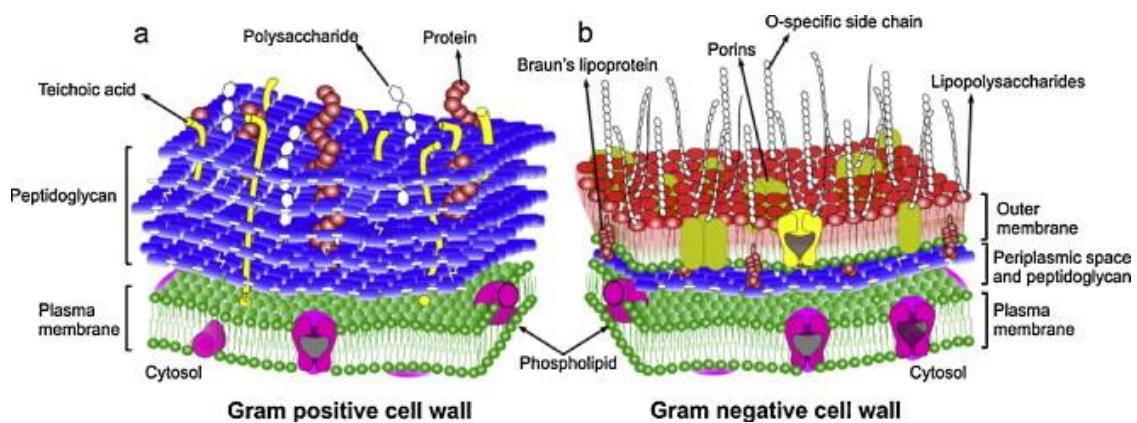
### **Bunková stena**

Bunková stena udáva tvar baktérií a predstavuje mechanickú obranu. Nakoľko cytoplazma obsahuje veľké množstvo látok, voda má tendenciu prúdiť do bunky po koncentračnom gradiente. Bez bunkovej steny by sa teda prokaryotická bunka roztrhla a zahynula. (1) To je dôvodom, prečo je súčasťou takmer všetkých bakteriálnych buniek. Táto dôležitá časť bunky chýba len u niektorých mikroorganizmov ako sú napr. mykoplazmy. (6)

Základom bunkovej steny prokaryot je peptidoglykán (mureín), ktorý je tvorený prepojenými monomérmi glykánov – N-acetylglukozamínov a kyseliny N-acetylmurámovej. Glykány sú produkované v cytoplazme a transportované z bunky, kde sa za pomoci enzýmov viažu na existujúcu bunkovú stenu glykozidickou väzbou a vytvárajú jednotlivé reťazce. Tieto sú navzájom spojené tetrapeptidmi viazanými na zvyšky kyseliny N-acetylmurámovej, a to pomocou transpeptidáz. Vytvárajú sa tak vrstvy bunkovej steny prokaryotickej bunky zodpovedné za jej pevnosť a stabilitu. Podľa ďalšej štruktúry bunkovej steny a tinkčných vlastností je možné väčšinu baktérií rozdeliť do 3 skupín – Gram-pozitívne ( $G^+$ ), Gram-negatívne ( $G^-$ ) a acidorezistentné baktérie. (7)

Bunková stena  $G^+$  baktérií je jednoduchšia a hrubšia. Je tvorená peptidoglykánom v mnohých vrstvách, ktoré sú popretkávané reťazcami teichoovej kyseliny (orientovaná kolmo na bunku, viď Obr.1). (8) Takáto štruktúra je pre imunitný systém človeka významným antigénom a aktivizuje nešpecifickú obrannú reakciu. (4)

Bunková stena  $G^-$  baktérií má odlišnú stavbu a je tvorená menším počtom vrstiev peptidoglykánov (niekedy len 2-3 vrstvy). Ich vonkajší povrch je však navyše chránený tzv. vonkajšou membránou. Tá je tvorená z lipoproteínov, ktoré spájajú vonkajšiu membránu s peptidoglykánmi, následne z fosfolipidovej dvojvrstvy, v ktorej sú nachádzané poríny pre transport živín a z lipopolysacharidu (LPS). Ten pozostáva z lipidu A a z polysacharidovej zložky, ktorá vyčnieva z membrány a je typická pre určitý sérotyp baktérie. LPS chráni bunku pred účinkom lyzozýmu, dodáva vonkajšej membráne pevnosť a tiež stimuluje imunitný systém. (7) Medzi vonkajšou membránou a peptidoglykánom je periplazmatický priestor, ktorý obsahuje enzýmy s rozličnou funkciou (transport, štiepenie, pohyb) a často obsahuje  $\beta$ -laktamázy, ktoré inaktivujú penicilíny. (4)



Obrázok 1: Bunková stena  $G^+$  a  $G^-$  baktérií [zdroj: <https://goo.gl/cvkZWQ>]

Bunková stena acidorezistentných baktérií je zložená z malého množstva peptidoglykánov a množstva štruktúr obsahujúcich lipidy (glykolipidy, kyseliny mykolová, vosky...), ktoré sú zodpovedné za jej vysokú nepriepustnosť. (7)

### Bičíky a fimbrie

Bičíky sú vlásenkové povrchové štruktúry baktérií, ktorých hlavnou funkciou je umožniť pohyb, najčastejšie v smere podnetu z prostredia (taxia). Pričom pohyb

bičička je závislý na prísune energie vo forme adenosín-trifosfátu (ATP). (1) Táto energia vzniká pri disimilačných (katabolických) procesoch v bunke a viaže sa v molekule ATP vo forme makroergných väzieb. (7) Bičičky sú väčšinou veľmi krehké a ľahko sa lámu. Bunke môže mať bičičku jeden, uloženú na póle, ale je možná prítomnosť viacerých bičičiek, môžu dokonca pokrývať celý povrch baktérie. Bičičky sú často diagnosticky špecifické a v tele hostiteľa môžu pôsobiť ako antigén a vyvolať tak reakciu imunitného systému človeka. (4)

Fimbrie sú štetinovité výbežky, ktoré sa nápadne podobajú chlúpkom – pili. Zatiaľ čo bičičky sa vyskytujú ako u  $G^+$ , tak i  $G^-$  baktérií, fimbrie sú takmer výlučne doménou  $G^-$  organizmov. Slúžia na adhéziu k rôznym epitelom, či erytrocytom (hemaglutinácia) a hrajú tak dôležitú úlohu v kolonizácii hostiteľa. Fimbrie sú podstatné tiež pre prenos genetickej informácie medzi bunkami – tzv. sex pili. (5)

### 2.1.2 Vnútorne štruktúry

V porovnaní s eukaryotickou bunkou je vnútorná štruktúra baktérií chudobnejšia. Pozostáva z bakteriálneho chromozómu (nukleoidu), ribozómov a množstva granulárnych inklúzií, ktoré obsahujú živiny. Všetky tieto štruktúry sa nachádzajú v prostredí cytoplazmy – voda, sacharidy, lipidy, enzýmy a iné bielkoviny. Niektoré baktérie sú schopné vytvárať dormantné štádiá, a môžu tak v bunke obsahovať i endospóry. (1)

### Genetická informácia

Väčšina bakteriálnej DNA sa nachádza v útvare nazývanom nukleoid a malá časť je prítomná vo forme plazmidov, transpozónov a pod. Veľkosť molekuly DNA niekoľkonásobne preyšuje veľkosť bunky, preto si mikroorganizmy vyvinuli stratégie na jej skrátenie, ako napr. tvorba záhybov a superšpiralizácia DNA. K tomu sú využité mnohé DNA-viažuce bielkoviny podobné histónom v eukaryotickej bunke. Chromozómová DNA baktérií býva uchytená na cytoplazmatickú membránu a replikuje sa z jedného počiatku nazývaného Ori. (9)

Plazmidy sú malé molekuly DNA, ktoré sa replikujú nezávisle od chromozomálnej, na čo majú svoj vlastný regulačný systém. Ne nesú gény nutné na prežitie a bunka bez nich dokáže existovať. Sú však veľmi významné, nakoľko môžu baktérie zvyhodňovať – obsahujú napr. gény pre toxíny, rezistenciu na antibiotiká a pod. Je tiež možný ich prenos na iné baktérie, a to i medzidruhovo. (1)

Transpozóny sú mobilné génové elementy, ktoré sú schopné premiestniť sa z jednej lokalizácie, či už na nukleotide alebo na plazmide, na iné miesto genómu. (7)

### **Ribozómy**

Ribozómy sú miestom proteosyntézy a sú zložené z bielkovín a RNA. Sú menšie a ľahšie ako u eukaryotov – v Svedbergových jednotkách (jednotka pre vyjadrenie sedimentačného koeficientu makromolekúl) je to 70S – 30S má malá podjednotka, 50S má veľká podjednotka. To je využívané u niektorých typov antibiotík, ktoré špecificky zastavujú proteosyntézu iba v bakteriálnych bunkách. (1)

### **Endospóry**

Niektoré druhy baktérií (*Bacillus*, *Clostridium*) tvoria endospóry v prípade nepriaznivých podmienok. Bunka zastavuje svoje životné funkcie a v dormantnom stave prečkáva toto obdobie. Spóra je vysoko dehydrované štádium bunky, ktoré obsahuje len genóm a základnú metabolickú mašineriu. (5) Sú rezistentné voči vysokým teplotám, ultrafialovému žiareniu, organickým rozpúšťadlami a dezinfekciám. (4)

Táto rezistencia je možná vďaka hrubej vrstve obalov, ktoré spóru chránia. Sporulácia sa začína replikáciou genetickej informácie, vychlípením cytoplazmatickej membrány a vytvorením septa, ktoré rozdelí bunku na dve nerovnaké časti obsahujúce genetickú informáciu. Menšia časť takejto bunky sa nazýva prespóra, tá sa obalí ďalšou vrstvou membrány. Medzi membránami sa vytvára kortex z peptidoglykánu. Do obalu budúcej spóry sa inkorporujú kalciové

soli a kyselina dipikolinová. Následne sa vytvorí vonkajšia membrána, plášť spóry a zvyšok vegetatívnej bunky sa rozpadne. (7) Pri vhodných podmienkach spóry následne germinujú a pokračujú v životnom cykle ako vegetatívne štádium. (1)

### **2.1.3 Genetické faktory podmieňujúce rezistenciu**

Genetická informácia, ktorá je uložená v bakteriálnom chromozóme, sa prenáša na potomkov pri replikácii, ktorá je semikonzervatívna. Jednotlivé gény sa následne môžu exprimovať koordinovane v skupinách – operónoch, alebo samostatne. Pričom platí, že genotyp mikroorganizmov sa môže v čase meniť, a to spontánnymi alebo indukovanými mutáciami. (4)

Frekvencia vzniku spontánnych mutácií u baktérií je relatívne nízka, ale nakoľko je počet deliacich sa baktérií počas infekcie (prípadne iných priaznivých podmienok) vysoký, pravdepodobnosť mutácií sa zvyšuje. (10)

Ako už bolo spomenuté, okrem chromozómu sú gény uložené na plazmidoch, ktoré sa replikujú i exprimujú nezávisle na chromozomálnej DNA. (4) Plazmidy nesúce gény pre rezistenciu sa označujú ako R-plazmidy a patria k najčastejším formám rezistencie u baktérií. (10) Ak sú baktérie vystavené pôsobeniu antibiotík, rýchlo a opakovane replikujú príslušné R-plazmidy, ktorých počet sa v bunke niekoľko stonásobne zvýši a baktéria odoláva pôsobeniu antibiotík. (9)

Ďalším typom DNA baktérií sú transpozóny, ako už bolo spomenuté. Sú to mobilné úseky DNA, ktoré sa prenášajú medzi plazmidmi, prípadne z plazmidov do chromozomálnej DNA a naopak. Na rozdiel od plazmidov nie sú schopné samostatnej replikácie. Môžu obsahovať rôzny počet génov rezistencie a v prípade, že sú integrované v plazmidoch, môžu sa následne ľubovoľne preniesť do ďalších i nepribuzných baktérií. Tam sa znova môžu integrovať do chromozomálnej DNA a ďalej sa šíriť. (10)

## **Prenos genetickej informácie**

V bakteriálnych bunkách prebieha prenos genetickej informácie, okrem replikácie, niekoľkými spôsobmi, pričom pre klinickú prax majú význam najmä:

- transdukcia;
- transformácia;
- konjugácia. (4)

Najdôležitejší prenos genetickej informácie medzi baktériami je konjugácia. Je to jav, pri ktorom sú baktérie v priamom kontakte a je možný prenos chromozomálnej alebo extrachromozomálnej DNA medzi nimi. (10) DNA-donorová bunka (F<sup>+</sup> bunka) sa spojí s receptormi bunky recipientnej (F<sup>-</sup> bunka) sex-pilom. Pričom gény pre jeho tvorbu a pre transfer DNA sa nachádzajú v samotnom plazmide a označujú sa pojmom fertility faktor – F-faktor. Je možná aj integrácia tohto faktoru do chromozomálnej DNA (hfr-bunky). Po vytvorení cytoplazmového mostu sa počas replikácie prenáša genetický materiál do recipientnej bunky. (9) Z epidemiologického hľadiska je tento prenos rezistencie najnebezpečnejší, nakoľko je možné preniesť gény i medzidruhovo. (5)

Transdukcia je prenos prostredníctvom bakteriofágu s následným prenosom na iné baktérie. Ide o málo častý dej a klinicky je málo významný. Pri transformácii je genetický materiál vychytávaný z prostredia a inkorporovaný do genómu homológou rekombináciou. (10) Pri tomto prenose však hrozia problémy zo strany DNáz, ktoré túto DNA môžu naštípiť ešte pred jej akceptovaním baktériou, prípadne recipientná bunka ani nemusí DNA prijať. (4)

## **2.2 Antibiotická terapia**

Chemoterapia je výraz používaný pre využitie chemických látok na selektívne zastavenie mikrobiálnej infekcie, ktoré majú zároveň minimálny účinok na hostiteľa. Nakoľko sa však v dnešnej dobe využíva skôr pre látky používané



k liečbe nádorov, pre liečbu bakteriálnych infekcií sa používa skôr termín antimikrobiálna terapia. Jej cieľom je usmrtenie alebo zastavenie rastu mikrobov a zahŕňa tiež látky, ktoré majú preventívnu funkciu, ako sú dezinfekčné prostriedky, či antiseptiká. (10)

Antimikrobiálne látky by mali spĺňať niekoľko základných vlastností – nesmú poškodzovať eukaryotické bunky alebo účinok na nich by mal byť minimálny, mali by účinkovať už v nízkych koncentráciách (v mg/l) a ich účinok by sa mal prejavíť v krátkej dobe po podaní tejto látky. (4) K ďalším významným vlastnostiam antibiotík (ATB) patrí rozpustnosť v telových tekutinách a ich ľahký priechod tkanivami. Ich následná metabolizácia v tele pacienta by nemala byť príliš rýchla, aby látka mala čas účinkovať na mikroorganizmy. Antibiotiká by mali mať, čo najmenší efekt na mikrofóru, ktorá sa v ľudskom tele bežne nachádza. (1)

Dôležitá je aj farmakokinetika antimikrobiálnych látok – ich absorpcia (vstrebávanie), ktorá je závislá na fyzikálno-chemických vlastnostiach látky, ceste podania, ale aj stave pacienta. Ďalej závisí na distribúcii liečiva do cieľových štruktúr, či jeho následnej biotransformácii (metabolizmus liečiva v tkanive) a eliminácii z organizmu. (10)

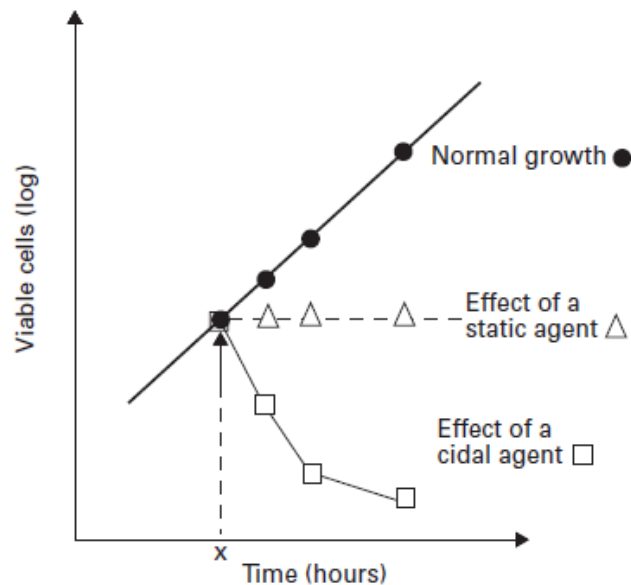
Sila, respektíve efektívnosť, jednotlivých ATB je vyjadrovaná terapeutickým indexom. Je to ratio medzi toxickou dávkou, kedy koncentrácia látky už poškodzuje hostiteľa, a terapeutickou dávkou, kedy je látka klinicky účinná voči patogénu. Terapeutický index by mal byť čo najvyšší. (1)

### **2.2.1 Mechanizmus účinku**

Podstatou účinku všetkých antibiotík je využiť citlivé miesto v bakteriálnej bunke, naviazať sa naň, a zabrániť tak jeho funkcii.

Účinok pritom môže byť:

- Baktericídny – usmrcuje baktérie v rámci terapeutických koncentrácií.
- Bakteristatický – zastavuje rast baktérií, pričom môže dôjsť aj k usmrteniu baktérií, ale spravidla až po prekročení terapeutických dávok. (10)



Obrázok 2: Rozdiel medzi baktericídny a bakteristatickým účinkom antibiotík [26]

Spoločným faktorom v mechanizme účinku antimikrobiálnych látok, ako už bolo povedané, je zásah do dôležitej funkcie bakteriálnej bunky a znemožnenie ďalších negatívnych vplyvov na hostiteľa. K najčastejšie využívaným mechanizmom patrí:

- inhibícia bunkovej steny;
- narušenie cytoplazmatickej membrány;
- interferencia s proteosyntézou;
- interferencia so syntézou nukleových kyselín. (1)

### Inhibícia bunkovej steny

Hlavnou skupinou, ktorá pôsobí na bunkovú stenu, sú  $\beta$ -laktámové ATB. Tie obsahujú  $\beta$ -laktámový kruh pôsobiaci na transpeptidázy baktérií.  $\beta$ -laktámy sa na nich ireverzibilne viažu a spôsobujú, že bunková stena sa síce naďalej syntetizuje,

ale je veľmi slabá a nestabilná. To spôsobí nefunkčnosť bunkovej steny, prienik vody do bunky a následne jej lýzu. (1) Do tejto skupiny patria prvé komerčne používané ATB ako penicilín, ale aj cefalosporíny a karbapenémy. Ďalej sa k nim priradujú tiež  $\beta$ -laktámové antibiotiká potenciované pridaním inhibítora  $\beta$ -laktamáz, monobaktámy alebo glykopeptidy. (10)

### **Narušenie cytoplazmatickej membrány**

Do tejto skupiny patria polypeptidové antibiotiká ako polymixíny, ktoré narušajú štruktúru fosfolipidov v membráne, a tým spôsobujú únik látok z bunky. Sú využívané pri liečbe infekcií pseudomonádami. Väčšinou sa predpisujú v kombinácii s inými antibiotickými látkami, ktoré pôsobia na bunkovú stenu či proteosyntézu. (1)

### **Interferencia proteosyntézy**

Látky ovplyvňujúce proteosyntézu mávajú vo väčšine prípadov pomerne široké spektrum účinku. Zasahujú rôzne miesta syntézy bielkovín na ribozóme, čím narušujú jej priebeh, prípadne sa viažu na mRNA alebo tRNA. (4) K typickým zástupcom skupiny interferujúcej proteosyntézu patria aminoglykozidy, tetracyklíny, či makrolidy. (11)

### **Interferencia funkčnosti nukleových kyselín**

Účinné látky tejto skupiny sa viažu na gyrázu alebo topoizomerázu IV, čím narušujú štruktúru nukleových kyselín. Prípadne môžu priamo spôsobiť zlomy na DNA. (4) Príkladom je rifampín, ktorý inhibuje RNA-polymerázu a bráni vytvoreniu mRNA pri transkripcii. Chinolónové antibiotiká zase bránia replikácii DNA, kedy je zabránené jej usporiadaniu v bunke v rámci nukleoidu a bunka následne praská. Ich účinok je baktericídny. (1)

## 2.2.2 Vybrané druhy antibiotických preparátov

### Penicilíny

Začiatok používania týchto látok sa datuje do vojnového obdobia 40-tych rokov minulého storočia. Vo všeobecnosti sú to účinné antimikrobiálne látky, ale zároveň sú jednoducho štiepené pôsobením bakteriálnych  $\beta$ -laktamáz (penicilináz), čím sa rozvinula početná rezistencia. (10)

Spoločnou štruktúrou penicilínov je 6-APA (6-aminopenicillanic acid) jadro. Nevýhodou penicilínov je, ako bolo vyššie uvedené, nestabilita voči bakteriálnym  $\beta$ -laktamázam, ktoré ich štiepia a tiež silné alergické reakcie. K prvým antibiotikám vôbec patrí benzylpenicilín (penicilín G), ktorý bol účinný špecificky na  $G^+$  baktérie. (1)

Penicilíny patria medzi baktericídne antibiotiká. Napájajú sa na špecifický proteín viažuci penicilín (PBP, penicillin binding protein), čo vedie k inhibícii syntézy reťazcov peptidoglykánov, ktorých hlavnou úlohou je spevnenie bunkovej steny, a to vedie k lýze bakteriálnej bunky. Maximálny účinok penicilínových antibiotík je na rastúcich kolóniách, a preto nie je vhodné ich kombinovať s bakteristatickými antibiotikami. (10)

Penicilíny je dnes možné rozčleniť do 4 základných skupín:

- Základné penicilíny s úzkym spektrom účinku, sú citlivé na penicilinázu a príkladom je penicilín G a V, ktoré pôsobia najmä na  $G^+$  baktérie. (11)
- Protistafylokokové penicilíny (isoxazolympenicilíny), ktoré sú odolné voči stafylokokovej  $\beta$ -laktamáze. Príkladom je oxacilín, ktorý je základným ATB pri väčšine stafylokokových infekcií, ak nie je preukázaný MRSA – methicilín rezistentný *S.aureus*. (11)
- Aminopenicilíny majú rozšírený účinok na niektoré  $G^-$  tyčky. Používajú sa najčastejšie na liečbu respiračných a močových infekcií. Príkladom je

ampicilín a amoxicilín, k aminopenicilínom s rezistenciou na  $\beta$ -laktamázy patria napr. ampicilín sulbaktam, či amoxicilín klavulanát. (11)

- Protipseudomonádové penicilíny (karboxypenicilíny a ureidopenicilíny) sú širokospektrálne látky pôsobiace i na *Pseudomonas aeruginosa* a príkladom je piperacilín a piperacilín tazobaktám. (11)

## Cefalosporíny

Cefalosporíny patria k ATB s baktericídnyim účinkom, ich jadro tvorí kyselina 7-aminocefalosporánová. Viažu sa na iné miesto PBP a dezinhibujú aktivity autolyzínov. Ich pôsobenie je teda baktericídne len pre baktérie, ktoré majú autolyzín. Výhodou je dobrá účinnosť a nízka toxicita, preto sa často využívajú v pediatrickej praxi a tiež pri liečbe starších osôb. (10) Sú pomerne stabilné a odolné voči hydrolýze laktamázami. Neúčinné sú však na enterokoky, MRSA alebo na baktérie s produkciou ESBLs (extended spectrum  $\beta$ -lactamases – široké spektrum  $\beta$ -laktamáz). Pri ich častom a nevhodnom užívaní vzrastá riziko ďalšieho rozširovania baktérií s produkciou ESBLs, a tým i rezistencie. (11)

V súčasnosti sú cefalosporíny zaradzované do 5 generácií. V rámci klinického využitia sa však zatiaľ využívajú len štyri. Prípravky 5.generácie sú v štádiu klinických skúšok (ceftobiprol, ceftarolín) a vyznačovať by sa mali vyššou účinnosťou proti pseudomonádam a nižším výskytom rezistencie (10):

1. generácia má účinok na stafylokoky, ktoré nie sú rezistentné na oxacilín, streptokoky a pneumokoky citlivé na penicilíny, príkladom je cefazolin. (11)
2. generácia má, oproti prvej, rozšírený účinok na niektoré G<sup>-</sup> baktérie vrátane hemofilov, príkladom je cefuroxim. (11)
3. generácia má vysokú aktivitu na G<sup>-</sup> baktérie (okrem *Pseudomonas aeruginosa*), príkladom je cefotaxim. Pri infekcii pseudomonádami sa využíva ceftazidim. (11)

4. generácia spája účinok na  $G^+$  a  $G^-$  baktérie a má vyššiu odolnosť voči rezistencii, príkladom je cefepim. (11)

### **Karbapenémy**

Sú ďalšou skupinou  $\beta$ -laktámových ATB pôsobiacich na bunkovú stenu. Sú pomerne dobre odolné voči  $\beta$ -laktamázam. Majú široké spektrum účinku na aeróbne i anaeróbne baktérie. Používajú sa ako rezervné antibiotické látky pri liečbe ťažkých nemocničných infekcií. Nie sú však účinné na MRSA a enterokoky. Ich nadmerné užívanie je rizikové pre zvýšenie selekcie prirodzene rezistentných kmeňov a následnému vzniku získanej rezistencie u iných. (11) Ich účinok je tiež toxickejší, napr. nefrotoxicite imipenému sa musí predchádzať intravenóznym podaním s cilastínom. Ďalšími príkladmi týchto antimikrobiálnych látok sú meropeném a ertapeném. (10)

### **Glykopeptidy**

Glykopeptidy patria medzi baktericídne ATB s mechanizmom inhibície bunkovej steny, kde blokujú posledný krok tvorby peptidoglykán-pentapeptid-pentaglycínového reťazca. To vedie k inhibícii syntézy bakteriálnej steny. (10) Majú veľký význam pre ich účinnosť na kmene MRSA a pri liečbe ťažkých seps a endokarditíd. Ich užívanie však musí byť kontrolované kvôli toxicite. (11) Príkladom je dnes často využívaný vankomycín, ktorý má ale pomerne úzke spektrum účinku, a to na  $G^+$  baktérie. K najvýznamnejším vedľajším účinkom patrí generalizovaný erytém, nefrotoxicita a ototoxicita. (10)

### **Aminoglykozidy**

Sú baktericídnymi antibiotikami, ktoré sú najúčinnnejšie na enterobaktérie, pseudomonády a stafylokoky. (11) Mechanizmom účinku je inhibícia proteosyntézy, kedy sa viažu na malú podjednotku ribozómov, a tým blokujú iniciačný komplex. To vedie k chybnému čítaniu transkriptu a vytváraniu nesprávnych bielkovín. (1)

Sú využívané najmä v nemocničnej starostlivosti. Patria sem prirodzené látky (napr. streptomycín, gentamicín, kanamycín, tobramycín), ale aj polosynteticky pripravené farmaká (napr. amikacín, netilmicín). Ich štruktúru väčšinou tvoria konjugáty aminoglykozidových a aminocyklitolových štruktúr. Nevýhodou je nutnosť parenterálneho podania, nakoľko ich perorálne vstrebanie nie je možné. (10)

### **Tetracyklíny a glycylycyklíny**

Obe patria k liečivám s bakteristatickým účinkom a k inhibítorm proteosyntézy. Napájajú sa na malú podjednotku ribozómov a bránia naviazaniu aminoacyl-tRNA, čím sa znemožní proteosyntéza. Ich výhodou je schopnosť prechádzať tráviacim traktom (možnosť užívať ich perorálne) a tiež ich široké spektrum účinku. Kvôli tomu sa často predpisovali, čím vznikla rezistencia a významne sa poškodzovala prirodzená mikroflóra pacientov. (1) Éra tetracyklínov je preto dnes skôr minulosťou. Jadrom tetracyklínov tvorí tetracyklus, na ktorý sa následne viažu rôzne radikály. Negatívom je častá tendencia k tvorbe chelátov, čím vznikajú ťažko rozpustné soli. (10)

Glycylycyklíny nadväzujú na tetracyklíny a sú používané pri infekciách MRSA, VRE (vankomycín rezistentné enterokoky), baktériami s produkciou ESBLs a pod. (11) Ich výhodou je, že predchádzajú rozvoju rezistencie, nakoľko ovplyvňujú eflux antibiotika von z bunky. (10) Významnými zástupcami v praxi sú doxycyklín a tigecyklín. (11)

### **Makrolidy**

Patria k bakteristatickým ATB a ich účinok spočíva v inhibícii proteosyntézy v bunke. Pôsobia na 50S podjednotku ribozómov, kde sa naviažu a znemožnia tvorbu peptidickej väzby medzi aminokyselinami. (1)

Typickú štruktúru makrolidov tvorí makrocyklický laktón so 14-členným (erytromycín, klaritromycín a diritromycín), 15-členným (azitromycín) alebo 16-členným kruhom (josamycín, spiramycín a ostatné makrolidy). (10)

Vo všeobecnosti sa makrolidy používajú pri ľahších až stredne závažných infekciách v ambulantnej terapii. (10) Používajú sa v boji s  $G^+$  a niektorými  $G^-$  baktériami, pre  $G^-$  tyčky, enterokoky a anaeróbne mikroby sú neúčinné. Aj u tejto skupiny ATB je riziko rýchleho narastania rezistentných kmeňov. Pri ich užívaní je tiež nutné sledovať ich hladinu, nakoľko majú tendenciu kumulovať sa v tkanivách. (11)

Erytromycín, ako zástupca tejto skupiny, sa izoloval už v polovici 20.storočia. Následne sa vyvinulo niekoľko generácií makrolidov, aby sa zlepšil farmakokinetický profil a rozšíril ich účinok:

1. generácia – erytromycín, spiramycín, oleandomycín, josamycín.
2. generácia – roxitromycín, klaritromycín, diritromycín, azitromycín (azalid).
3. generácia – telitromycín (ketolid). (10)

## **Linkozamidy**

Sú bakteristatické liečivá, ktoré inhibujú proteosyntézu v bunke, najmä syntézu niektorých toxínov (využitie proti stafylokokovému alebo streptokokovému toxickému šoku). Ich štruktúru tvoria aminokyseliny naviazané na aminosacharidy. Výhodná je ich lipofilita, takže ľahšie prenikajú do tkanív a buniek. (10)

Využitie je pri infekcii  $G^+$  kokmi a anaeróbmami. Výhodou je možnosť ich použitia v oblastiach, ktoré sú ťažko dostupné pre  $\beta$ -laktámové látky. Rezistencia však vzniká veľmi rýchlo. Príkladom je klindamycín alebo linkomycín. (11) Klindamycín je liekom prvej voľby pri liečbe stafylokokových infekcií, keďže aj kmene MRSA sú



naňho dostatočne citlivé. Vedľajším účinkom u rizikových pacientov je pseudomembranózna kolitída. (10)

### **Oxazolidinóny**

Majú bakteristatický účinok a patria rovnako k inhibítorm proteosyntézy. Ovpływňujú 50S podjednotku ribozómov tak, že bránia úvodnej časti translácie. Nebola zistená skrížená rezistencia s inými ATB. (10)

Účinnosť je najmä na  $G^+$  aeróbne baktérie. Vďaka svojej štruktúre a málo rozšírenej rezistencii sú účinné aj na rezistentné kmene (MRSA, VRE, či penicilín rezistentné pneumokoky). Z tohto dôvodu sú využívané ako alternatívna liečba pri nemocničných infekciách, kedy nie je možné použiť iné lieky. Príkladom je linezolid. (11)

### **Chinolóny**

V dnešnej dobe sa využívajú najmä deriváty s fluórom, ktoré patria k novším generáciám chinolónových liečiv. Mechanizmom účinku je ovplyvnenie funkcie enzýmov ako DNA-gyráza, či topoizomeráza IV, ktoré sú zodpovedné za štruktúru nukleových kyselín. Po interakcii s liečivom sa DNA nedokáže vrátiť do natívneho stavu a bunka nie je schopná ďalšej existencie. Účinok je tak baktericídny. (10)

V klinickej praxi sa využívajú najmä ofloxacín a ciprofloxacín, ktoré sa dobre distribuujú do celého systému a majú vysokú biologickú dostupnosť pri perorálnom podávaní. Nie je možné ich použitie u detí a je nutná kontrola ich užívania kvôli vzniku rezistencií. Patria k širokospektrálnym látkam, ktoré sa často využívajú k liečbe respiračných ochorení (najmä nozokomiálnych pneumónií). (11)

### 2.2.3 Rezistencia baktérií

Antimikrobiálna rezistencia je vlastnosť mikroorganizmov, ktorou odolávajú účinku jedného alebo viacerých antibiotických preparátov. Dôsledky rezistencie môžu byť vážne, nakoľko ovplyvňujú nielen bežnú lekársku prax, ale i liečbu po zložitých chirurgických zásahoch, transplantáciách, či pri liečbe rakoviny, kedy sú pacienti oslabení. (12) Rezistencia je pritom výsledkom vývoja, kedy sa v baktériách vyvinuli genotypové a fenotypové znaky, ktoré im umožňujú odolať negatívnemu účinku ATB. (4)

Jednotlivé druhy baktérií môžu byť súčasne rezistentné na viaceré typy účinných látok. Ak ide o príbuzné ATB, môže ísť o skrížené rezistencie, u rôznych typov ATB ide skôr o kumuláciu mechanizmov rezistencie. Selektívnym tlakom antibiotík sa postupne vyvíjajú prirodzene rezistentné kmene, ktoré následne túto vlastnosť renášajú na svoje potomstvo – vertikálny prenos. Gény rezistencie sa však môžu prenášať i horizontálne – z bunky na bunku transdukciou, transformáciou a konjugáciou, ako to bolo uvedené v kapitole 2.1.3. (4) Významným markerom prenosu rezistencie baktérií je ich prenos medziľudským kontaktom. (10)

Prirodzenú odolnosť baktérií voči antimikrobiálnym preparátom spôsobuje niekoľko rôznych biochemických mechanizmov:

1. Produkcia enzýmov, ktoré rozrušia alebo modifikujú antibiotickú látku.
2. Modifikácia cieľového miesta pôsobenia ATB.
3. Modifikácia metabolizmu baktérií.
4. Bakteriálny eflux ako prevencia kumulácie škodlivých látok. (13)

Tabuľka 1: Problémové rezistencie baktérií na antibiotiká. (upravené podľa zdroja: 10)

Bakteriálny kmeň	Antimikrobiálna látka	Mechanizmus rezistencie
<i>Staphylococcus aureus</i>	protistafylokokové penicilíny	Génom <i>mecA</i> kódovaný odlišný PBP.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> a <i>Escherichia coli</i>	cefalosporíny 3.generácie	Prenos génov laktamázy so širokým spektrom účinku (ESBL).
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meropeném, imipeném	Gén KPC kódujúci rezistenciu na meropeném, uložený na mobilných elementoch.
<i>Enterobacteriaceae</i> sp.	fluorochinolóny	Prijatie génu kódujúceho tvorbu proteínov Qnr (quinolone resistance)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> a <i>Acinetobacter</i> sp.	meropeném	Prijatie integrónu IMP kódujúceho gény pre multirezistenciu

#### 2.2.4 Surveillance

Príčiny rezistencie sú často u jednotlivých druhov rovnaké i v rôznych oblastiach sveta. Napríklad u kmeňu *S. aureus* je rezistencia na  $\beta$ -laktámové ATB spôsobená prítomnosťou génu *mecA*, rezistencia pneumokokov na penicilíny je spôsobená zase mutáciou génu pre alternatívny PBP a pod. Príčinou rastúceho počtu rezistentných kmeňov je tiež nízka úroveň hygieny, migrácia obyvateľstva, či neuvážené používanie antimikrobiálnych látok. (11)

Práve kvôli rozšíreniu multirezistencie vzniklo vo svete množstvo národných a medzinárodných systémov pre jej monitoring. Ten spočíva v zbieraní dát, ich analýze a prezentácii. Tieto informácie sa potom dostávajú k lekárom a zdravotníkom v jednotlivých krajinách. (4)

Surveillance sa uskutočňuje na miestnej (situácia v nemocniciach), štátnej (organizovaná zdravotnou službou) a globálnej úrovni (epidemiologický prieskum vytipovaných kmeňov). V Európe je tento monitoring uskutočňovaný Európskou

sieťou antibiotickej rezistencie (EARSS). Tá spracováva a analyzuje dáta každoročne a výsledky sú dostupné na ich webových stránkach. (4)

Program pre surveillance nozokomiálnych nákaz je určený na sledovanie vzniku a šírenia infekcií v prostredí nemocníc. Tiež pomáha určiť opatrenia na potlačenie a elimináciu týchto nákaz. Je to veľmi flexibilný program, neustále sa rozvíja a mení v dôsledku nových poznatkov, nových prístrojových vybavení a metód. (14)

Surveillance má mať represívny a preventívny charakter. Represívne opatrenia slúžia na likvidáciu ohnisk nákazy, ktoré už v zariadení vypukli. Takýto výskyt je nutné nahlásiť (podľa vyhlášky 306/2012 Sb.), pacientov izolovať a preliečiť. Následne je nutné izolovať aj agens nákazy, zistiť jeho antibiogram a ďalšie vlastnosti. Samozrejmosťou je dezinfekcia ohniska nákazy a odstránenie kontaminovaných predmetov. Úlohou preventívnych opatrení je predísť vzniku a šíreniu infekcií. Ide najmä o zavedenie protiepidemiologického a hygienického režimu, ktorý je popísaný v prevádzkovom poriadku zariadenia. (14)

### **2.3 Nozokomiálne nákazy**

Nemocničnou nákazou (NN), resp. hospital-acquired infection (HAI), sa myslí ochorenie exogénneho alebo endogénneho pôvodu, ktoré vzniklo pobytom osôb v zdravotníckom zariadení. Nie sú to len infekcie, ktoré vznikli v priebehu hospitalizácie, ale aj infekcie, ktoré sa prejavia až po ukončení hospitalizácie a prepustení pacienta do domácej liečby, prípadne po preložení pacienta na iné oddelenie zdravotníckeho zariadenia (ZZ). (13)

Nepatria sem ochorenia, s ktorými je pacient prijatý do zariadenia alebo tie, ktoré sa v nemocničnom prostredí len manifestujú. Tiež sem nepatria nákazy nemocničného personálu, ktoré vzniknú pri výkone ich povolania. (15)

V ZZ, ako ohraničenom ekosystéme, sa uplatňujú iné podmienky ako v komunitných či prírodných systémoch. Základným znakom je vyššia rezistencia agens na antimikrobiálne prípravky a dezinfekciá. Tieto vlastnosti sa prenášajú plazmidovou DNA na iné nepatogénne alebo podmienene patogénne kmene, ktoré sa následne stávajú súčasťou nemocničnej flóry. Významným faktorom tiež býva, že hostiteľom už nie je zdravý jedinec, ale osoba so zníženou imunitou, ktorá je vystavená rôznym terapeutickým a diagnostickým postupom. (16) V poslednom období sú NN príčinou rastúcej morbidity a mortality vo svete. Vážny dopad nozokomiálnych infekcií je najmä v predĺžení hospitalizácie pacientov, a tým zvýšenia nákladov na ich liečbu. (13) Tiež majú veľký vplyv na emocionálnu a zdravotnú stránku pacienta a niekedy môžu viesť k zhoršeniu jeho kvality života. (17)

NN môžeme rozdeliť na infekcie:

- Nešpecifické, ktoré odrážajú epidemiologickú situáciu v zdravotníckom zariadení (chrípky, hnačky...) a špecifické, ktoré vznikli v dôsledku diagnostického alebo terapeutického zákroku a súvisia s ošetrovaním pacienta. (16)
- Endogénneho charakteru, pričom v tomto prípade ide o agens z pacientovej mikroflóry. Ochorenie nemá inkubačnú dobu, nie je nákazlivé v bežnom slova zmysle a nevzniká voči nemu imunita. (16)
- Exogénneho charakteru, kedy ide o prenos na alebo do tela pacienta z vonkajšieho prostredia, resp. zdroja nákazy. Pričom zväčša platí, že do piateho dňa hospitalizácie sa uplatňujú najmä endogénne nákazy a neskôr nákazy exogénneho pôvodu. (16)

Z dôvodov uvedených na začiatku kapitoly by pôvodcovia NN mali byť rýchlo identifikovaní, najmä v prípade hromadného výskytu. Základom je určenie mikroorganizmu stanovením jeho morfológie, biochémie a metabolickej aktivity.

Ďalej sa využívajú typizačné metódy (sérotypizácia, fagotypizácia, stanovenie toxínov...) a hlavne stanovenie citlivosti na dezinfekčné prostriedky a antibiotiká, či chemoterapeutiká. V dnešnej dobe je možné využitie moderných molekulárnych typizačných metód, či genotypizácie.

### 2.3.1 Epidemiológia nozokomiálnych infekcií

Epidemiológia infekčných ochorení skúma zákonitosti a vzťahy medzi faktormi vyvolávajúcimi ochorenie, prostredím a hosťiteľom. Šírenie nákazy sa nazýva tiež epidemiologický proces a charakterizuje ho:

- prítomnosť zdroja pôvodcu nákazy;
- prenos nákazy;
- prítomnosť vnímavého hosťiteľa. (6)

#### Zdroj nákazy

Najčastejšími zdrojmi nemocničných infekcií bývajú pacienti alebo zdravotnícky personál, menej často to môže byť i návštevník ZZ alebo iná osoba, ktorá príde do kontaktu s pacientom. Je možný tiež kontakt s kontaminovanou vodou, pôdou či potravinami. (15)

Pacient ako hlavný zdroj nákazy v rámci HAI môže byť nebezpečný pre seba, kedy sa infikuje svojou vlastnou prirodzenou mikroflórou, ale aj pre iné oslabené osoby vo svojom okolí. Eliminácia takého zdroja je takmer nemožná. Ďalším častým zdrojom nákaz je personál nemocnice, buď ako prenášači ochorení bez zjavných príznakov alebo nesprávnou resp. nedostatočnou hygienou rúk a následnou kontamináciou okolia. (11)

U zdroja nákazy je dôležité, akou formou prebieha ochorenie. Najjednoduchšia je diagnostika a liečba manifestnej infekcie, nakoľko je možná rýchla identifikácia príznakov. Nebezpečné sú v tomto prípade skôr atypické príznaky, ktoré nemusia

byť včas diagnostikované a dôsledkom je neskoré zavedenie prípadného protiepidemiologického režimu. Ďalším nebezpečným zdrojom nákazy je prenášač. U nosičstva je typické, že osoby prenášajú a vylučujú infekčné agens bez zjavných príznakov ochorenia. Nosičom môže byť asymptomatický človek, osoba v inkubačnej dobe, nosiči rekonvalescentní a chronickí nosiči. (15)

### **Prenos nákazy**

Prenos zdroja nákazy na vnímavého jedinca je u ľudí možný niekoľkými bránami vstupu – kožou, sliznicami dýchacieho traktu, alimentárnou cestou, spojivkou a urogenitálnym traktom. (16)

Najčastejšou cestou prenosu agens v ZZ je prenos priamym alebo nepriamym kontaktom, pričom túto cestu je možné jednoducho eliminovať dodržiavaním pravidiel dezinfekcie a dekontaminácie. Prenos kvapôčkami sa týka skôr prenosu vírusových respiračných ochorení. Prenos krvou je významný najmä u niektorých vírusových ochorení a nastáva pri poranení sa ostrými predmetmi, ktoré boli kontaminované krvou infikovaných osôb. Špecifickým druhom prenosu infekcie je prenos endogénny, kedy rezervoárom infekcie je samotný pacient. (11)

Najvýznamnejšou bránou vstupu infekcie je koža, najmä ak je jej celistvosť narušená. (15) Vo väčšine prípadov sa mikrobiálna infekcia obmedzí len na epiteliálne bunky, ale je možné i ďalšie rozšírenie na iné časti tela hostiteľa. (6)

Prenos nákazy prebieha:

- Priamo – typická je prítomnosť zdroja nákazy a hostiteľa súčasne na jednom mieste. Infekcia sa pritom prenáša z brány výstupu infikovaného jedinca na bránu vstupu vnímavého jedinca. K priamemu prenosu dochádza najčastejšie kontaktom slizníc, či kvapôčkovou infekciou. (16)
- Nepriamo – ide o prenos sprostredkovaný, nie je preto potrebná súčasná prítomnosť hostiteľa a zdroja nákazy. Prenos nastáva kontaktom

vnímavého jedinca s kontaminovanými predmetmi, vodou, pôdou či potravinami, vzduchom alebo prostredníctvom vektora. (16)

### **Vnímový jedinec**

Vnímový jedinec je posledným článkom v šírení infekcie, pričom o vnímavosti osôb pri expozícii infekčnému agens môže rozhodovať viacero faktorov. Nemusí totiž vždy dôjsť k infekcii a zároveň, infekcia ešte nemusí znamenať ochorenie alebo jeho manifestáciu. (6)

V prípade, že je vnímavým jedincom pacient ZZ, je nutné venovať pozornosť špecifickým rizikovým faktorom, ktoré túto skupinu odlišujú od bežnej populácie. Pri expozícii pacientov rovnakému patogénu je reakcia naňho rôzna a infekcia bakteriálnym kmeňom sa prejaví len u časti kolonizovaných osôb. Hlavným rizikovým faktorom je v týchto prípadoch stav obranyschopnosti pacientov. (11)

Imunita pacienta je ovplyvňovaná hlavne extrémom vo veku pacienta – ohrození sú novorodenci, ktorí ešte nemajú dostatočne vyvinutú obranyschopnosť a staršie osoby, ktorí už imunitu nemusia mať dostatočne funkčnú. Ďalším faktorom je stav, v ktorom je pacient do ZZ prijatý. Akútne stavy, či chirurgické zásahy znižujú obranyschopnosť chorého (napr. narušením prirodzených ochranných bariér). Používanie antimikrobiálnych preparátov pri liečbe následne vyvíja selekčný tlak na mikroorganizmy, čo je ďalším rizikovým faktorom pre vzplanutie infekcie. Komorbidity a malnutricie môžu tiež zvyšovať predispozíciu k vzniku následných ochorení. V neposlednom rade sú ohrození i pacienti s umelými implantátmi alebo so zavedenými katétami, pľúcnou ventiláciou a pod. (11)

### **Sledovanie nákaz v nemocniciach**

Cieľom epidemiologického sledovania NN je objasnenie etiológie, epidemiologických charakteristík týchto ochorení, overenie hypotéz



vytvorených na základe predchádzajúcich poznatkov a následné zavedenie protiepidemiologických opatrení. To sa deje troma základnými metódami:

1. Deskriptívna metóda – zaoberá sa frekvenciou NN a dynamikou ich zmien, sleduje ich chorobnosť, úmrtnosť a smrteľnosť. Je dôležité charakterizovať nakazené osoby, miesta a čas výskytu nákaz (epidemický, endemický alebo len sporadický výskyt).
2. Analytická metóda – overuje hypotézy vytvorené na základe výsledkov deskriptívnych metód. Sledovanie prebieha na skúmanej a kontrolnej skupine. Tieto metódy môžu byť buď longitudinálne (prospektívne alebo retrospektívne) alebo prierezové.
3. Experimentálna metóda – overuje výsledky analytických metód tým, že sa uskutoční zásah, ktorého účinnosť sa následne skúma kvôli možnosti budúcej prevencie. (15)

Na štúdium týchto metód sa využívajú incidenčné a prevalenčné štúdie. Pričom incidenčné štúdie (sleduje sa výskyt ochorení) patria k najspoľahlivejším a najpresnejším, ale sú časovo, personálne a finančne náročné. Prevalenčné štúdie, naproti tomu, poskytujú okamžitý obraz o výskyte NN v zdravotníckom zariadení, sú teda rýchle, nenáročné a lacné. (16)

### **2.3.2 Vybraní pôvodcovia nemocničných nákaz**

Rozvoj infekčného procesu je vzťahom dvoch odlišných biologických systémov – makroorganizmu a mikroorganizmu s rôznou mierou invazivity a patogenity. Zastúpenie jednotlivých druhov mikróbov v rámci NN sa líši podľa typu infekcie alebo typu oddelenia, v ktorom infekcia prebieha, hygienickými podmienkami a pod. Za najčastejších pôvodcov sú však podľa štatistík považované stafylokoky, streptokoky, rod *Enterobacteriaceae*, pseudomonády a sporujúce alebo nesporujúce anaeróbne baktérie. U vysoko vnímavých jedincov sa musí rátať aj s inými bežne nepatogénnymi kmeňmi. (15)

### **Methicilín rezistentný *Staphylococcus aureus***

*S.aureus* je G<sup>+</sup> fakultatívne anaeróbna baktéria, ktorá môže byť bežnou súčasťou mikroflóry človeka, ale aj pôsobiť ako patogén. Nástrojmi virulencie sú najmä povrchové proteíny, ktoré uľahčujú adhéziu, proteín A alebo proteíny brániace fagocytóze. Zároveň sú tieto baktérie schopné produkovať inhibítory chemotaxie buniek – leukocidíny, ktoré napomáhajú šíreniu infekcie. Dôležitým faktorom virulencie je tiež produkcia penicilinázy, ktorá hydrolyzuje penicilíny a bráni im tak v naviazaní na PBP. Z tohto dôvodu bolo zavedené užívanie methicilínu (u nás oxacilínu), ktorého veľké bočné reťazce bránili pôsobeniu penicilináz. Už v 60-tych rokoch sa však objavili kmene rezistentné i na toto antibiotikum. (18)

Rezistencia k methicilínu spočíva v tom, že baktéria produkuje nový proteín pre väzbu penicilínu, čo je zakódované v géne *mecA*, ten spôsobí v konečnom dôsledku znemožnenie účinnosti antibiotika. V tomto prípade to však znamená rezistenciu na všetky β-laktámy. (14) Lieky potrebné na liečbu infekcií MRSA sú preto drahšie, majú výraznejšie vedľajšie účinky a ich užívanie je nutné zodpovedne monitorovať. (19)

Prenos MRSA je najmä priamym kontaktom s infikovaným tkanivom alebo s kolonizovanou osobou. V rámci NN spôsobujú tieto baktérie kožné infekcie, gastroenteritídy, pneumónie, infekcie močových ciest, endokarditídy či bakterémie. Zvýšené riziko infekcie majú pacienti imunosuprimovaní, diabetici, pacienti na dialýze, po chirurgickom zákroku, s umelou ventiláciou alebo so zavedenými katétami. Kultivácia sa vykonáva z krvi, spúta, moču alebo stery z infikovaných častí tela. Výtery z nosa sa využívajú na skrining možnej kolonizácie pacientov, a teda minimalizovanie rizika nosičstva. (18)

### **Vankomycín rezistentné enterokoky**

Enterokoky sú G<sup>+</sup> fakultatívne anaeróbne baktérie, ktoré sú bežnou súčasťou bakteriálnej mikroflóry človeka. Sú to veľmi odolné a nenáročné organizmy. Sú

častými pôvodcami nozokomiálnych močových infekcií, infekcií chirurgických rán a krvného riečiska. Pričom tieto infekcie môžu byť endogénneho i exogénneho pôvodu. (14)

U enterokokov sa rozšírila rozsiahla získaná rezistencia na penicilín, ampicilín, aminoglykozidy či glykopeptidy. (18) Rezistencia na vankomycín je spájaná najmä s génovými kazetami *vanA* a *vanB*, ktoré sa často vyskytujú v plazmidoch. Pričom pri rezistencii na vankomycín, u týchto baktérií, nebola dokázaná mutácia *de novo* ani pod selekčným tlakom antibiotík. (20) Ide o gény kódujúce ligázu, ktorá pri syntéze bunkovej steny začlení D-laktát namiesto D-alanínu, čím je podstatne znížená afinita na vankomycín. Rezistencia na vankomycín je nebezpečná z klinického, ako aj z epidemiologického hľadiska, nakoľko je možný jej prenos plazmidmi na iné enterokoky ako aj na iné druhy baktérií (napr. stafylokoky). (14)

Pre diagnostiku enterokokov sa využíva kultivácia zo vzoriek ako krv, moč a iné telesné tekutiny. Rýchlejšou cestou je dnes diagnostika a skrining prostredníctvom PCR metód zo sterov análneho otvoru alebo zo stolice. (18)

### ***Clostridium difficile***

*Clostridium difficile* sú G<sup>+</sup> anaeróbne bacily, pomerne náročné na kultiváciu, ktoré dokážu existovať vo vegetatívnej forme, v ktorej produkujú toxíny a dormantnej forme vysoko rezistentných spór. (21) V rámci aktívnej formy tvoria 2 toxíny – A (enterotoxín) a B (cytotoxín) – tie sú považované za hlavné faktory virulencie. Špecificky sa viažu na epitelové bunky tenkého čreva, kde spôsobujú zápalové reakcie a poškodenie mukózy čriev. (22)

V súčasnosti patria k významným pôvodcom nozokomiálnych nákaz, kedy pacientom spôsobujú infekcie rôznej závažnosti. Táto baktéria je prirodzene rezistentná voči mnohým antibakteriálnym látkam, čo liečbu ochorenia komplikuje. Infekcie sa môžu prejaviť ako banálna hnačka, ale aj ako život

ohrozujúce ochorenie, ktoré sprevádza paralytické ileum a bolestivé rozopnutie tračníka. Ďalšou formou ochorenia je rekurentná kolitída s opakovanými hnačkami alebo pseudomembránózna kolitída. Neprijemnosťou je najmä komplikácia vo forme relapsov (kvôli tvorbe spór), kedy sa infekcie môžu opakovať až do vysilenia pacienta. (22)

Pri diagnostike je preferované vyšetrenie aspoň 2 testami, a to vyšetrenie stolice pre prítomnosť GDH (glutamátdehydrogenázy) a toxínov A,B, pomocou enzymoimunoeseje (EIA). Je možné ešte konfirmačné vyšetrenie PCR metódou a kultiváciou stolice. (22)

### **Rod *Enterobacteriaceae***

Patria ku G<sup>-</sup> nesporulujúcim tyčkám, pričom jednotlivé druhy je náročné medzi sebou morfológicky odlišiť. Kultivácia je možná na väčšine bežných mikrobiologických pôd. Rod *Enterobacteriaceae* je spojený s gastrointestinálnym traktom, kde často prežívajú ako komenzálne baktérie, ich patogenita sa medzidruhovo značne líši. (23)

Epidemiologickú dôležitosť v rámci NN majú najmä *Klebsiella sp.*, či *Escherichia coli*. V posledných rokoch sa u týchto organizmov vyskytol vzostup získanej rezistencie na penicilíny alebo cefalosporíny, a to hlavne vďaka génom kódujúcich širokospektré  $\beta$ -laktamázy (ESBLs). Pre ich schopnosť rozložiť väčšinu  $\beta$ -laktamáz sa začali využívať karbapenémové ATB, voči ktorým sa však už v 90-tych rokoch tiež vyvinula rezistencia – karbapeném rezistentné enterobaktérie (CRE). Táto rezistencia zahŕňa produkciu heterogénnej skupiny látok – *Klebsiella pneumoniae* karbapenemáza (KPC), oxacilináza 48 (OXA-48), New Delhi metalo- $\beta$ -laktamázy (NDM), či v integróne zakódované metalo- $\beta$ -laktamázy objavené vo Verone (VIM). (24)

*E.coli* sú bežnou súčasťou mikroflóry človeka, ale zároveň patria k častým príčinám nemocničných i komunitných močových infekcií a bakterémií. Infekcie spôsobené kmeňmi *E.coli* sú spájané tiež so spontánnymi, ako aj postchirurgickými peritonitídami, infekciami kože a mäkkých tkanív a neonatálnymi meningitídami. Za znížením účinku širokého spektra penicilínových ATB u tohto kmeňa stoja najmä gény TEM a SHV, zatiaľ čo za rezistenciou na cefalosporíny stoja gény ESBLs. Zvýšenú dôležitosť má dnes i sledovanie kmeňov rezistentných na karbapenémy, aj keď v Európe je ich výskyt málo častý. (12)

Klebsiely sú častými kolonizátormi gastrointestinálneho traktu, ale v rámci NN sa často vyskytujú v horných dýchacích, či v močových cestách pacientov. Prenos nastáva priamym kontaktom s infikovanou osobou alebo tiež kontaminovanými rukami zdravotníckeho personálu. Rezistencia tohto druhu baktérií je založená najmä na získaní zvýhodňujúceho znaku vo forme plazmidu. Avšak odolnosť voči aminopenicilínom majú zakódovanú už prirodzene vo svojej genetickej výbave. (12)

### **Pseudomonády**

*Pseudomonas aeruginosa* je bežne prítomná vo vodnom prostredí v prírode. Pre rastliny, zvieratá a ľudí je zväčša len príležitostným patogénom, u hospitalizovaných pacientov však spôsobuje závažné infekcie. Ide vo veľkej miere o nemocničné pneumónie, bakterémie či infekcie močového traktu. Taktiež sa často nachádza u pacientov s popáleninami a je náročné ju eradikovať, nakoľko je prirodzene rezistentná voči mnohým druhom ATB. (12) Obsahuje gény pre efluxné pumpy, gén AmpC, či mutácie v génoch pre gyrázu a topoizomerázu IV. (20) Kvôli vysokému stupňu multirezistencie ostalo len veľmi malé množstvo liekov, ktoré sú použiteľné pre liečbu infekcií touto baktériou. Z tohto dôvodu je nutné pristupovať veľmi opatrne pri výbere a zavádzaní nových druhov antipseudomonádových antibiotík. (25)

Sledovanie rezistencií u všetkých kmeňov pseudomonád, acinetobakterov a klebsiel zahŕňa kontrolu rezistencie na gentamicín, ciprofloxacín, imipeném alebo cefotaxim. (14)

### 3 CÍL PRÁCE

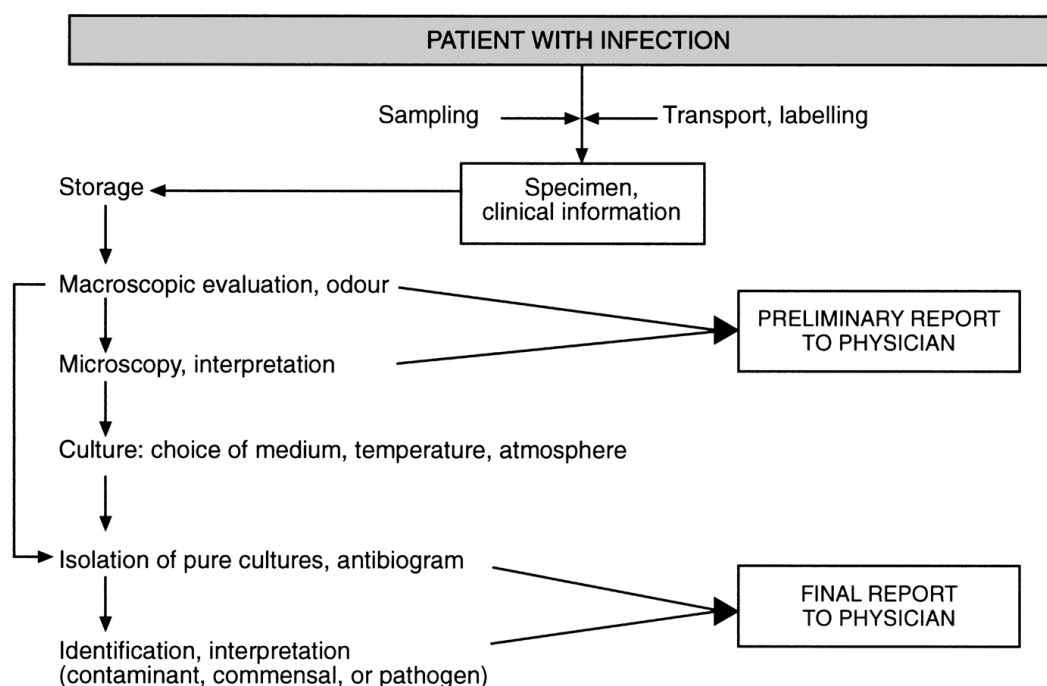
*Cieľom tejto bakalárskej práce je popísať metodiku identifikácie baktérií v klinickom laboratóriu a zhodnotiť laboratórne výsledky výskytu rezistentných kmeňov, ktoré figurovali ako pôvodcovia nemocničných nákaz v dátach laboratórií klinickej mikrobiológie Synlab v Prahe za obdobie roku 2016.*

## 4 METODIKA

Diagnostika v mikrobiológii je zameraná na dôkaz pôvodcu infekcie, izoláciu tohto pôvodcu a jeho identifikáciu. (6) Tento proces má štandardne niekoľko krokov:

- Odber materiálu – v prípade NN sa uskutočňuje zväčša pri lôžku pacienta.
- Mikroskopické vyšetrenie – používa sa najmä pri tekutých materiáloch (napr. hemokultúry).
- Kultivácia – očkovanie vzoriek na živné pôdy v znižujúcej koncentrácii, inkubácia a identifikácia.
- Biochemické testy – dôkaz ureázy, oxidázy, katalázy a iných látok pre dôkaz metabolizmu baktérií.
- Priame stanovenie – dôkaz antigénov na povrchu baktérií, prípadne dôkaz toxínov.
- Identifikácia prostredníctvom MALDI-TOFF.
- PCR – využitie napr. pri POCT (vyšetrenie pri lôžku) ako rýchle vyšetrenie pre detekciu MRSA, *C.difficile*, VRE alebo norovirových infekcií (napr. GenExpert system).
- Testovanie citlivosti na ATB. (4)





WHO 90960

*Obrázok 3: Postup pri pátraní po infekčnom agens [26]*

Pričom nie je nutné vyizolovať a identifikovať všetky organizmy vo vzorke. Dôležitá je ich klinická relevancia, ktorá sa určuje po dohode klinických mikrobiológov s laboratóriom. (26)

#### 4.1 Gramovo farbenie a mikroskopické vyšetrenie vzoriek

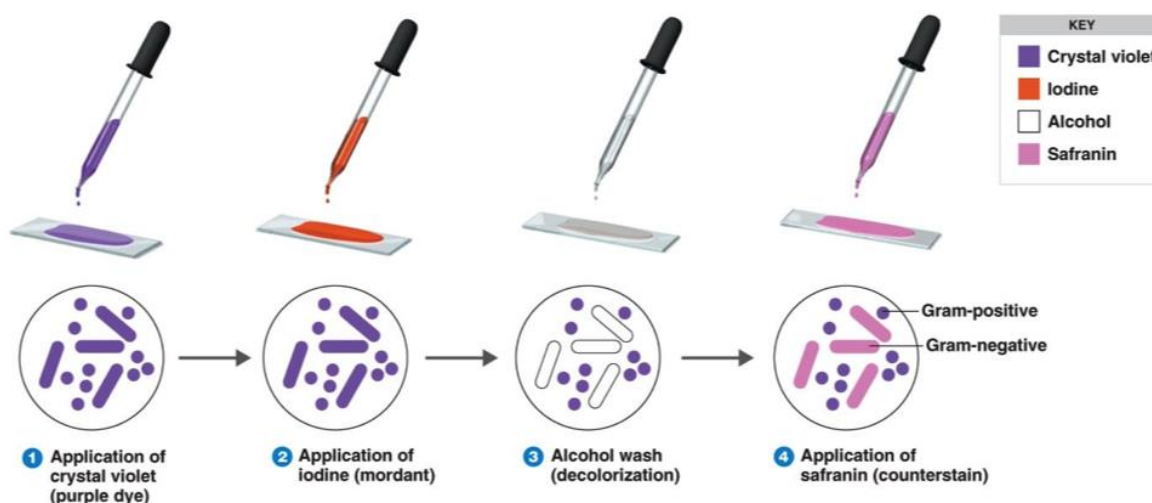
Pre pozorovanie preparátov mikroskopicky sa využívajú rôzne druhy farbiacich techník, ktoré umožnia zviditeľnenie a lepšiu identifikáciu jednotlivých druhov. Aplikáciou základných druhov farbenia, ako je Gramovo, sa rozdelí väčšina baktérií na 3 ľahko odlíšiteľné skupiny (ako bolo uvedené v kapitole 2.1.1).

Postup pri farbení preparátov podľa Grama:

1. Baktérie fixované na podložnom sklíčku sa farbja trifenylmetánovým farbivom (kryštálová violet, genciánová violet, metylviolet) 2-3 minúty.
2. Preparát sa premyje vodou a ponorí sa do Lugolovho roztoku po dobu 1-2 minút.

3. Následne sa preparát premyje acetónom až do odfarbenia (približne 30 sekúnd) a znovu opláchnu vodou.
4. Preparát sa po tomto kroku farbí safranínom alebo karbolfuchsinom asi 3 minúty.
5. Preparát sa opláchnu vodou, nechá sa oschnúť a je pripravený na mikroskopovanie. (27)

Týmto postupom sa v protoplaste buniek vytvorí komplex violete a jódu (v Lugolovom roztoku). Bunky, z ktorých sa tento komplex nevymyje alkoholom sa označujú ako G<sup>+</sup>. Tie, ktoré sa odfarbia a následne dofarbia kontrastným farbivom sa nazývajú G<sup>-</sup> (viď Obr.4). (27)



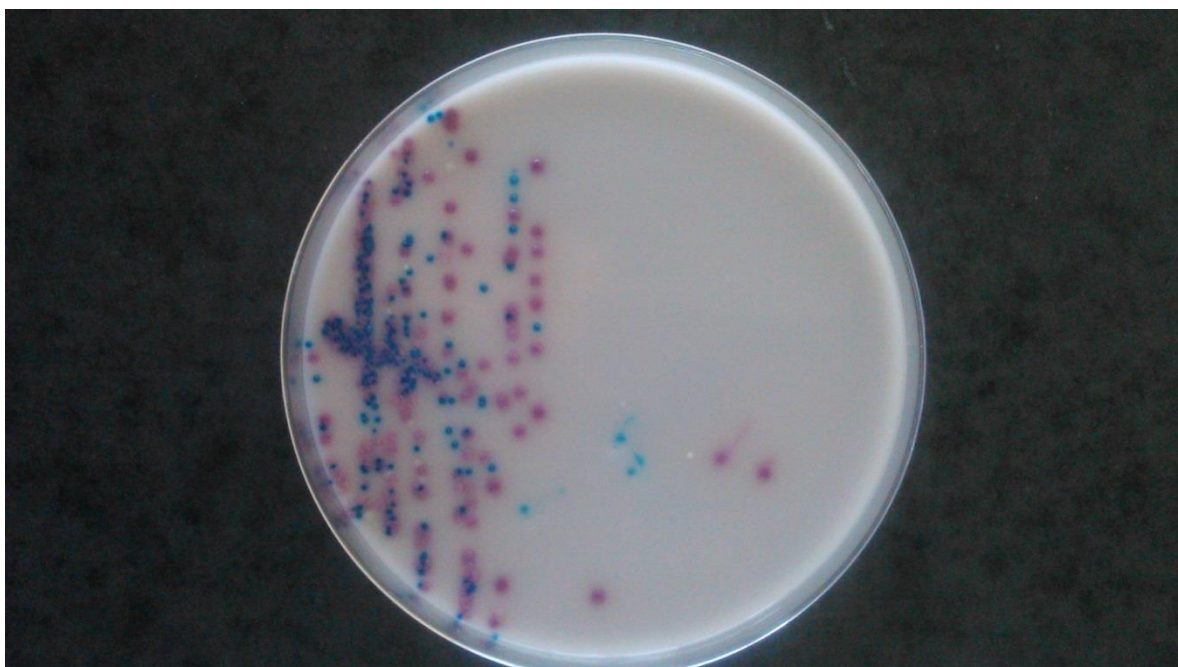
Obrázok 4: Výsledok farbenia podľa Grama. [zdroj: <https://goo.gl/UZcf05>]

## 4.2 Kultivácia

Kultivačný dôkaz mikroorganizmov je dodnes základným a najčastejším spôsobom ako zistiť pôvodcu infekcie. Jeho nevýhodou je však zdĺhavé prevedenie, čo je dôvodom používania rýchlejších priamych dôkazov (molekulárno-genetické či sérologické dôkazy agens) popri tejto metóde. (28)

Rozdelenie jednej baktérie v laboratórnych podmienkach trvá zhruba 25-30 minút (v ľudskom tele je toto delenie brzdené vplyvom imunitného systému). Následne rast pokračuje do vyčerpania živín alebo do prebytku toxických metabolitov. Na pevných médiách tvoria baktérie po 24-hodinovom raste individuálne kolónie, ktoré sú viditeľné voľným okom. Kolónia je pritom zhľukom buniek, ktoré vznikajú pomnožením z jednej baktérie alebo z menšieho počtu baktérií (CFU – colony forming unit). Tvar, veľkosť, pigmentácia a iné charakteristiky kolónií sú variabilné a závislé na druhu organizmu, čím môžu byť jedným z rozlišovacích znakov. Z CFU je možné baktérie izolovať a ďalej charakterizovať a diagnostikovať mikroskopickými technikami, biochemickými alebo imunochemickými testami prípadne hmotnostnou spektrometriou. (29)

Kultivačné pôdy sa odlišujú zložením – prirodzené alebo syntetické, konzistenciou – tekuté alebo pevné a účelom použitia – pomnožovacie, obohatené, selektívne, selektívno-diagnostické, či diagnostické. Dnes je možné použitie chromogénnych agarov (substrát pre baktérie je upravený do formy chromogénu) pre jednoduchšiu identifikáciu mikroorganizmov (viď Obr.5).



*Obrázok 5: Rast baktérií na chromogénnej pôde UriSelect 4. (zdroj: vlastné)*

## 4.3 Identifikácia baktérií

### 4.3.1 Biochemické testy

Schopnosť fermentovať rôzne cukry, glykozidy, či alkoholy sa využíva pri biochemickej identifikácii *Enterobacteriaceae* ako i iných druhov baktérií. Tiež sa využíva oxidačná alebo naopak redukčná schopnosť mikroorganizmov na rôznych substrátoch. Biochemické metódy sa stali jednoducho dostupné a pomerne lacné vývojom súborných kitov, ktoré obsahujú mikrotitračné jamky s rôznym médiom a reagensiami, umožňujúce dôkladnú identifikáciu baktérií.

### 4.3.2 Identifikácia pomocou MALDI-TOF

Identifikácia pomocou MALDI-TOF MS (hmotnostná spektrometria s laserovou desorpciou a ionizáciou s použitím matrice spojená s preletovým analyzátorom) je rýchla, presná a je možné ju použiť na široké spektrum mikroorganizmov. (30)

Princípom metódy je, že na kryštálovú matricu so vzorkou je aplikovaný laser. Ten uvoľní kryštály matrice spolu s molekulami vzorky, ktoré sú týmto spôsobom ionizované. Nabité molekuly sú následne smerované extrakčným napätím do štrbiny preletového analyzátoru. Podľa doby ich preletu hmotnostným analyzátorom je vyhodnotený pomer  $m/z$  (závislosť hmotnosti na veľkosti náboja). Detektor potom pretransformuje signál iónov na signál elektrický. Vyhodnotené dáta sú následne porovnávané s knižnicou hmotnostných spektier organizmov a podľa výšky skóre sú identifikované. (30)

## 4.4 Testy citlivosti na antibiotiká

Vyšetrenie citlivosti na ATB je základom správneho výberu liečebného postupu a pre účely surveillance. Rutinné testovanie citlivosti je teda dôležitým ukazovateľom pri rozvoji rezistencie, či pri epidemiologických štúdiách. (31)

V bežnej praxi sa najčastejšie využívajú:

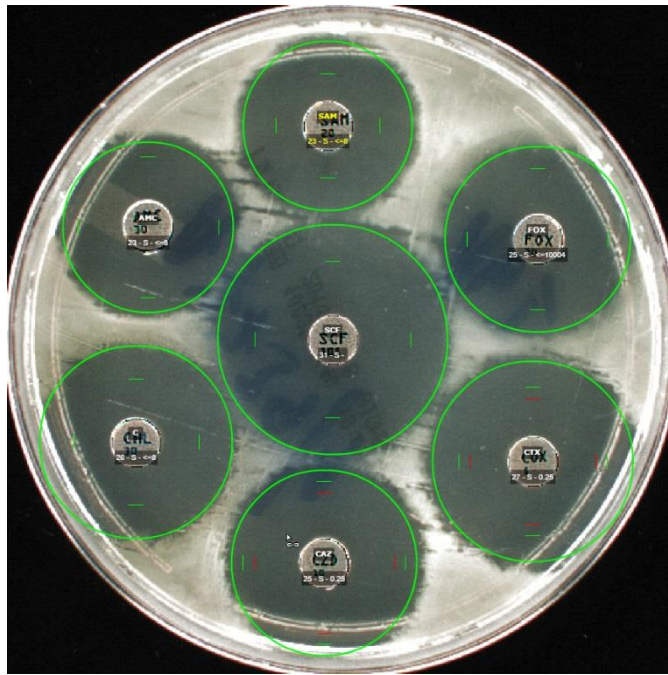
- diskový difúzny test (DDT);
- dilučná metóda;
- e-test.

#### 4.4.1 Diskový difúzny test

Je najrozšírenejší test využiteľný pre rýchlo rastúce a málo náročné kmene. Agarová pôda je naočkovaná štandardizovaným inokulom mikrobov. Následne sa papierové disky napustené známou koncentráciou ATB umiestnia na platňu a vzorky sa nechajú inkubovať. Antibiotiká difundujú do agaru a vytvárajú zóny inhibície rastu, podľa ich priemeru sa následne vyhodnocuje citlivosť. Hodnotí sa priemer zón inhibície, tie potom rozdeľujeme na kategórie citlivé, intermediárne a rezistentné. (31)

Postup:

Na testovanie sa využívajú Müller-Hinton alebo krvný agar. Následne sa vytvorí suspenzia mikroorganizmov v 3 ml destilovanej vody alebo v bujóne, ktorá by mala mať zákal 0.5 McFarlanda. Takto pripravená suspenzia obsahuje približne  $10^8$  CFU/ml, tú je nutné spracovať do 15 minút. Suspenzia sa naniesie na agar, nechá uschnúť, na povrch sa ukladajú papierové disky, znovu do 15 minút od inokulácie platne. Nasleduje inkubácia (18-24 hodín) a po nej odpočet pomocou pravítka alebo automatizovanou metódou (odpočet prostredníctvom prístroja Adagio), čo je možné vidieť na Obr.6.



Obrázok 6 Príklad DDT a jeho vyhodnotenie prístrojom ADAGIO. [zdroj: vlastné]

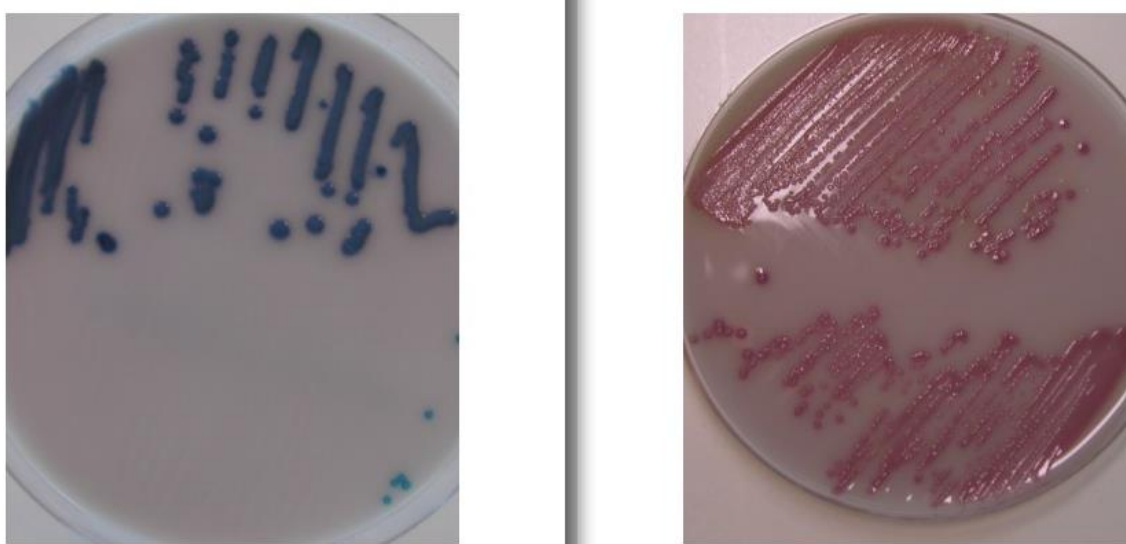
#### 4.4.2 Dilučná metóda

Základom tejto metódy je stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC). Štandardná dávka inokula organizmu sa očkuje do tekutého média, v ktorom je rozpustené ATB o rôznej koncentrácii (najčastejšie séria dvojnásobného riedenia). Po inkubácii sa sleduje najnižšia koncentrácia, ktorá inhibuje viditeľný rast mikroorganizmu. Určitou modifikáciou sú breakpointové metódy využívajúce len niekoľko koncentrácií antimikrobiálnej látky. Takto je možné tieto metódy využiť v laboratóriách s veľkým počtom vzoriek a je možné ich kombinovať s identifikáciou organizmu. (31) Táto metodika je využívaná i laboratóriami Synlab so sadami pre  $G^+$  a  $G^-$  baktérie na prístroji VITEK, v ktorom je spojená identifikácia baktérií s testom citlivosti.

## 5 VÝSLEDKY

Z výsledkov difúzných diskových testov v laboratóriách Synlab boli sledovaní najčastejší pôvodcovia nozokomiálnych nákaz v nemocnici v Mělníku za rok 2016 (január-apríl). Následne z výsledkov bola zhodnotená ich citlivosť alebo rezistencia na vyšetrované druhy antibiotík.

Výsledky testovaní vybraných zástupcov rodu *Enterobacteriaceae* zo všetkých oddelení nemocnice v Mělníku, za obdobie január – apríl 2016 je možné vidieť v Tab.2. Pričom boli testované vzorky moču, pri ktorých je zvýšená pravdepodobnosť výskytu rezistentných druhov. Vzorky boli testované na chromogénnych pôdach UriSelect a boli sledované baktérie *E.coli* (ESCO) a *Klebsiella sp.* (KLSP) vo farebných kolóniách podľa Obr.7.

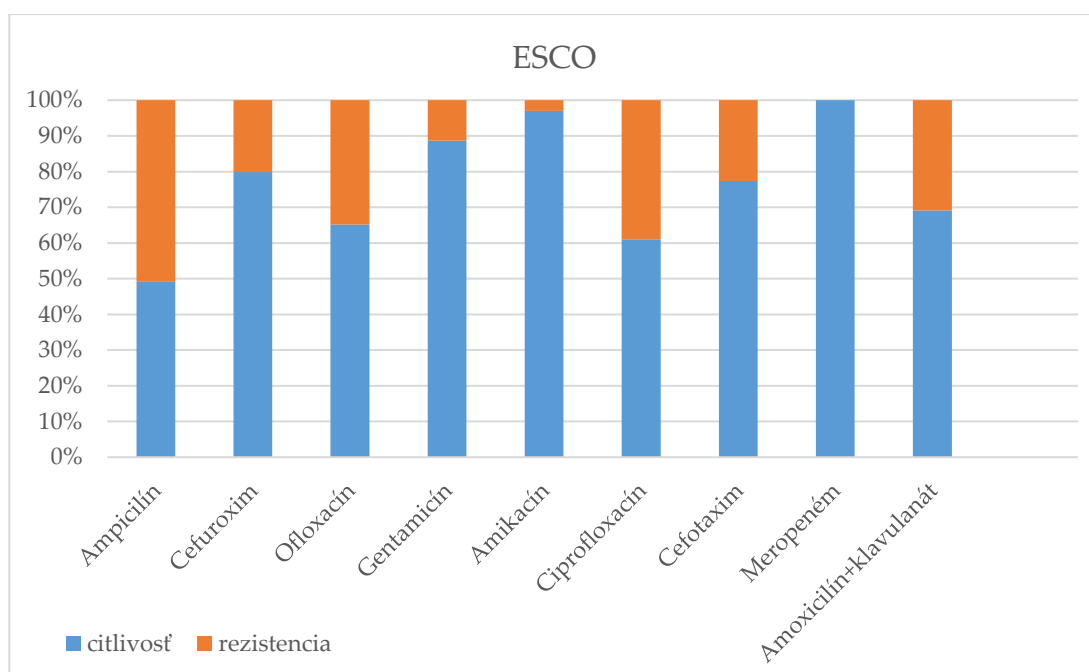


**Obrázok 7:** Kolónie rastúce na UriSelect pôde (ružové kolónie - *E.coli*, modré kolónie *Klebsiella sp.*) [zdroj: vlastný]

*Tabuľka 2: Výskyt kmeňov E.coli (ESCO) a Klebsiella sp. (KLSP) v Nemocnici Mělník za obdobie roku 2016 zo vzoriek moču.*

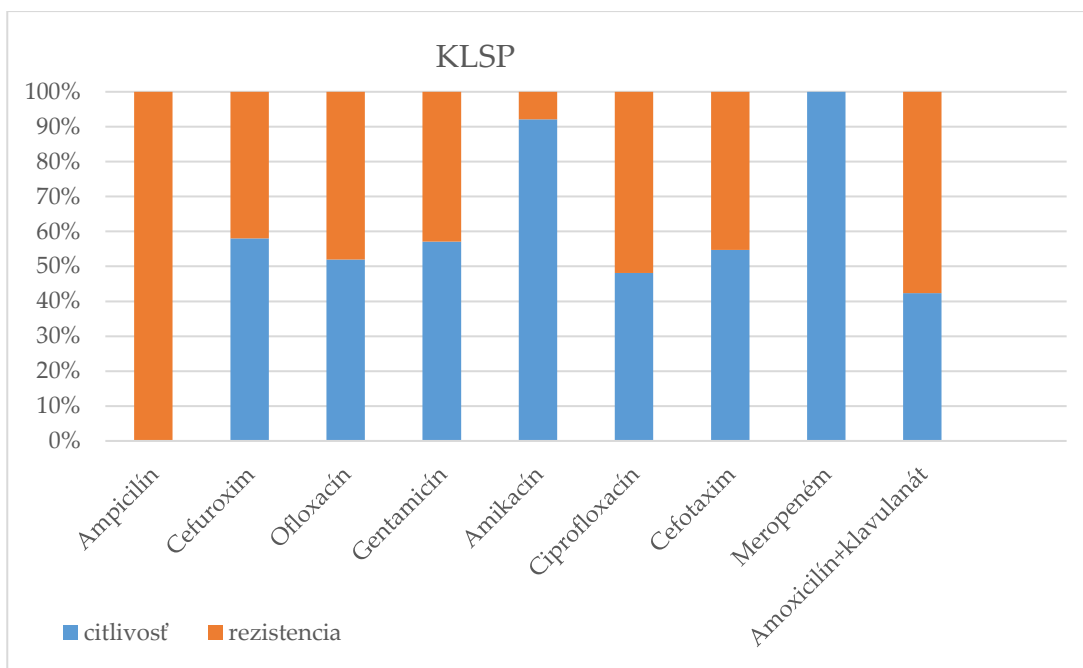
ESCO	Rezistené	Citlivé	KLSP	Rezistentné	Citlivé
Ampicillin	83	80	ampicilín	54	0
Cefuroxime	32	127	cefuroxim	21	29
Ofloxacin	54	101	ofloxacín	24	26
Gentamicin	16	125	gentamicin	24	32
Amikacin	4	130	amikacin	4	47
ciprofloxacín	53	83	ciprofloxacín	28	26
Cefotaxime	31	106	cefotaxim	24	29
Meropenem	0	133	meropenem	0	49
amoxicilín+klavulanát	50	112	amoxicilín+klavulanát	30	22

Pre lepšie znázornenie pomeru citlivosti a rezistencie voči jednotlivým antimikrobiálnym látkam boli vytvorené grafy na Obr.8 a Obr.9.



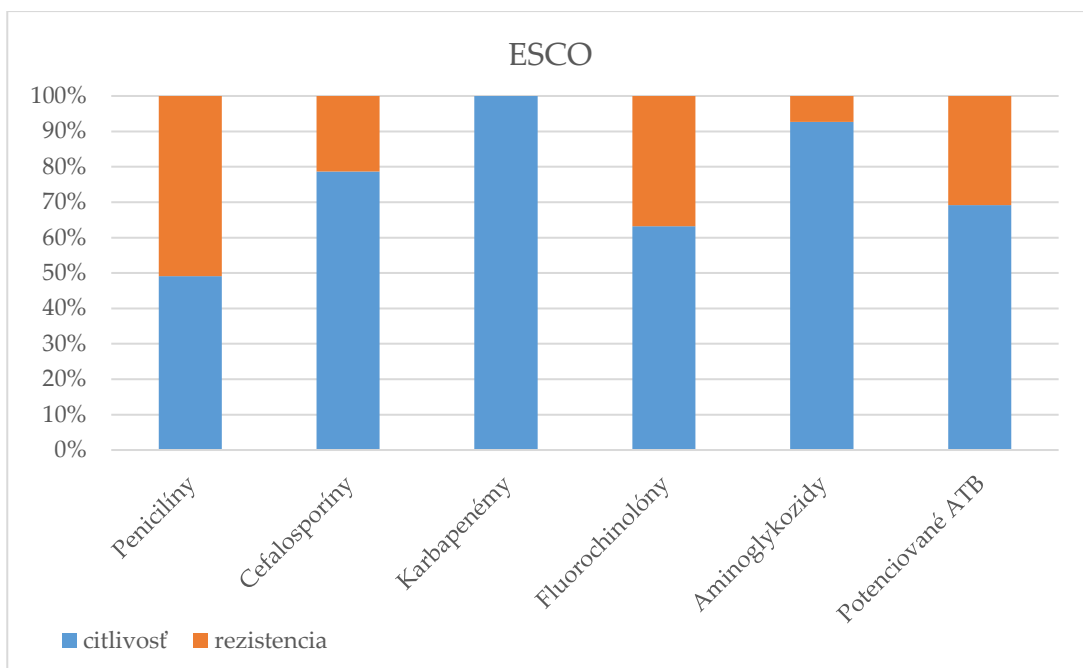
*Obrázok 8: Graf pomeru citlivosti a rezistencie k jednotlivým antimikrobiálnym látkam u E.coli.*



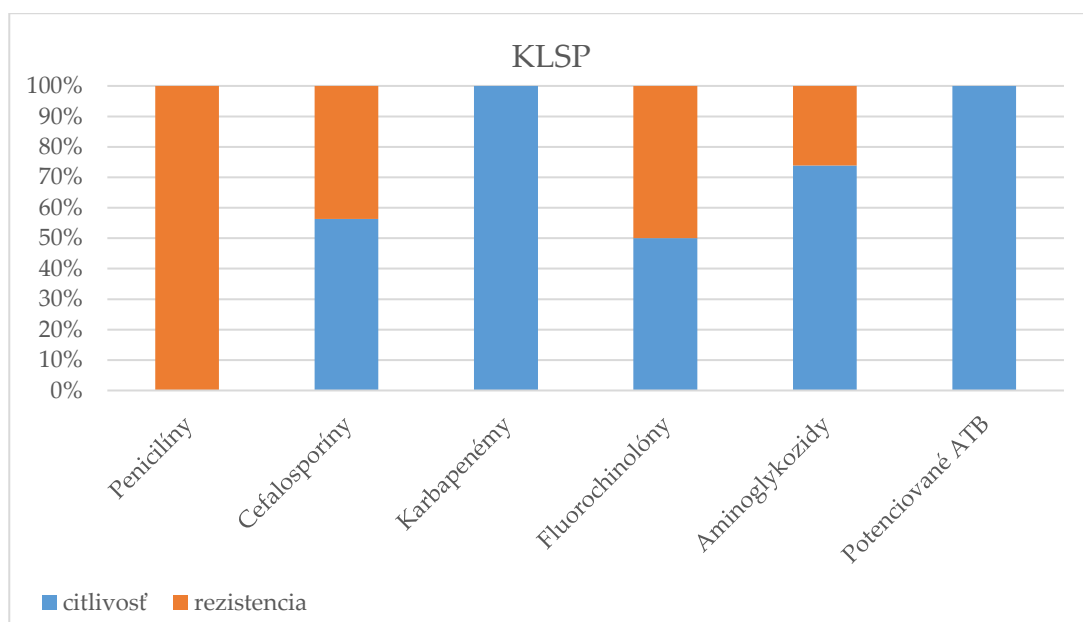


**Obrázok 9:** Graf pomeru citlivosti a rezistencie k jednotlivým antimikrobiálnym látkam u *Klebsiella sp.*

Z grafického znázornenia je u klebsiel viditeľná výrazná rezistencia, ktorá je vysoká ako u penicilínových antibiotík, tak u cefalosporínov (vyše 50%) a dokonca i u potenciovaných ATB ako je amoxicilín klavulanát. Citlivosť si zatiaľ zachovali tieto baktérie voči karbapenémom. V prípade *E.coli* situácia nebola v prvom kvartáli taká výrazná, napriek tomu sa ukazuje vyše 50% rezistencia voči penicilínom a nepriaznivá situácia je i v prípade fluorochinolónov či cefalosporínov. Porovnanie je dobre viditeľné v grafickom znázornení na Obr.10 a Obr.11.



**Obrázok 10** Stav rezistencie k antimikrobiálnym látkam u *E.coli*.



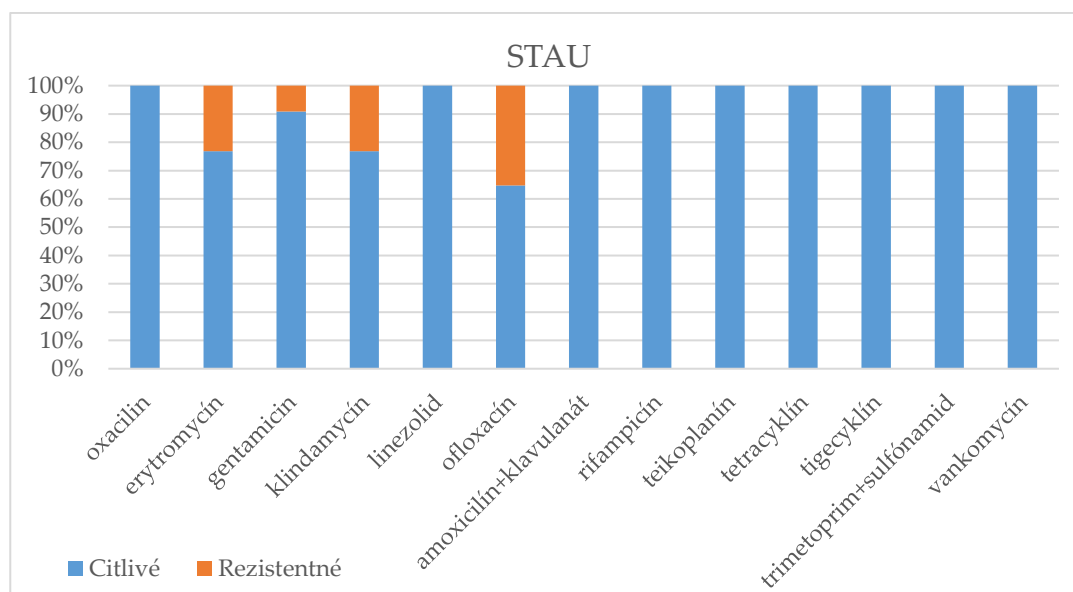
**Obrázok 11** Stav rezistencie k antimikrobiálnym látkam u *Klebsiella sp..*

Okrem enterobaktérií bol sledovaný tiež výskyt stafylokokových infekcií, a to najmä infekcie kmeňom *Staphylococcus aureus* (STAU) a MRSA u pacientov najmä na rôznych oddeleniach NsP v Mělníku za obdobie január-apríl 2016. Celkový stav rezistencie u všetkých infekcií zlatým stafylokokom v materiáli ako je krv, stery z rán, výtery z nosa a krku pacientov je možné vidieť v Tab.3.

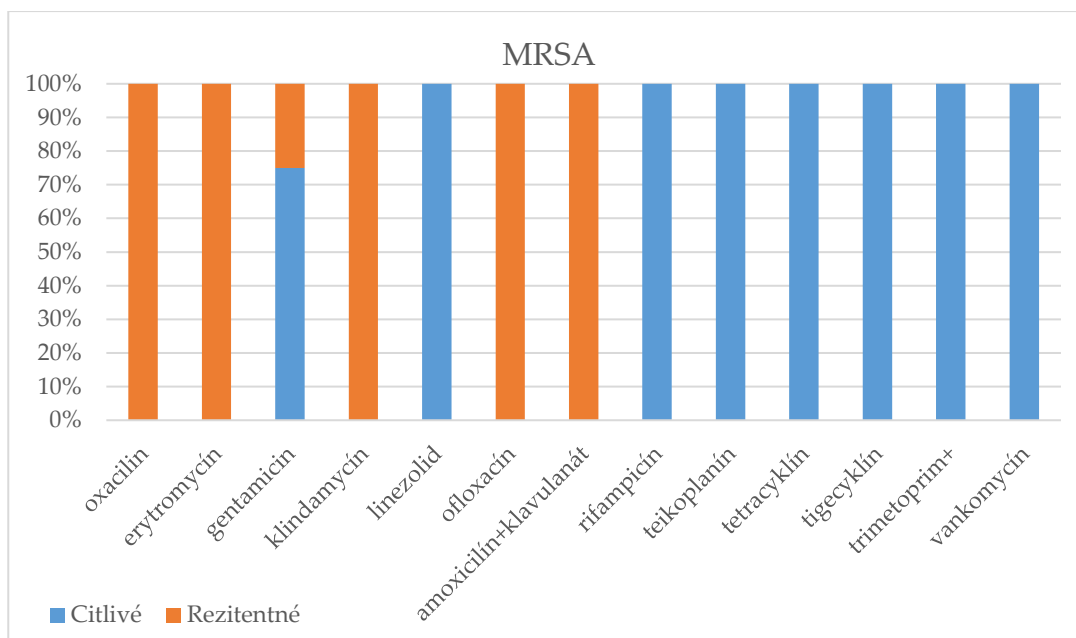
Tabuľka 3 Výskyt kmeňov *S.aureus* a z nich MRSA v NsP v Mělníku za rok 2016, materiál – krv, výtery z nosa a krku, výtery z rán, abscesy.

STAU			MRSA		
	Citlivé	Rezistentné		Citlivé	Rezistentné
oxacilin	84	0	oxacilin	0	12
erytromycín	63	19	erytromycín	0	12
gentamicín	70	7	gentamicín	9	3
klindamycín	63	19	klindamycín	0	12
linezolid	22	0	linezolid	7	0
ofloxacín	22	12	ofloxacín	0	12
amoxicilín+klavulanát	70	0	amoxicilín+klavulanát	0	12
rifampicín	44	0	rifampicín	11	0
teikoplanín	44	0	teikoplanín	11	0
tetracyklín	44	0	tetracyklín	11	0
tigecyklín	13	0	tigecyklín	2	0
trimetoprim+sulfónamid	84	0	trimetoprim+sulfónamid	12	0
vankomycín	44	0	vankomycín	12	0

Pre lepšie pochopenie situácie je vytvorený graf na Obr.12 pre všetky infekcie *S.aureus* vrátane rezistentného kmeňa MRSA a na Obr.13 špeciálne stav pre kmeň MRSA.



Obrázok 12 Stav rezistencie kmeňov *S.aureus* vrátane kmeňov MRSA.



**Obrázok 13** Stav rezistencie kmeňov MRSA.

Z grafického znázornenia je viditeľná kritická situácia rezistencie stafylokoka najmä vo vzťahu k penicilínovým, cefalosporínovým, či fluorochinolónovým antibiotikám. Výrazná je rezistencia kmeňov MRSA, ktorých výskyt je zhruba v 15% prípadov.

## 6 DISKUSIA

Bakteriálna rezistencia je celosvetovým problémom, ktorý tu už s nami niekoľko desaťročí je. Selekcčný tlak, ktorý je na baktérie vyvíjaný (najmä v ZZ), stále prehĺbuje mieru odolnosti voči antibakteriálnym látkam. Rýchla genetická asimilácia baktérií v tomto smere spôsobuje, že nevieme ani v 21.storočí na baktérie vyzrieť.

Podľa analýzy ECDC z roku 2009 boli infekcie rezistentnými kmeňmi baktérií zodpovedné za približne 25000 úmrtí ročne. Situácia sa však naprieč európskymi štátmi líši či už v type baktérií, ktoré ochorenia spôsobujú, ale aj v type antibiotických látok, voči ktorým sa rezistencia vytvorila. Všeobecne je zo štatistík pozorované nižšie percento rezistentných kmeňov v severských štátoch a vyššie v krajinách južnej a východnej Európy. (12)

Rezistencia k ATB je závažným ohrozením verejného zdravia, a je preto dôležité dodržiavať pravidlá užívania a predpisovania antimikrobiálnych látok, aby sa predišlo nežiadúcim zdravotným a ekonomickým následkom. Pričom najzávažnejším faktorom, ako už bolo spomenuté, zostáva neuvážené požívanie antibakteriálnych látok a prenos rezistentných kmeňov medzi ľuďmi. (12)

V tejto práci som sa venovala najmä zisteniam stavu rezistencie v nemocniciach, nakoľko nozokomiálne infekcie sú spájané so zvyšujúcimi sa výdajmi na zdravotnú starostlivosť, predĺžením doby hospitalizácie a zvýšením celkovej úmrtnosti. Zaujímal ma stav rezistencie v Českej republike (konkrétne v NsP v Mělníku), ktorý som chcela porovnať s dátami získanými prostredníctvom európskeho surveillance systému .

EARS-Net je hlavným systémom pre dohľad a kontrolu v prípade ATB rezistencie. Európske krajiny pravidelne zasielajú dáta všetkých baktérií a ich citlivosti na antimikrobiálne látky, ktoré spadajú pod surveillance. Klinické

laboratóriá jednotlivých štátov zbierajú výsledky rutinných testov citlivosti, tie sú následne poslané do systému ECDC (TESSy) a vyhodnotené.

Podľa najnovších výsledkov surveillance je situácia negatívna najmä u G<sup>-</sup> baktérií, kde sa v posledných rokoch pozoruje vysoká a často i naďalej sa zvyšujúca miera rezistencie najmä u kmeňov *E.coli* a *Klebsiella pneumoniae*. Príčinou je produkcia ESBLs, pričom je táto rezistencia často v kombinácii s rezistenciou k fluorochinolónom a aminoglykozidom. (32)

Tento jav som pozorovala i v mojich výsledkoch. V prípade infekcií baktériou *E.coli* bola zhruba polovica rezistentná na penicilínové antibiotiká, dokonca i na potenciované s inhibítormi  $\beta$ -laktamáz. Približne 20% týchto baktérií malo vyvinutú rezistenciu k cefalosporínom, a ako je uvedené vyššie, pridružená je i rezistencia k fluorochinolónom (v zhruba 37% prípadov).

V prípade infekcií baktériami *Klebsiella sp.* som pozorovala prirodzenú rezistenciu k aminopenicilínom, ktorá bola očakávaná. Vysokú mieru rezistencie však vykazovali tieto baktérie i voči cefalosporínom (44%) a zhruba polovica pozorovaných výsledkov vyšla rezistentná k fluorochinolónom. Pridružená bola i rezistencia na aminoglykozidy (zhruba v štvrtine prípadov). Pre porovnanie napr. na Slovensku sa v posledných rokoch rezistencia na fluorochinolóny pohybovala na približne 70% prípadov. (32)

Ako je možné vidieť, liečba NN spôsobených kmeňmi *E.coli* alebo *K.pneumoniae* sa kvôli rastúcej rezistencii k cefalosporínom a fluorochinolónom komplikuje a často je poslednou možnosťou použitie karbapenémov. Tie sú finančne nákladnejšie, mávajú závažné vedľajšie účinky a výrazné je i riziko rozširovania ďalšej rezistencie. (19) A napriek tomu, že výskyt kmeňov CRE je v európskych krajinách zatiaľ nízky a ojedinelý, je nutné užívanie karbapenémov racionalizovať.

Situácia u G<sup>+</sup> baktérií, najmä u kmeňov MRSA, sa v posledných rokoch zmenila k lepšiemu, nakoľko bol pozorovaný pokles incidencie. Vzrastajúci trend rezistencie vo svete je však u enterokokov, a to najmä v súvislosti s rezistenciou k vankomycínu, i keď táto odolnosť ešte stále zostáva v Európe zriedkavá. Mieru výskytu MRSA, ktorá začiatkom 21.storočia nebezpečne stúpala, sa podarilo v posledných rokoch výrazne znížiť (v USA a UK až o 80%). Prispelo k tomu, okrem iného, zavedenie skriningových MRSA testov. (18) Čo sa týka výskytu MRSA kmeňov v rámci Európy, je veľmi variabilný (1-55%). V ČR je táto hranica udržiavaná v priemere pod 15%, pre porovnanie na Slovensku je to vyššie (zhruba 25%). (32)

V mojich pozorovaniach som videla veľmi obdobné výsledky, kedy infekcie *S.aureus* boli zhruba v 13% spôsobené rezistentným kmeňom MRSA. Rezistencia k penicilínovým antibiotikám však bola pozorovaná i mimo MRSA kmene. Podobne ako u enterobaktérií je pozorovaná výrazná rezistencia k cefalosporínom a pridružená rezistencia k fluorochinolónom.

Vzhľadom k vyššie uvedeným informáciám je jasné, že rezistencia baktérií je celosvetovou hrozbou. Počet rezistentných kmeňov sa zvyšuje rýchlejšie, ako je zavádzanie nových preparátov do praxe. Je preto nutné používať antimikrobiálne látky účelne a cielene, poznať dôsledne mechanizmus ich pôsobenia a mať prehľad o súčasnom stave rezistencie voči týmto látkam. Dôležité je tiež dodržiavať pravidlá antibiotickej politiky a dôsledne kontrolovať spotrebu liečiv v jednotlivých regiónoch.

V rámci NN zohrávajú významnú úlohu v boji s rezistentnými kmeňmi preventívne opatrenia, ako je napr. hygiena rúk (5.5. každoročná kampaň WHO „*Save lives – clean your hands.*“). Ďalej pravidelné sa oboznamovanie s novými publikáciami, doporučenými postupmi a akčnými plánmi môže viesť rovnako k zníženiu rizika infekcií a finančných alebo zdravotných dopadov týchto infekcií.

## 7 ZÁVER

Bakteriálna rezistencia značne komplikuje vhodný výber antibakteriálnych preparátov a úspešnú rýchlú liečbu pacientov, najmä v nemocničnom prostredí, kde je ich imunitný systém oslabovaný mnohými faktormi.

Mojim cieľom v tejto práci bolo zhrnúť poznatky o príčinách a mechanizmoch prenosu rezistencie medzi baktériami. Tiež som sa venovala rizikám, ktoré táto odolnosť spôsobuje pri liečbe pacientov. Ďalej som sa venovala metodikám, ktorými sme dnes schopný tieto, prirodzené alebo získané, „zvýhodnenia“ baktérií odhaliť. Výsledkami vyšetrení z NsP Mělník som následne zhodnotila lokálny stav rezistencie niektorých významných kmeňov a porovnala ho so situáciou vo svete.

V dôsledku toho, že žijeme v „postantibiotickej“ ére a navyše v období, kedy je vo svete bežná migrácia osôb, je nutné našu pozornosť upriamiť na dôsledné dodržiavanie antibiotickej politiky a pravidelne kontrolovať spotrebu týchto liečiv, aby bola zabezpečená účinná antiinfekčná liečba i v . Je v záujme nás všetkých, aby hospitalizovaní pacienti mali prístup k bezpečnej a rýchlej starostlivosti, čím by sa skrátil ich pobyt v ZZ a znížili by sa i finančné náklady na ich liečbu.



## 8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

µm – mikrometer

6-APA – 6-aminopenicilánová kyselina

ATB - antibiotiká

ATP – adenosín-trifosfát

CFU a CFU/ml – kolóniu formujúca jednotka

CRE – enterobaktérie rezistentné na karbapenémy

ČR – Česká republika

DDT – difúzny diskový test

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EARSS-Net – Európsky systém pre kontrolu antibiotickej rezistencie

EARSS – Európska sieť antibiotickej rezistencie

ECDC – Európske centrum pre prevenciu a kontrolu chorôb

ESBLs – širokospektré β-laktamázy

ESCO – *Escherichia coli*

EÚ – Európska únia

G<sup>-</sup> – gram-negatívne baktérie

G<sup>+</sup> – gram-pozitívne baktérie

GDH – glutamátdehydrogenáza

HAI – hospital acquired infection (infekcie získané v nemocnici)

KLSP – *Klebsiella species*

KPC – karbapenemáza izolovaná z baktérie *Klebsiella pneumoniae*

LPS - lipopolysacharid

MALDI-TOFF (MS) – hmotnostná spektrometria s laserovou desorpciou

a ionizáciou s použitím matrice spojená s preletovým analyzátorom

MIC – minimálna inhibičná koncentrácia

MRSA – methicilín rezistentný *Staphylococcus aureus*

NDM – New Dalhi metalo-β-laktamázy

NN – nemocničná nákaza

NsP – nemocnica s poliklinikou

OXA-48 – oxacilináza 48

PBP – penicilín viažuci proteín

PCR – polymerase chain reaction (polymerázová reťazová reakcia)

POCT – Point of care testing (testy pacientov priamo pri lôžku)

Qnr – rezistencia na chinolóny

RNA (mRNA, tRNA) – ribonukleová kyselina (mediátorová, transférová)

STAU – *Staphylococcus aureus*

TEM a SHV – názvy génov pre  $\beta$ -laktamázy u *E.coli*

VIM – v integróne zakódované metalo- $\beta$ -laktamázy objavené vo Verone

VRE – vankomycín rezistentné enterokoky

VRSA – vankomycín rezistentný *Staphylococcus aureus*

ZZ – zdravotnícke zariadenie

## 9 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. HOGG, Stuart. *Essential microbiology*. Hoboken, NJ: John Wiley, c2005. ISBN 0471497533.
2. ORAVCOVÁ, Iveta. *Súčasná možnosť liečby polyrezistentných nozokomiálnych infekcií*. *Onkológia* [online]. Bratislava, 2016, 11(4), 224-227 [cit. 2017-04-27]. ISSN 13368176. Dostupné z: [goo.gl/bAukm4](http://goo.gl/bAukm4)
3. *Akčný plán Národného antibiotického programu pro období 2011-2013*. In: [Http://www.szu.cz/](http://www.szu.cz/) [online]. Státní zdravotní ústav [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/AP\\_NAP\\_2011\\_2013.pdf](http://www.szu.cz/uploads/AP_NAP_2011_2013.pdf)
4. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. Praha: Grada, 2014. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-4771-2.
5. BARON, Samuel. *Medical microbiology*. 4th ed., Galveston, Tex.: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. ISBN 0963117211.
6. HAMPLOVÁ, Lidmila. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena pro bakalářské studium a všechny typy zdravotnických škol*. 1., Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2015. ISBN 9788073879341.
7. NOVÁKOVÁ, Elena, Kompaníková Jana, Neuschlová Martina, Porubská Anna. *Lékařská mikrobiologie*. Multimediální podpora výučby klinických a zdravotnických disciplín, Portál Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského [online] 25.1.2013, posledná aktualizácia 9.1.2014 [cit. 2017-03-16] Dostupný z WWW: <<http://portal.jfmed.uniba.sk/clanky.php?aid=203>>. ISSN 1337-7396.
8. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005. ISBN 8086850005.
9. MIŠUROVÁ, Eva a Peter SOLÁR. *Molekulová biológia*. 2. Košice: Vydavateľstvo UPJŠ v Košiciach, 2007. ISBN 978-80-7097-671-5.
10. MOKRÝ, Juraj; Igor Porvazník, Juraj Váňa: *Vybrané kapitoly z klinickej farmakológie: Antimikrobiálne látky I. - farmakológia*. Multimediální podpora

- výučby klinických a zdravotníckych disciplín, Portál Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského [online] 25.5.2013, posledná aktualizácia 25.5.2013 [cit. 2017-03-16] Dostupný z WWW: <<http://portal.jfmed.uniba.sk/clanky.php?aid=219>>. ISSN 1337-7396.
11. JINDRÁK, Vlastimil, Dana HEDLOVÁ a Pavla URBÁŠKOVÁ. *Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici*. Praha: Mladá fronta, 2014. Aeskulap. ISBN 9788020428158.
  12. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014: Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. In: SURVEILLANCE REPORT [online]. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2015, s. 130 [cit. 2017-03-16]. DOI: 10.2900/23549. ISBN 978-92-9193-729-5. ISSN 2363-2666. Dostupné z: <https://goo.gl/2I2MCb>.
  13. KOLÁŘ, Milan. *Antibiotická léčba nozokomiálních infekcí*. Praha: Triton, 2000. Levou zadní, sv. 57. ISBN 807254151X.
  14. ŠRÁMOVÁ, Helena. *Nozokomiální nákazy*. 3. vyd. Praha: Maxdorf, c2013. Jessenius. ISBN 9788073452865.
  15. ŠRÁMOVÁ, Helena. *Nozokomiální nákazy*. Praha: Maxdorf, 1995. ISBN 8085912007.
  16. GÖPFERTOVÁ, Dana, Petr PAZDIORA a Jana DÁŇOVÁ. *Epidemiologie: obecná a speciální epidemiologie infekčních nemocí*. 2., přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 9788024622231.
  17. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Prevention of hospital-acquired infections: A PRACTICAL GUIDE*. In: [Http://www.who.int](http://www.who.int) [online]. Malta, 2002 [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <http://www.who.int/csr/resources/publications/whocdscsreph200212.pdf>
  18. HENSLEY, Bradley J. a John R.T. MONSON. *Hospital-acquired infections*. Surgery: Oxford International Edition [online]. 2015, 33(11), 528–533 [cit. 2017-03-18]. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2015.08.008>. Dostupné z: [http://www.surgeryjournal.co.uk/article/S0263-9319\(15\)00176-3/fulltext](http://www.surgeryjournal.co.uk/article/S0263-9319(15)00176-3/fulltext)

19. WHO. *Antimicrobial resistance: Global report on surveillance* [online]. In: France, 2014, s. 256 [cit. 2017-04-27]. ISBN 9789241564748. Dostupné z: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf)
20. JARVIS, William R.. *Bennett & Brachman's hospital infections*. Sixth edition. ISBN 1451175922.
21. TEJKALOVÁ, Renata a Zbyněk ROZKYDAL. *Výskyt infekcí vyvolaných kmenem Clostridium difficile u ortopedicky nemocných ve Fakultní nemocnici u sv. Anny v Brně*. *Ortopedie*, 2011, roč. 5, č. 4, s. 156-159. ISSN 1802-1727.
22. BENEŠ, Jiří, Petr HUSA a Otakar NYČ. *Doporučený postup diagnostiky a léčby kolitidy vyvolané Clostridium difficile*. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. Praha: Trios, 2012, 18(5), 160-167. ISSN 1211-264X.
23. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 8090289665.
24. European Centre for Disease Prevention and Control. *Rapid risk assessment: Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae – 8 April 2016*. Stockholm: ECDC; 2016.
25. HANBERGER, H., D. DIEKEMA, A. FLUIT, R. JONES, M. STRUELENS, R. SPENCER a M. WOLFF. *Surveillance of antibiotic resistance in European ICUs*. *Journal of Hospital Infection* [online]. 2001, 48(3), 161-176 [cit. 2017-04-27]. DOI: 10.1053/jhin.2001.0987. ISSN 01956701. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195670101909879>
26. VANDEPITTE, J. *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology*. 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 2003. ISBN 9241545453.
27. BECTON, DICKINSON AND COMPANY. *Súpravy a činidlá na farbenie Gramovou metódou*. Shannon, County Clare, Ireland, 2008.
28. VOTAVA, Miroslav. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. Brno: Hortus, 2000. ISBN 802385058X.
29. DENYER, S. P. a W. B. HUGO. *Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology*. 8th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2011. ISBN 1444330632.

30. HUONG, Truong Thanh, Markéta KOMÍNKOVÁ, Roman GURÁŇ, et al. *Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS*. Journal of Metallomics and Nanotechnologies. 2014, 1(2), 64-66. ISSN 2336-3940. Dostupné také z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_239\\_nanotech/J\\_Met\\_Nano/index.html](http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/index.html)
31. SCHARFEN, Josef. *Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii*. Praha: Nucleus HK, 2013. Mikrobiologie. ISBN 9788087009321.
32. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe: Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. Štokholm, 2017. ISBN 978-92-9498-029-8. ISSN 2363-2666.

## 10 ZOZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKOV

Obrázok 1 .....	12
Obrázok 2 .....	18
Obrázok 3 .....	41
Obrázok 4 .....	42
Obrázok 5 .....	43
Obrázok 6 .....	46
Obrázok 7 .....	47
Obrázok 8 .....	48
Obrázok 9 .....	49
Obrázok 10 .....	50
Obrázok 11 .....	50
Obrázok 12 .....	51
Obrázok 13 .....	52

## 11 ZOZNAM POUŽITÝCH TABULIEK

Tabuľka 1 .....	27
Tabuľka 2 .....	48
Tabuľka 3.....	51