

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Adéla Holubová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**RYCHLÉ TESTY PRO DETEKCI MECHANISMŮ
ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE U GRAM NEGATIVNÍCH
TYČEK**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Doc. Ing. Jaroslav Hrabák, PhD.

PLZEŇ 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, s použitím odborné literatury a zdrojů uvedených v seznamu pramenů a literatury.

V Plzni dne 28.3.2017

.....

vlastnoruční podpis

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Doc. Ing. Jaroslavu Hrabákovi, PhD. za odborné vedení práce a poskytnutí materiálů.

Anotace

Příjmení a jméno: Holubová Adéla

Katedra: Katedra teoretických oborů

Název práce: Rychlé testy pro detekci mechanismů antibiotické rezistence u gram negativních tyčků

Vedoucí práce: Doc. Ing. Jaroslav Hrabák, PhD.

Počet stran – číslované: 31

Počet stran – nečíslované: 17

Počet příloh: 2

Počet titulů použité literatury: 23

Klíčová slova: antibiotika, antibiotická rezistence, gramnegativní tyčky, beta-laktamázy, karbapenamázy, MALDI-TOF-MS

Souhrn:

Bakalářská práce se zabývá problémem narůstající rezistence bakterií na antibiotika a ukazuje, jak může být detekovatelná. V teoretické části je uvedeno rozdělení antibiotik do tříd, mechanismy účinku a jejich vlastnosti. Dále je zde přiblíženo, co jsou to gramnegativní tyčky a jejich zástupci. V problematice rezistence je popsáno, co to rezistence je a uvedeno, jakými způsoby může vzniknout.

Praktická část zahrnuje rychlé testy založené na MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii, kterými lze jeden z nejzávažnějších typů rezistence zjistit.

Annotation

Surname and name: Holubová Adéla

Department: Department of theoretical fields

Title of thesis: Quick detection tests for antibiotic resistance mechanisms of Gram-negative rods

Consultant: Doc. Ing. Jaroslav Hrabák, PhD.

Number of pages - numbered: 31

Number of pages - unnumbered: 17

Number of appendices: 2

Number of literature items used: 23

Key words: antibiotics, antibiotic resistance, gram-negative rods, beta-lactamases, carbapenemases, MALDI-TOF-MS

Summary:

The Bachelor thesis deals with problem of increasing bacterial resistance to antibiotics and it shows how can we detect it. In the theoretical part is indicated classification of antibiotics, antibiotics mechanism of action and their properties. There is also included a description of what Gram-negative rods are and their representatives. The chapter of resistance problematics describes what resistance is and through which methods it can be created.

The practical part includes quick tests based on MALDI-TOF mass spectrometry through which can be one of the most serious type of resistance determine.

Obsah

ÚVOD	11
TEORETICKÁ ČÁST	12
1 STRUČNÁ HISTORIE ANTIBIOTIK	12
2 VLASTNOSTI ANTIBIOTIK.....	13
2.1 Účinek antibiotik.....	13
2.2 Mechanismy účinku antibiotik.....	14
2.3 Správné použití antibiotik	14
2.3.1 Zásady správného použití antibiotik.....	14
2.3.2 Empirická, úvodní a cílená terapie	15
3 SKUPINY ANTIBIOTIK	16
3.1 Beta-laktamová antibiotika	16
3.1.1 Peniciliny	16
3.1.2 Inhibitory beta-laktamáz.....	17
3.1.3 Cefalosporiny	17
3.1.4 Karbapenemy.....	17
3.2 Glykopeptidy.....	18
3.3 Polypeptidová antibiotika.....	19
3.4 Aminoglykosidy	19
3.5 Makrolidy	20
3.6 Streptograminy	20
3.7 Tetracykliny a glycylykliny.....	21
3.8 Chinolony (fluorochinolony)	21
3.9 Linkosamidy.....	22
3.10 Amfenikoly	22
4 GRAMNEGATIVNÍ TYČKY	23
4.1 Gramovo barvení.....	23
4.2 Vybraní zástupci gramnegativních tyček	24
4.2.1 <i>Escherichia coli</i>	24
4.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
5 REZISTENCE BAKTERÍ NA ANTIBIOTIKA	25
5.1 Zkřížená rezistence.....	25
5.2 Multirezistence.....	25

5.3 Bakteriální plasmidy	26
5.4 Mechanismy vzniku rezistence	26
5.5 Beta-laktamázy.....	27
5.5.1 Karbapenamázy	27
6 TESTY K PRŮKAZU ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE	29
6.1 Úvod k metodě MALDI-TOF-MS	29
6.2 Detekce karbapenemáz.....	29
6.2.1 Fenotypové testy.....	30
6.2.2 Detekce serinových karbapenemáz a metalobetalaktamáz.....	30
PRAKTICKÁ ČÁST	31
7 CÍLE PRÁCE.....	31
8 VYŠETŘOVANÝ SOUBOR	32
9 METODA VÝZKUMU	33
9.1 Metoda MALDI-TOF-MS	33
9.1.1 Pracovní postup	33
9.1.2 Obsah činidel	33
9.1.3 Průběh analýzy	34
9.1.4 Detektor	34
9.1.5 Průletový analyzátor	34
9.1.6 Matricí zprostředkovaná laserová ionizace	34
9.1.8 Vyhodnocení.....	34
10 PREZENTACE A INTERPRETACE ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ.....	36
11 DISKUSE.....	39
ZÁVĚR	41
LITERATURA A PRAMENY	
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	
SEZNAM TABULEK	
SEZNAM PŘÍLOH	
PŘÍLOHY	

ÚVOD

Tato práce by měla dostatečně přiblížit informace o antibiotikách a skupinách, do jakých se dělí, jaká antibiotika tam patří, jejich mechanismus a síla účinku. Zaměřuje se také na to, jak se mají antibiotika správně užívat a za jakých okolností by se měly předepisovat. Každému nasazení antibiotik by měla předcházet mikrobiologická vyšetření, aby se zjistil původce infekce a popřípadě jeho citlivost na antibiotika. Hned v první kapitole je popsáno, kdo přispěl k převratnému objevu antibiotik a tím naprosto změnil dosavadní zdravotnictví.

V této práci je také popsáno, co to jsou gramnegativní tyčky a jejich srovnání s grampozitivními bakteriemi. V mikroskopu totiž vidíme bakterie, které vypadají jako malé tyčky a jsou červeně zbarvené. Gramnegativní tyčky se stávají čím dál větší problém ve zdravotnictví, hlavně kvůli nárůstu rezistence i k rezervním antibiotikům.

Problém rezistence bakterií na antibiotika je hlavním tématem mé práce. Odolné bakterie stále přibývají a dokáží se rychle přizpůsobit. Bakterie mohou být rezistentní na několik druhů antibiotik nebo hůř, na několik skupin antibiotik zároveň. Nejčastější typ rezistence způsobují bakterie, které produkují beta-laktamázy, což jsou enzymy, které rozkládají beta-laktamová antibiotika, kam patří např. penicilin.

Praktická část mé práce se zabývá hlavním cílem práce, čili ověření metody MALDI-TOF-MS na různých izolátech z čeledi *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonadaceae* produkujících různé karbapenemázy a určení senzitivity metody.

Téma jsem si vybrala, protože mi přijde velmi zajímavé. Na střední a vysoké škole jsme bohužel neměli dost prostoru, abychom toto téma dostatečně probrali, tak jsem se prostřednictvím této práce chtěla dozvědět více o antibiotikách a rezistenci na ně. Další důvod je, že já sama dostávám několikrát do roka antibiotika na nemoci, u kterých jiná možnost není.

TEORETICKÁ ČÁST

1 STRUČNÁ HISTORIE ANTIBIOTIK

V roce 1889 byl Paul Vuillemin první, kdo objevil, že živí tvorové mohou vytvářet látky, které usmrcují nebo inaktivují jiné. Tento proces nazval jako „antibiosa“. Pojem „antibiotikum“ zavedl americký mikrobiolog a objevitel streptomycinu Selman Waksman (8).

Koncem 19. století se badatelé zabývali využitím neškodných bakterií k léčbě nemocí způsobených škodlivými bakteriemi. V roce 1877 popsal Louis Pasteur se svým kolegou Julesem Joubertem, jak lze neškodnými půdními bakteriemi potlačit antrax. V roce 1888 byl objeven první přírodní antibakteriální produkt, nazval se pyocyanáza. E. de Freudenreich zjistil, že *Pseudomonas aeruginosa* zastavuje růst jiných bakterií. Když se ale pyocyanáza podala pacientům, zjistilo se, že je toxická. V roce 1898 dva čeští lékaři, dermatolog Jaroslav Bukovský a mikrobiolog Ivan Honl, úspěšně léčili bércové vředy opakovaným přikládáním extraktu z *Pseudomonas aeruginosa*. Přípravek nijak nepoškozoval lidské buňky. Extrakt byl později používán jako součást Anginolek, které byly ve formě sprejů a tablet určeny k lokální léčbě zánětu mandlí (8,17).

V roce 1928 učinil Alexander Fleming zásadní objev. Když se vrátil z víkendu, všimnul si, že na jedné staré půdě, kterou neuklidil, byla lůžka již vyrostlých kolonií stafylokoka. Usoudil tedy, že to způsobil nějaký produkt plísně, která vyrostla vedle kolonií. Látku nazval „penicilin“, protože ji produkuje plíseň *Penicillium notatum* (8).

2 VLASTNOSTI ANTIBIOTIK

Antibiotika jsou produkována některými mikroby. V malých koncentracích inhibují aktivitu kterékoliv buňky. Inhibiční účinek mají na eukaryotické i prokaryotické buňky. Je pro ně typická selektivní toxicita, takže působí pouze na určité buňky (spektrum účinku) (16).

Antibiotika jsou určena k léčbě bakteriálních infekcí. Pokud se antibiotikum podá na jinou než bakteriální infekci, je léčba neúčinná a pacienta to může spíše poškodit, než aby ho to uzdravilo. Všechna antibiotika působí na více bakterií, to znamená, že „zabíjejí“ i naši přirozenou mikroflóru, což má za následek osídlení nemocného člověka mikroorganismy, které vyvolávají další zdravotní komplikace (3).

Aby se antimikrobiální látka mohla podávat jako lék, musí potlačovat množení mikroorganismů nebo je zabíjet v takových dávkách, které nejsou toxické pro náš organismus. Tento poměr se nazývá chemoterapeutický index. Čím je hodnota indexu vyšší, tím je látka pro nás méně toxická, takže pro léčbu vhodná (9).

2.1 Účinek antibiotik

Některé antibakteriální látky inhibují pouze růst bakterií (bakteriostatické) a jiné látky bakterie zabíjejí (baktericidní), viz tabulka č. 1. Čili bakteriostatický děj je vratný a baktericidní je nevratný a rychlý, zřejmý účinek bývá do 48 hodin. Někdy je tato klasifikace ne zcela jednoznačná, protože některé látky mohou usmrcovat pouze určité druhy, ale na ostatní působí bakteriostaticky, příkladem je chloramfenikol, který zabíjí *Heamophilus influenzae*, ale inhibuje růst *Escherichia coli* (6).

Tabulka č. 1: Přehled účinku antibiotik uvedených v této práci.

Účinek antibiotik na bakterie	
<i>bakteriostatický</i>	<i>baktericidní</i>
makrolidy streptograminy tetracykliny glycylcykliny linkosamidy amfenikoly	peniciliny cefalosporiny karbapenemy glykopeptidy polypeptidová antibiotika aminoglykosidy chinolony

Zdroj: Vlastní

2.2 Mechanismy účinku antibiotik

1. Inhibice syntézy buněčné stěny, to vede k lýze buňky a smrti bakterie. Tento mechanismus účinku mají beta-laktamová antibiotika, která se váží na PBP (penicilin vázající protein). Látky s tímto účinkem ovlivňují bakterie jen v době jejich růstu, ale mají baktericidní efekt.
2. Poškození cytoplazmatické membrány, to vede ke změně permeability, narušení iontové rovnováhy a nakonec k zabití bakterie. Tento efekt je také baktericidní a způsobují ho např. polymyxiny.
3. Inhibice syntézy nukleových kyselin. Takto působící látky jsou např. chinolony a sulfonamidy.
4. Inhibice proteosyntézy. Např. aminoglykosidy se váží na podjednotku 30 S ribozomů a způsobují buďto předčasné ukončení proteosyntézy, blokují její zahájení a včleňují nesprávné aminokyseliny (5).

2.3 Správné použití antibiotik

2.3.1 Zásady správného použití antibiotik

Antimikrobiální léky jsou podávány velmi často, proto se musí dodržovat určité zásady, které by měly předejít rezistenci bakterií na antibiotika.

Při preskripci antibiotik je nezbytné zvážit následující okolnosti:

- zdali se jedná o infekční onemocnění;
- jestli je infekce bakteriální, virová, mykotická či parazitární;
- jaké antibiotikum bude nejlepší použít z farmakologického hlediska (vazba na bílkoviny, vylučování, vstřebávání atd.);
- musíme určit citlivost nebo rezistenci původce na antimikrobiální látku;
- znalost bakteriálního osídlení místa, kde se infekce nachází;
- nežádoucí účinky léků;
- celková doba užívání antibiotik, interval mezi léky a množství dávky;
- jestli je nutné léčbu nasadit hned nebo počkat na přesnější vyšetření (2).

2.3.2 Empirická, úvodní a cílená terapie

Empirická terapie je postup, který vychází z obecných předpokladů pro volbu antibiotik. Před zahájením léčby se tedy neprovádí žádný odběr vzorku pro mikrobiologické vyšetření, lékař to buď nepokládá za nutné nebo vhodný vzorek nelze z nějakého důvodu získat.

Zahájení úvodní terapie vždy předchází odběr vzorku pro mikrobiologické vyšetření. Tato léčba se indikuje u vážných infekcí. Jejím smyslem je co nejdříve přejít na cílenou terapii, která je zaměřena na prokázaného původce infekce a vychází z vyšetřené citlivosti (3,11).

3 SKUPINY ANTIBIOTIK

3.1 Beta-laktamová antibiotika

Látky v této skupině mají ve své molekule beta-laktamový kruh, další společnou vlastností je stejný mechanismus účinku, podobná antimikrobiální účinnost, dobrá snášenlivost a při rozložení beta-laktamového kruhu ztráta účinnosti. Proti intracelulárním organismům jsou neúčinné. Jen novější beta-laktamy působí proti přirozeně rezistentním bakteriím (např. *Pseudomonas aeruginosa*) (1,5,6).

3.1.1 Peniciliny

Peniciliny jsou antibiotika, která se používají nejdéle. Významnou vlastností penicilinů je, že jsou málo toxické, tudíž se mohou podávat i v těhotenství. Naopak nežádoucími vlastnostmi jsou alergie na peniciliny, které mohou přejít až k anafylaktickému šoku (5).

Peniciliny a cefalosporiny mají stejný mechanismus účinku. V plazmatické membráně bakterií mají peniciliny specifické místo, kam se váží, nazývá se „peniciliny vázící proteiny.“ Inhibují syntézu peptidoglykanu u G⁺ bakterií, která vede k rozkladu a smrti buňky (1,5).

Do skupiny aminopenicilinů patří amoxicilin a ampicilin. Proti *Haemophilus influenzae* a *Enterococcus spp.* jsou více účinné, než peniciliny G. Dále jsou účinné proti *Enterobacteriaceae* neprodukující beta-laktamázu. V běžné praxi jsou nejčastěji podávanými širokospektrými peniciliny a jejich účinnost lze rozšířit inhibitory beta-laktamázu. Bohužel se po jejich podání objevují alergické reakce častěji než u penicilinu (1,5,13).

Další skupinou jsou antistafylokokové peniciliny, kam patří oxacilin, cloxacilin, dicloxacilin a meticilin. Jsou stabilní v kyselém prostředí a vůči penicilináze *Staphylococcus aureus*. Jejich spektrem účinku jsou tedy hlavně streptokoky a stafylokoky. Meticilin se může podávat pouze parenterálně a je celkem toxický, proto se nahrazuje oxacilinem (1,13).

Zástupcem skupiny acylureidopenicilinů je piperacilin. Tyto léky jsou určeny k léčbě těžkých infekcí, hlavně nozokomiálních, které jsou vyvolány pseudomonádami.

Mají mnoho nežádoucích účinků a nejsou odolné vůči beta-laktamázám. Piperacilin dobře proniká do tkání a prostupuje placentární membránou (1,5,13).

3.1.2 Inhibitory beta-laktamáz

Patří sem: kyselina klavulanová, sulbaktam a tazobaktam. Inhibují některé serinové beta-laktamázy. Používají se hlavně v kombinaci s antibiotiky, protože rozšiřují antimikrobní spektrum o stafylokoky. Nepodávají se samostatně, protože kromě sulbaktamu mají velmi slabý antimikrobiální účinek (1,5).

3.1.3 Cefalosporiny

Stejně jako peniciliny inhibují růst buněčné stěny bakterií, jsou ale odolnější proti beta-laktamázám, takže mají širší spektrum účinku. Jsou relativně málo toxické, ale k nežádoucím účinkům patří alergie. Tato antibiotika lze podávat parenterálně i perorálně.

Původní cefalosporiny jsou produkty houby *Cephalosporium acremonium*, dnes se ale vyrábějí synteticky. Základem je kyselina 7-aminocefalosporanová a ve své struktuře mají čtyřčlenný beta-laktamový kruh. Jsou stabilní v kyselém prostředí (1,5).

Mikrobiologická klasifikace a spektrum účinku:

1. Generace: G+ bakterie (cefalexin, cefazolin)
2. Generace: G+ i G- bakterie (cefamandol, cefuroxim)
3. Generace: G- bakterie (cefoperazon, ceftazidim, cefotaxim)
4. Generace: G+ i G- bakterie, *P. aeruginosa* (cefpirom, cefepim) (1)

Přirozená rezistence: *Listeria spp.* a *Enterococcus spp.* (1)

3.1.4 Karbapenemy

Mají široké spektrum účinku a jsou stabilní vůči působení většiny beta-laktamáz. Používají se jako rezervní antibiotika na nozokomiální infekce způsobené multirezistentními kmeny bakterií. Rezistence k těmto antibiotikům patří mezi nejzávažnější.

Podávají se jen parenterálně, jsou málo toxické, ale mohou být neurotoxické, pokud se špatně dávkuje (1,5).

Mezi karbapenemy patří: meropenem, imipenem, doripenem a ertapenem (1)

Spektrum účinku:

- G+ tyčky (*Corynebacterium spp.*, *Listeria monocytogenes* [kromě meropenemu])
- G+ koky (rezistenci má *Enterococcus faecium*, MRSA [meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*] a MRSE [meticilin-rezistentní *Staphylococcus epidermidis*])
- G- koky (*Neisseria spp.*)
- anaerobní bakterie
- *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* (1)

3.2 Glykopeptidy

Inhibují syntézu buněčné stěny bakterií (peptidoglykanu). Mají velkou molekulovou hmotnost, proto špatně pronikají do gramnegativních bakterií. Jsou nestálé v zásaditém prostředí. Orálně jsou podávány jen u infekcí způsobených *Clostridium difficile*. Mají však nežádoucí účinky, jako nefrotoxicita a ototoxicita, při rychlém podání se může objevit „syndrom rudého muže“ (uvolnění histaminu z mastocytů) (1,6).

Mezi glykopeptidy patří: vankomycin a teikoplanin (1)

Spektrum účinku:

- koaguláza negativní stafylokoky
- *Staphylococcus aureus* (MRSA)
- streptokoky (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*)
- enterokoky (*E. faecium*, *E. faecalis*)
- *L. monocytogenes*
- *Clostridium spp.* (1)

Přirozená rezistence: *Rickettsia spp.*, *Chlamydia spp.*, *Mycoplasma spp.* a G- bakterie (1)

3.3 Polypeptidová antibiotika

Do této skupiny antibiotik patří dosti toxické látky a podávají se hlavně lokálně. Poškozují buněčnou stěnu gramnegativních bakterií, naváží se na fosfolipidovou vrstvu, a tím vyvolají ireverzibilní změny osmotických poměrů v buňce.

Polymyxin B se dnes používá hlavně v očních a ušních kapkách. Bacitracin je značně neurotoxický, proto se používá jen lokálně, takto je velmi dobře snášen (1,5,13,16).

Mezi polypeptidová antibiotika patří: bacitracin, polymyxin B a kolistin (1)

Spektrum účinku:

- nefermentující tyčky (*Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*)
- *Enterobacteriaceae* (komě *Proteus spp.*, *Morganella spp.*, *Serratia marcescens*)

Přirozená rezistence: G+ bakterie (1)

3.4 Aminoglykosidy

Ve své molekule mají aminocukry, které se vážou glykosidovou vazbou. Jsou to širokospektrá antibiotika s rychlým účinkem. Často se používají v kombinaci s beta-laktamovými antibiotiky. Váží se na ribozomy a inhibují syntézu bílkovin u citlivých bakterií, tím se zastaví její růst a rozmnožování. Mají závažnou toxicitu, proto se podávají jen u vážných onemocnění. Při systémové léčbě se musejí podat intravenózně. Streptomycin se používá jako antituberkulotikum druhé volby (1,5,6).

Mezi aminoglykosidy patří: neomycin, gentamicin, streptomycin, ribostamycin, amikacin a další. (1)

Spektrum účinku: *Enterobacteriaceae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *H. influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium spp.* (1)

Přirozená rezistence: *Clostridium spp.*, *Legionella spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus spp.*, *Bacteroides spp.* (1)

3.5 Makrolidy

Makrolidy jsou velké cyklické molekuly. Mají středně široké spektrum účinku, inhibují syntézu bílkovin a pronikají dobře do tkání a buněk, což se využívá hlavně proti mykoplazmatům a chlamydiím. Slouží jako antibiotika druhé volby a nasazují se pacientům, kteří jsou alergičtí na penicilin. Makrolidy patří mezi bezpečná antibiotika. Jsou inaktivní proti *Enterobacteriaceae*. Erythromycin je v těle dobře distribuován a ničí i nitrobuněčné organismy (1,5,6,15).

Mezi makrolidy patří: josamycin, spiramycin, erythromycin, clarithromycin a další. (1)

Spektrum účinku:

- G+ bakterie (kromě *Enterococcus spp.* a některých viridujících streptokoků)
- G- bakterie
- anaerobní bakterie
- spirochety (*Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi*)
- *Mycobacterium spp.* (1)

3.6 Streptograminy

Tato antibiotika jsou izolována ze *Streptomyces spp.* a jsou odvozeny od makrolidového preparátu pristinamycinu. Jsou dobře účinné na problematické G+ bakterie a mají úzké spektrum účinku. Zasahují do syntézy bílkovin, tím brání prodlužování peptidových řetězců. Jako nežádoucí reakce byly zpozorovány bolesti v místě aplikace a gastrointestinální potíže (1,5,6,13).

Mezi streptograminy patří: streptogramin A a B (quinupristin-dalfopristin) (1)

Spektrum účinku: *S. aureus* (MRSA), vancomycin rezistentní *Enterococcus faecalis*, streptokoky (1)

3.7 Tetracykliny a glycylykliny

Jako další antibiotika inhibují syntézu bílkovin (vazbou na ribozomální podjednotku 30 S blokují translaci bílkovin v bakteriích). Mohou být inaktivovány ionty Mg^{2+} a Ca^{2+} .

Tetracykliny mají hodně nežádoucích účinků a podávají se hlavně perorálně. V těle jsou dobře distribuovány a inhibují intracelulární bakterie. Vzhledem k jejich širokému spektru účinku vyvolávají superinfekce, dysmikrobie a ovlivňují množení buněk, proto by se neměly nasazovat těhotným ženám a dětem (1,5,6,15).

Mezi tetracykliny patří: doxycyklin (1)

Mezi glycylykliny patří: tigecyklin (1)

Spektrum účinku: G+ a G- bakterie, mykobakterie, protozoa (*Plasmodium spp*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Toxoplasma gondii*) (1)

3.8 Chinolony (fluorochinolony)

Chinolony jsou chemoterapeutika odvozená od kyseliny nalidixové. Inhibují syntézu DNA gyrázy, která správně splétá a rozplétá řetězce nukleové kyseliny bakterií. Výhodou těchto látek je jejich dobrá prostupnost do tkání a nevýhodou je, že se nemohou podávat megadávky. Byly popsány závažné nežádoucí účinky, proto by se flourochinolony neměly podávat těhotným a dětem. Mají široké spektrum účinku (1,5,6,13).

Mezi chinolony patří:

1. Generace: kyselina nalidixová a oxolinová
2. Generace: kyselina pipemidová, norfloxacin

3. Generace: ciprofloxacin, ofloxacin
4. Generace: moxifloxacin (1)

Spektrum účinku:

- G- bakterie (*Legionella spp.*, *Helicobacter spp.*, *Chlamydia spp.*...)
- G+ bakterie (*Streptococcus pneumoniae*)
- *Toxoplasma gondii*
- *Mycobacterium spp.* (1)

3.9 Linkosamidy

Vyznačují se dobrou pronikavostí do kostí a jsou vyhrazena pro nemocniční infekce kostí a měkkých tkání. Váží se na ribozomální podjednotku 50 S a inhibují syntézu bílkovin. Klindamycin je chlorovaný derivát linkomycinu a je mnohem účinnější. Linkomicyn patří stejně jako penicilin G mezi nejméně toxické látky (1,5,6).

Mezi linkosamidy patří: linkomycin, klindamycin (1)

Spektrum účinku: streptokoky, stafylokoky, anaeroby (1)

3.10 Amfenikoly

Chloramfenikol se skládá z nitrobenzenového jádra a inhibuje syntézu peptidové vazby. Při perorálním podání se dobře absorbuje, podání je možné i intravenózně. Má široké spektrum účinku a dobře proniká do tkání, buněk a nejdůležitější vlastností je, že proniká i do likvoru. Jeho používání je velmi omezeno, protože má potenciální hematologickou toxicitu (aplazie a hyperplazie kostní dřeně) (1,5,6).

Mezi amfenikoly patří: chloramfenikol (1)

Spektrum účinku: G+ i G- bakterie (*Rickettsia spp.*, *Chlamydia spp.* atd.) (1)

Přirozená rezistence: *P. aeruginosa*, *Nocardia spp.*, *Acinetobacter spp.* (1)

4 GRAMNEGATIVNÍ TYČKY

Pojem „tyčka“ označuje tvar bakterií, který vidíme v mikroskopu. Bakterie vidíme většinou protáhlé (tyčky) nebo kulovité. Určení tvaru bakterie pomáhá ke správně diagnostice.

U gramnegativních bakterií tvoří bakteriální stěnu tenká vrstva peptidoglykanu a povrchová fosfolipidová dvojvrstva, která zabraňuje průniku antimikrobiálních látek do cytoplazmy a chrání bakteriální buňku před imunitním systémem. V periplazmatickém prostoru mohou být přítomny beta-laktamázy, které navíc rozkládají některé antimikrobiální látky. Na zevní straně vnější membrány jsou lipopolysacharidy, které vytváří endotoxin a termostabilní antigen O. Obecně je známo, že gramnegativní bakterie jsou mnohem odolnější vůči působení chemoterapeutik než grampozitivní bakterie, jejich stěna je sice tenčí, ale složitější (5,6,9,15).

Infekce způsobené rezistentními gramnegativními bakteriemi jsou v současné době velký problém, jsou epidemiologicky významnější než grampozitivní bakterie. Výrazně se podílejí na morbiditě a mortalitě pacientů. Stále častěji se objevují původci rezistentní k rezervním antibiotikům – karbapenemům. Mezi nejproblematictější gramnegativní bakterie patří hlavně *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* a *P. aeruginosa* (3).

4.1 Gramovo barvení

Barvení podle Grama je základním barvením v bakteriologii pro identifikaci bakterií, kdy se bakterie rozdělují podle barvitelnosti a složení bakteriální stěny na gramnegativní (červené) a grampozitivní (modré). Tato metoda je velmi rychlá a umožňuje částečně cílené nasazení antibiotik podle toho, zda bakterie bude grampozitivní nebo gramnegativní.

Bakteriální buňka se obarví nejdříve modře směsí krystalové violeti a šťavelanu amonného, poté se vytvoří komplex s Lugolovým roztokem. U gramnegativních bakterií se tento komplex vyplaví alkoholem a bakterie se dobarví červeně karbolfuchsinem nebo safraninem. Grampozitivní bakterie tedy zůstávají modré (4,6).

4.2 Vybraní zástupci gramnegativních tyčků

4.2.1 *Escherichia coli*

E. coli je tyčinkovitá gramnegativní bakterie, která roste ve fakultativně anaerobním prostředí. Dobře přežívá i v prostředí mimo lidské tělo, proto je možné ji využít jako indikátor fekálního znečištění vody. Je běžnou součástí střevní mikroflóry lidí, kde produkuje vitamin K a chrání střevo před patogenními bakteriemi. Je ale potenciálně patogenní, některé kmeny *E. coli* ale mohou vyvolat průjemy, otravy z potravin a mimo střevo je to nejčastější původce infekcí močového traktu.

Stále častěji se objevuje rezistence na antibiotika, která je hlavně způsobena jejich nadužíváním. Tuto rezistenci může *E. coli* šířit pomocí svých genů pro rezistenci i mezi jiné bakterie, např. *S. aureus* (7,9,15).

4.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa je gramnegativní tyčka, která roste v aerobním prostředí. Dokáže růst i v prostředí se sníženým obsahem kyslíku a je nenáročná na živiny. Vyskytuje se na lidské kůži, v různých vodách včetně odpadních a v půdě. Roste dobře na běžných půdách, tvoří typické pigmenty a má charakteristickou jasmínovou vůni kolonií.

Patří k nejobávanějším původcům nozokomiálních infekcí, protože kolonizuje různé předměty a povrchy, kvůli tomu se často vyskytuje na lékařských nástrojích a katétrech. Dále způsobuje sepse, infekce popálenin, plic a močového traktu.

P. aeruginosa je na většinu antibiotik přirozeně rezistentní, může se u ní vyskytnout i získaná rezistence po neúspěšné léčbě, vlivem mutací či akvizice DNA díky horizontálnímu přenosu. Zmenšení porinů způsobuje rezistenci k několika antibiotikům zároveň. Tím, že dobře přežívá na předmětech denní potřeby a nemocničních nástrojích, napomáhá šíření genů rezistence v populaci nemocničních kmenů (7,9,10,14).

5 REZISTENCE BAKTERIÍ NA ANTIBIOTIKA

Bakteriální rezistence je vlastnost bakterií přežít v přítomnosti antimikrobiální látky, čili schopnost růst a množit se v prostředí, kde jsou antibiotika. Rezistence se dělí na přirozenou (primární, inherentní) a získanou (sekundární). Příčinou získané rezistence je nejčastěji dlouhodobá necílená léčba, což může být nesprávná indikace nebo zbytečné podání antibiotik, takže se z původně citlivých bakterií stávají rezistentní bakterie. Přirozená rezistence je přirozená odolnost bakterií, které nejsou v spektru působnosti daného antibiotika (2,6,13).

Ukazuje se, že s rychlým rozvojem nových antibakteriálních látek jsou bakterie schopny si velmi lehce vytvořit rezistenci na každou novou látku. Jinak řečeno je nárůst rezistence způsoben velmi rychlou evolucí bakteriálního genomu a selekčním tlakem prostředí. Vážná hrozba pro léčbu život ohrožujících infekcí je nyní právě rostoucí rezistence ve spojení se zpomalením objevování nových antibakteriálních látek (6,13).

5.1 Zkřížená rezistence

Zkřížená rezistence znamená, že mikroorganismy jsou necitlivé na antibiotika se stejným mechanismem účinku a podobnou strukturou. Tuto rezistenci může způsobit chromozomální mutace, která vznikne v jedné bakteriální buňce a ta potom syntetizuje změněný protein. Nebo vznikne mutací více, například v PBP (6,12).

5.2 Multirezistence

Multirezistentní organismy (MDRO) jsou takové, které jsou rezistentní na více než jednu skupinu antimikrobiálních látek. Infekce způsobené těmito organismy může vést k nesprávné antimikrobiální terapii a tím k horším výsledkům pacientů. Do této skupiny např. patří vysoce odolné gramnegativní bakterie *K. pneumoniae* produkující karbapenemázu a *Acinetobacter spp.* Tyto bakterie mohou být odolné vůči všem současně dostupným antimikrobiálním látkám kromě např. polymyxinů. Nárůst rezistence je velký problém, protože počet nových antimikrobiálních látek, které jsou ve vývoji, je nízký.

Ve většině studií jsou MDRO popsány jako „rezistentní vůči třem nebo více antimikrobiálních tříd“. Jiná metoda popisující MDRO je definována jako „rezistentní vůči jednomu z klíčových antimikrobiálních činidel“. Tyto bakteriální kultury mají často zkříženou rezistenci na více antimikrobiálních tříd, což z nich dělá MDRO.

Celosvětové uplatnění definice pro MDRO by značně pomohlo srovnatelnosti údajů a lepší pochopení problému MDRO. To dosud nebylo možné, kvůli rozdílným definicím a rozdílným činidlům, která jsou používána pro rutinní testování antimikrobiální citlivosti v mikrobiologických laboratořích (18).

5.3 Bakteriální plasmidy

Plasmid je malá molekula DNA, která se vyskytuje u některých bakterií a umí se samy replikovat. Některé plasmidy nesou geny pro rezistenci, čili vytváří enzymy, které rozkládají antibiotika. Plasmidy poskytují bakteriím nové funkce a vytváření nových produktů. Díky nim jsou bakterie schopné přežít změny teplot, přichytávat se na sliznicích a hlavně pomáhají rušit působení antibiotik (8,9).

U transpozonů se také mohou objevit geny rezistence. Jsou schopny měnit svou pozici („skákat“) a vytvářet kopie, které se začlení do plasmidů nebo chromozomů (6).

Po zavedení penicilinu k léčebným účelům se zanedlouho objevily bakterie k němu rezistentní. Z počátku byly tyto bakterie pouze v nemocnicích, protože tam se penicilin používal nejvíce. Nemocniční kmeny měly schopnost zničit penicilin, protože získaly plasmid, který toto umožňoval (8).

5.4 Mechanismy vzniku rezistence

1. Inhibice antibiotik bakteriálními enzymy. Mezi tyto enzymy patří např. beta-laktamázy a karbapenamázy (viz kapitola 5.5).
2. Změna propustnosti vnější membrány. Tento mechanismus se vyskytuje u gramnegativních bakterií, kdy přes poriny, které jsou ve vnější membráně, prostupují beta-laktamy a získávají přístup ke svým cílovým PBP. Mutace v genech porinů může za horší propustnost vnější membrány a tedy i za rezistenci.

Pokud jsou kmeny, které používají stejné poriny, může se objevit zkřížená rezistence na antibiotika (6).

3. Cílové místo antibiotik změni strukturu. Pokud se cílové místo změní, antibiotikum se nemůže tedy navázat. Tato rezistence se objevuje např. u chloramfenikolu. Enzym, na který chloramfenikol působí, se mutací změni a bakterie se stane rezistentní k tomuto antibiotiku (2,8).
4. Vznik aktivního buněčného efluxu. Pokud mají bakterie aktivní efluxový systém, tak mohou vylučovat antibiotika z buňky do extracelulárního prostoru. Tímto způsobem přežívají na příklad bakterie rezistentní k tetracyklinu, který se nestihne v buňce ani nahromadit. Tento eflux je tak účinný, že rezistentní buňky mohou přežít až stonásobnou koncentraci antibiotika, než jaká se běžně podává (2,8).

5.5 Beta-laktamázy

Beta-laktamázy jsou enzymy, které ničí beta-laktamová antibiotika (např. peniciliny a cefalosporiny) a tím způsobují nejčastější typ rezistence. Enzymy, které zneškodňují antibiotika, jsou pro ně specifické a pro jedno antibiotikum jich existuje několik. Vznikají mikrobiologicky neaktivní produkty, protože tyto enzymy hydrolyzují amidovou vazbu beta-laktamového kruhu. U grampozitivních bakterií se beta-laktamázy uvolňují do vnějšího prostředí a u gramnegativních bakterií zůstávají převážně v periplazmě (2,6,8,19).

5.5.1 Karbapenemázy

Karbapenemázy jsou podskupinou beta-laktamáz a hydrolyzují amidovou vazbu beta-laktamového kruhu karbapenemu. Karbapenemázy produkují nejčastěji gramnegativní nefermentující tyčky (acinetobaktery, pseudomonády) a způsobují tím nejzávažnější typ rezistence. Šíření těchto enzymů probíhá přes konjugativní plasmidy. V tabulce č. 2 je uvedeno, jak se karbapenemázy rozdělují (20).

Do skupiny 2f patří např. KPC (*K. pneumoniae* Carbapenemase) a hydrolyzují cefalosporiny, aztreonam a peniciliny. Bakterie, které produkují tyto enzymy, jsou rezistentní skoro ke všem antibiotikům (19).

Metalo- β -laktamázy (MBL) produkuje např. *P. aeruginosa* a *Bacillus cereus* a způsobují hydrolyzu cefalosporinů, karbapenemů a penicilinů (19).

Skupina OXA je velmi heterogenní a všechny skupiny hydrolyzují oxacilin. OXA-48 je přenášena plasmidy a u enterobakterií byla objevena jako jediná (19).

Tabulka č. 2: Klinicky významné transferabilní karbapenemázy.

Skupina dle klasifikace podle Bush/Amblera, označení	Označení karbapenemáz	Bakteriální druhy u nichž byly tyto enzymy nalezeny
Skupina 2f/A	KPC, GES, SME, NMC, IMI	<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>K. pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>S. marcescens</i> atd.), <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>
Skupina 3/B, metalo- β -laktamázy	VIM, IMP, GIM, SIM, NDM, SPM, AIM, KMH, DIM, TMB	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>
Skupina 2d/D, OXA	Skupina OXA-48 (OXA-48, OXA-162, OXA-181 atd.) Skupiny OXA-23, -58, -40	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>A. baumannii</i>

Zdroj: (20).

6 TESTY K PRŮKAZU ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE

6.1 Úvod k metodě MALDI-TOF-MS

MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight - Mass Spectrometry) detekuje molekulovou hmotnost různých látek, včetně malých molekul, což se využívá k detekci aktivity beta-laktamáz. Tato metoda se stala velmi důležitým nástrojem v rutinní mikrobiologické diagnostice. MALDI-TOF-MS detekce rezistence způsobená karbapenemázami patří k nejslibnějším, protože to je jediná metoda, která exaktně detekuje hydrolýzu amidové skupiny beta-laktamového kruhu. Spolu s dalšími přímými testy by se tato metoda měla považovat za zlatý standard (20,21).

6.2 Detekce karbapenemáz

Základní fenotypové metody jsou založeny na inhibici karbapenemáz pomocí EDTA nebo kyseliny fenylborité. Metody ale nejsou dostatečně specifické a skupina OXA nelze vůbec detekovat.

V molekulárně-genetických metodách se dají použít jen známé beta-laktamázy a musí se provádět více polymerázových řetězových reakcí.

Pro specializované referenční laboratoře je stanovení hydrolytické aktivity karbapenemáz v bakteriálním extraktu spektrofotometricky referenční metodou. Další přímou metodou je právě MALDI-TOF-MS, která je schopná vizualizovat molekulu karbapenemů a jejich degradačních produktů.

Pokud je snížena citlivost k alespoň jednomu antibiotiku ze třídy běžných karbapenemů (imipenem, meropenem, ertapenem), může se jednat o producenta karbapenemáz. Měl by se porovnat průměr inhibiční zóny a zjištěná minimální inhibiční koncentrace (MIC) s epidemiologickým cut-off u daného druhu, což v praxi úplně není možné. Lze se však řídit např. podle aktuálních break-pointů EUCAST (viz tabulka č. 3) (20).

Tabulka č. 3: EUCAST tabulka klinických break-pointů karbapenemů pro čeleď *Enterobacteriaceae* (validní od 10.3.2017).

Druh karbapenemu	Průměr inhibiční zóny [mm]		Obsah disku [μg]	MIC break-point [mg/L]	
	C ≥	R <		C ≤	R >
<i>Meropenem</i>	22	16	10	2	8
<i>Imipenem</i>	22	16	10	2	8
<i>Ertapenem</i>	25	22	10	0,5	1
<i>Doripenem</i>	24	21	10	1	2

Vysvětlivky: C = citlivý, R = rezistentní

Zdroj: (22).

6.2.1 Fenotypové testy

Tyto testy jsou založeny na inhibici aktivity karbapenemáz. Do prostředí plotny se obvykle dává disk s inhibitorem a vedle něj disk napuštěný některým z karbapenemů. V aproximačním diskovém testu se srovnávají inhibiční zóny disku s antibiotikem a inhibitorem a disku s indikátorovým antibiotikem (většinou meropenem) (20).

6.2.2 Detekce serinových karbapenemáz a metalobetalaktamáz

Kyselina fenylboritá a její deriváty inhibují KPC, ale i AmpC (chromozomální cefalosporináza). Změny permeability buněčné stěny s kombinací nadprodukce AmpC může u některých bakterií způsobovat rezistenci ke karbapenemům. Proto jsou tyto kmeny nesprávně hodnoceny jako producenti karbapenemáz. Z tohoto důvodu se navrhnul test, kde se přidá inhibitor AmpC – kloxacilin (19,20).

MBL inhibuje např. chelatační činidlo kovových iontů EDTA, proto lze tento inhibitor použít spolu se srovnáním průměru inhibičních zón (20).

PRAKTICKÁ ČÁST

7 CÍLE PRÁCE

Prvním cílem této práce je charakterizovat jednotlivé skupiny antibiotik a poukázat na rychle rostoucí rezistenci vůči nim.

Druhým cílem by mělo být pochopení mechanismů způsobujících rezistenci a proč je nadužívání antibiotik velký problém.

MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie umožňuje detekovat změny molekulové hmotnosti látek s vysokým rozlišením (s přesností < 1 Da). Detekce karbapenemáz pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie byla poprvé popsána v roce 2011 (Hrabák a kol.). Cílem je ověřit metodu na různých izolátech z čeledi *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonadaceae* produkujících různé karbapenemázy (např. typu OXA-48, metalo- β -laktamázy, KPC).

Čtvrtý cíl navazuje na třetí a měl by prokázat specifitu větší než 90 % při použití metody MALDI-TOF-MS bez přidání NH_4HCO_3 do reakčního pufu.

8 VYŠETŘOVANÝ SOUBOR

Pro experimenty byly použity izoláty bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonadaceae* získané z krevního agaru nebo Mueller-Hintonovy půdy. Izoláty byly poskytnuté Ústavem mikrobiologie LF UK (Lékařská fakulta Univerzity Karlovy) a FN (Fakultní nemocnice) v Plzni. Jednalo se o sbírku izolátů z různých evropských a asijských zemí, jimiž disponuje Laboratoř antibiotické rezistence a aplikací hmotnostní spektrometrie.

9 METODA VÝZKUMU

9.1 Metoda MALDI-TOF-MS

9.1.1 Pracovní postup

1. Z vykultivované (18hodinové) bakteriální kultury na Mueller-Hintonovu agaru se vytvoří suspenze ve 2 ml pufru TRIS-HCl s NaCl. Hustota zákalu musí být 2,8 – 3,2 McFarlanda.
2. 1 ml suspenze se přenese do zkumavky (Eppendorf).
3. Centrifugace 3 minuty/1400 otáček.
4. Pipetou se odsaje veškerý supernatant a peleta (usazenina) zůstává na dně zkumavky.
5. K peletě se přidá 50 μ l reakčního pufru a promíchá se pipetou.
6. 2-4 hodiny inkubace při 37 °C.
7. Centrifugace 2 minuty/1400 otáček.
8. Napipetovat 1 μ l supernatantu na MALDI-TOF destičku a nechat zaschnout.
9. Po uschnutí nepipetovat 1 μ l roztoku matrice a nechat zaschnout.
10. Při každém měření se pro kontrolu molekulové hmotnosti napipetuje samotný roztok meropenemu. Nesmí se lišit o více než 0,3 Da, jinak je nutná opětovná kalibrace.
11. Po uschnutí se vzorek může změřit, měří se vždy na několika místech. Intenzita laseru se nastavuje takovým způsobem, aby rozhraní spekter bylo v hodnotách $0,2 \times 10^4$ – $2,0 \times 10^4$.
12. Spektra, která se změří, se uloží do daného adresáře pod označením vzorku.
13. Pomocí programu flexAnalysis se provede analýza spekter.

9.1.2 Obsah činidel

- Pufř pro přípravu suspenze: 20mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7,0.
- Reakční pufř: 0,01% sodium dodecyl sulfáte, 20mM Tris-HCl, 0,1mM meropenem, NH_4HCO_3 , pH 7,0.
- Roztok matrice: 10 mg/ml dihydroxybenzoová kyselina v 50% etanolu (20).

9.1.3 Průběh analýzy

Na MALDI-TOF destičku se aplikuje laser, který způsobí desorpci molekul vzorku a matrice, které jsou na ní, molekuly matrice zároveň předávají vzorku H^+ a tím dochází k ionizaci molekul vzorku. K analýze nabitých molekul v průletovém hmotnostním analyzátoru dochází extrakcí, která je způsobena extrakčním napětím mezi MALDI-TOF destičkou a vstupním otvorem průletového analyzátoru. Poměr m/z (poměr hmotnosti iontu a jeho náboje) se vypočte z doby letu molekul analyzátozem k detektoru (23).

9.1.4 Detektor

Hmotnost každého iontu, který na detektor dopadne, se vypočte z doby letu trubici. Principem většiny detektorů je převod iontů na elektrický signál, vytvoření světelného záření a převedení záření na elektrický proud (fotonásobič), který je pak dál zesílen (23).

9.1.5 Průletový analyzátor

Základní princip tohoto analyzátoru je měření doby letu extrahovaných iontů. Ionty se extrahují pomocí napětí a v závislosti na jejich hmotnosti (m) a velikosti náboje (z) získají rychlost. Různý poměr m/z udává odlišnou rychlost iontů dopadnutých na detektor (23).

9.1.6 Matricí zprostředkovaná laserová ionizace

MALDI využívá matrici, která je schopna přeměnit energii laseru na ionizaci a předat ji vzorku. Nejvíce používané matrice jsou deriváty kyseliny skořicové nebo dihydroxybenzoová kyselina (23).

9.1.8 Vyhodnocení

Při hodnocení výsledků z MALDI-TOF-MS vyhledáváme peaky meropenemu a jeho degradačních produktů (viz příloha č. 1), tím zjistíme, zda bakterie produkuje

karbapenemázy. Meropenem má relativní molekulovou hmotnost 383,5. Při použití MALDI-TOF-MS nacházíme jeho iont o m/z 384,5. Sodné soli meropenemu mají m/z 406,5 a 428,5 a degradační produkty meropenemu mají m/z 358,5 (dekarboxylovaný produkt) a 380,5 (sodná sůl dekarboxylovaného produktu). V tabulce č. 4 je přehledně uvedena přítomnost či nepřítomnost daných peaků u bakterií, které produkují nebo neprodukují karbapenemázy (20).

Tabulka č. 4: Tabulka pro vyhodnocení MALDI-TOF-MS.

VÝSLEDEK	Peak (m/z)				
	384,5	406,5	428,5	358,5	380,5
<i>Produkuje karbapenemázu</i>	N	N	N	P	P
<i>Neprodukuje karbapenemázu</i>	P	P	P	N	N

Vysvětlivky: N-peak není přítomen, P-peak je přítomen

Zdroj: vlastní.

10 PREZENTACE A INTERPRETACE ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ

Vyšetřovala jsem celkem 108 izolátů bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* (*S. marcescens*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *E. coli*) a *Pseudomonadaceae* (*P. aeruginosa*), které byly producenty karbapenemáz. Tabulka č. 5 ukazuje, jaká bakterie produkuje jaký druh karbapenemázy a rozsah MIC každé bakterie pro antibiotika meropenem a ceftazidim. Nejdůležitější ukazatel této tabulky je počet pozitivních karbapenemáz za použití metody MALDI-TOF-MS a MALDI-TOF-MS u které byl do reakčního pufru přidán 50mM NH₄HCO₃ (bikarbonát amonný).

Tabulka č. 5: Soubor vyšetřených izolátů metodou MALDI-TOF-MS bez přidání NH₄HCO₃ a po přidání NH₄HCO₃.

Druh karbapenemázy	Druh bakterie	Počet izolátů	Rozsah MIC [μg/ml] pro:		Počet pozitivních karbapenemáz při použití:	
			Meropenem	Ceftazidim	MALDI-TOF-MS	MALDI-TOF-MS (+ NH ₄ HCO ₃)
IMP	<i>S. marcescens</i>	1	>16	>32	1	1
	<i>P. aeruginosa</i>	3	>16	>32	3	3
VIM	<i>S. marcescens</i>	2	>16	4 až 8	2	2
	<i>P. aeruginosa</i>	26	4 až >16	16 až >32	16	25
	<i>E. cloacae</i>	7	1 až >16	24 až >32	7	7
	<i>K. pneumoniae</i>	6	1 až >16	32 až >32	6	6
NDM	<i>E. cloacae</i>	10	0,5 až 16	>32	10	10
	<i>K. pneumoniae</i>	4	4 až 16	>32	4	4
	<i>E. coli</i>	10	1 až >16	>32	10	10
KPC	<i>E. cloacae</i>	1	>16	>32	1	1
	<i>K. pneumoniae</i>	20	8 až >16	32 až >32	20	19
OXA-48	<i>E. cloacae</i>	1	8	>32	0	1
	<i>K. pneumoniae</i>	11	0,5 až >16	0,5 až >32	1	11
	<i>E. coli</i>	6	0,5 až >16	0,5 až 32	1	6

Zdroj: vlastní.

Tabulka č. 6 přehledně znázorňuje kolik izolátů bylo hodnoceno jako pozitivní za použití obou metod. Z celkového počtu 108 izolátů bylo metodou MALDI-TOF-MS detekováno 82 pozitivních karbapenemáz a metodou MALDI-TOF-MS s přidavkem NH_4HCO_3 do pufru bylo detekováno 106 karbapenemáz.

Tabulka č. 6: Celkový počet pozitivních karbapenemáz.

Druh bakterie/čeled'	Celkový počet izolátů	Celkový počet pozitivních karbapenemáz při použití:	
		MALDI-TOF-MS	MALDI-TOF-MS (+ NH_4HCO_3)
<i>P. aeruginosa</i>	29	19	28
<i>Enterobacteriaceae</i>	79	63	78
CELKEM	108	82	106

Zdroj: vlastní.

Tabulka č. 7 porovnává úspěšnost detekce pozitivních karbapenemáz obou metod. Senzitivita testu udává s jakou spolehlivostí odhalí sledovaný znak (nemoc) a specifita testu zkoumá pouze skutečně negativní znaky. Na této tabulce je vidět, že pokud se při metodě MALDI-TOF-MS přidá do reakčního pufru NH_4HCO_3 , dochází tak k významnému zvýšení senzitivity. Specifita testu je 100 %, protože při vyhodnocování bylo zjištěno, že žádný negativní kmen nebyl vyhodnocen jako pozitivní.

Tabulka č. 7: Vyhodnocení metod.

Metoda	Skutečně pozitivní	Falešně negativní	Senzitivita	Specifita
MALDI-TOF-MS	82	26	76 %	100 %
MALDI-TOF-MS (+ NH_4HCO_3)	106	2	98 %	100 %

Zdroj: Vlastní

MALDI-TOF-MS tedy správně detekovala všechny producenty KPC, NDM a IMP, ale u 10 izolátů *P. aeruginosa* produkující VIM selhala. Mohlo se jednat o nějaké peaky v pozadí, které bránily správnému vyhodnocení. U enzymů OXA-48,

které mají slabou karbapenemázovou aktivitu, byly vyhodnoceny pouze 2 izoláty z 18 jako pozitivní.

U MALDI-TOF-MS po přidání NH_4HCO_3 do reakčního pufru výrazně vzrostla senzitivita. Všechny izoláty produkující NDM, IMP a OXA-48 byly správně hodnoceny jako pozitivní. U producentů KPC byl pouze jeden izolát *K. pneumoniae* vyhodnocen jako falešně negativní a u producentů VIM byl jen jeden izolát *P. aeruginosa* nesprávně vyhodnocen.

11 DISKUSE

Před zahájením psaní mé bakalářské práce jsem si určila několik cílů, kterých bych po dopsání práce chtěla dosáhnout. Úkolem bylo získat velké množství informací a porozumět jim, popřípadě porovnat literaturu, ze které jsem informace čerpala.

Účel teoretické části byl, abych si osvojila co nejvíce informací o antibiotikách, jejich rozdělování do různých skupin a pochopení mechanismů účinků jednotlivých antibiotik. První cíl zahrnoval také poukázání na rychle rostoucí rezistenci na antibiotika. Myslím si, že kapitoly o rezistenci a antibiotikách obecně jsou velmi rozsáhlé a snadno pochopitelné pro jakéhokoli pracovníka či studenta ve zdravotnickém oboru. Já osobně jsem se toho hodně naučila a díky tomu jsem byla schopna provést praktickou část detekující mechanismy rezistence na antibiotika. První cíl práce jsem tedy splnila.

V druhém cíli jsem se zaměřila na pochopení mechanismů způsobující rezistenci na antibiotika a z jakého důvodu by se antibiotika neměla nadužívat. Jako hlavní mechanismus rezistence, kterému jsem se v této práci nejvíce věnovala, byla produkce enzymů (karbapenemáz), které některé bakterie produkují a tím způsobují nejčastější typ rezistence. Tato tematika mi dosud nebyla příliš známa, ale díky této práci jsem se o problematice karbapenemáz dozvěděla mnoho a mohla tak na ni zaměřit praktickou část.

Jedním z mnoha důvodů, proč by se antibiotika neměla často předepisovat, je to, že si bakterie velmi lehce vytváří rezistenci na nové látky, proto není jednoduché vytvářet stále nové antimikrobiální látky. V této práci jsem problém popsala a nabídla řešení ve formě zásad, které je nutno si před nasazením antibiotické léčby uvědomit a dodržovat. Také jsem popsala druhy terapie a v případě nasazení antibiotik je samozřejmě ideální cílená terapie, čili taková, která je zaměřená na prokázaného původce onemocnění a je stanovena jeho citlivost k antibiotikům. Druhý cíl práce jsem také splnila.

Třetím cílem se zabývá praktická část, kde je použita metoda MALDI-TOF-MS k detekci karbapenemáz. Je to moderní a velmi spolehlivá metoda, která by se měla používat v rutinních laboratořích, aby přispěla k detekci mechanismů rezistence a tím k zabránění šíření bakterií, které to způsobují.

Ze 108 izolátů, které jsem pomocí této metody vyšetřovala, bylo za použití MALDI-TOF-MS 82 izolátů vyhodnoceno jako pozitivní producenti karbapenemáz. Po přidání 50mM NH_4HCO_3 do reakčního pufru bylo testem detekováno 106 pozitivních producentů karbapenemáz. Tím bych chtěla navázat na čtvrtý cíl, který měl prokázat senzitivitu testu větší než 90 % bez použití NH_4HCO_3 . Při použití prvního způsobu detekce, jsem vypočítala senzitivitu metody 76 %, takže tohoto cíle jsem nedosáhla, ale za použití druhého způsobu detekce vyšla senzitivita 98 %, což je krásný výsledek.

ZÁVĚR

Závěrem bych chtěla shrnout mou bakalářskou práci s názvem „Rychlé testy pro detekci mechanismů antibiotické rezistence u gram negativních tyčků“. Rezistence na antibiotika je stále rostoucí globální problém, který bychom se měli snažit snížit nebo lépe – eliminovat, což samozřejmě není možné. Lékaři často předepisují antibiotika na banální onemocnění nebo je předepisují bez předchozího vyšetření pacienta. Tohle je jedna z věcí, která k rezistenci na antibiotika přispívá a lékaři by si měli toto riziko více uvědomovat. Zvláště nebezpečné jsou nemocniční kmeny bakterií, které bývají často rezistentní ke všem známým antibiotikům. Já jsem v této práci uvedla hlavně *P. aeruginosa*, velmi nebezpečnou bakterii, která může způsobovat nozokomiální infekce, protože často kolonizuje nemocniční nástroje a katétry. Tato bakterie může šířit své geny rezistence na další nemocniční patogeny.

Ve své práci jsem charakterizovala většinu skupin antibiotik, které známe. Kapitola o antibiotikách je velmi rozsáhlá a naučná. Zaměřila jsem se také na to, jak antibiotika fungují a jaký účinek mají.

V oblasti rezistence na antibiotika, která je hlavním tématem mé práce, jsem se zaměřila hlavně na karbapenemázy, které rozkládají beta-laktamový kruh karbapenemu. Tyto enzymy produkují nejčastěji gramnegativní tyčky, kam patří i již zmíněná *P. aeruginosa* a způsobují tím nejčastější typ rezistence.

V praktické části jsem se zaměřila na producenty karbapenemáz a jejich detekci. Výzkum probíhal za pomoci moderní metody MALDI-TOF-MS. Na začátku psaní práce jsem si stanovila čtyři cíle, které jsem chtěla splnit nebo potvrdit. Splnila jsem tři. Jeden z těchto cílů byl ověřit metodu MALDI-TOF-MS na souboru izolátů z čeledi *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonadaceae* produkujících různé karbapenemázy (např. typu OXA-48, metalo- β -laktamázy, KPC). Můj výzkum prokázal, že pokud se do reakčního pufru přidá 50mM NH_4HCO_3 , tak senzitivita testu je pak 98 %, což je skvělý výsledek.

Metodu MALDI-TOF-MS bych určitě doporučila do všech mikrobiologických laboratoří, aby pomohla k detekci antibiotické rezistence a bakterií, které ji způsobují.

LITERATURA A PRAMENY

1. HRABÁK, Jaroslav. *Lecture IX. – Antibiotics* [prezentace PowerPoint].
2. JEDLIČKOVÁ, Anna. c2009. *Antimikrobiální terapie v každodenní praxi*. 3., rozš. vyd. Praha: Maxdorf, Jessenius. 662 s. ISBN 978-80-7345-208-7.
3. *Antibiotika v léčbě infekcí*, 2015. Olomouc: Solen, Meduca. 35 s. ISBN 978-80-7471-137-4.
4. JURÁNKOVÁ, Jana. 2011. *Klinická mikrobiologie v laboratorní praxi: bakalářský obor Zdravotní laborant*. Brno: Masarykova univerzita. 73 s. ISBN 978-80-210-5657-2.
5. HYNIE, Sixtus. 2003. *Speciální farmakologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Karolinum. 239 s. ISBN 80-246-0657-7.
6. GOERING, Richard V., Hazel M. DOCKRELL a Mark A. ZUCKERMAN. 2016. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton. 568 s. ISBN 978-80-7387-928-0.
7. *Klinicky významné bakterie*, 2012. Přeložil Jaroslav JULÁK. Praha: Triton. 123 s. ISBN 978-80-7387-588-6.
8. LEVY, Stuart B. 2007. *Antibiotický paradox: jak se nesprávným používáním antibiotik ruší jejich léčebná moc*. Praha: Academia. Galileo. 312 s. ISBN 978-80-200-1485-6.
9. VOTAVA, Miroslav. c2010. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun. 495 s. ISBN 978-80-86850-04-7.
10. VOTAVA, Miroslav. 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.

11. MAREK, Josef. 2010. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 4., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. 777 s. ISBN 978-80-247-2639-7.
12. Antibiotika. *WikiSkripta* [online]. 2008- [cit. 9.12.2016]. ISSN 18046517. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Antibiotika&oldid=361814>
13. LOCHMANN, Otto. 2008. *Nežádoucí účinky antiinfekčních léčiv*. V Praze: Triton. 243 s. ISBN 978-80-7387-073-7.
14. MELTER, Oto a Annika MALMGREN. 2014. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. Praha: Karolinum. 139 s. ISBN 978-80-246-2414-3.
15. KRAMÁŘ, Radim. 2007. *Lékařská mikrobiologie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta. 72 s. ISBN 978-80-7394-021-8.
16. NĚMEC, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ. 2015. *Základy obecné mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita. 255 s. ISBN 978-80-210-7923-6.
17. Historie antibiotik www.medica-langer.cz [online]. [cit. 7.3.2017]. Dostupné z: http://www.medica-langer.cz/aktualne/historie_antibiotik.pdf
18. MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. March 2012, volume 18, issue 3, 268-281 [cit. 8.3.2017]. ISSN 1198-743X. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14616323>
19. HRABÁK, Jaroslav. *Mechanizmy vzniku a šíření rezistence k β -laktamovým antibiotikům u enterobakterií a pseudomonád*. Plzeň, 2012. Habilitační práce. Univerzita Karlova v Praze. Lékařská fakulta v Plzni. Ústav mikrobiologie.
20. HRABÁK, Jaroslav et al. Detekce karbapenemáz u enterobakterií pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (MS), fenotypových inhibičních testů a molekulárně-

mikrobiologickými technikami. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie* [online]. 2012, 21(4), 148-156 [cit. 13.3.2017]. ISSN 1804-8668. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/21_2012/04_duben/148_detekce.pdf

21. HRABÁK, Jaroslav, Monika, DOLEJSKÁ a Costas C., PAPAGIANNITSIS. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry for Determination of Resistance to Antibiotics. In: *MALDI-TOF Mass Spectrometry in Microbiology*. Wymondham: Caister Academic Press, 2016, s. 93-108. ISBN 978-1-910190-41-8.
22. Clinical breakpoints *www.eucast.org* [online]. Poslední změna 13.3.2017 [cit. 15.3.2017]. Dostupné z: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.1_Breakpoint_Tables.pdf
23. HUONG, Thanh Truong et al. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* [online]. Červenec 2014, volume 1, issue 2, 64-66 [cit. 21.3.2017]. ISSN 2336-3940. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0214/journal2.pdf

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PBP	penicilin vázající protein
G+	grampozitivní
G-	gramnegativní
MRSA	meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSE	meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus epidermidis</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
MDRO	multirezistentní organismy
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
MBL	metalo- β -laktamázy
MALDI-TOF-MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight - Mass Spectrometry
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
MIC	minimální inhibiční koncentrace
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
AmpC	chromozomální cefalosporináza
Da	dalton
m/z	poměr hmotnosti iontu a jeho náboje
atd.	a tak dále
NH_4HCO_3	bikarbonát amonný
LF UK	Lékařská fakulta Univerzity Karlovy
FN	Fakultní nemocnice

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Přehled účinku antibiotik uvedených v této práci.

Tabulka č. 2: Klinicky významné transferabilní karbapenemázy.

Tabulka č. 3: EUCAST tabulka klinických break-pointů karbapenemů pro čeleď *Enterobacteriaceae* (validní od 10.3.2017).

Tabulka č. 4: Tabulka pro vyhodnocení MALDI-TOF-MS.

Tabulka č. 5: Soubor vyšetřených izolátů metodou MALDI-TOF-MS bez přidání NH_4HCO_3 a po přidání NH_4HCO_3 .

Tabulka č. 6: Celkový počet pozitivních karbapenemáz.

Tabulka č. 7: Vyhodnocení metod.

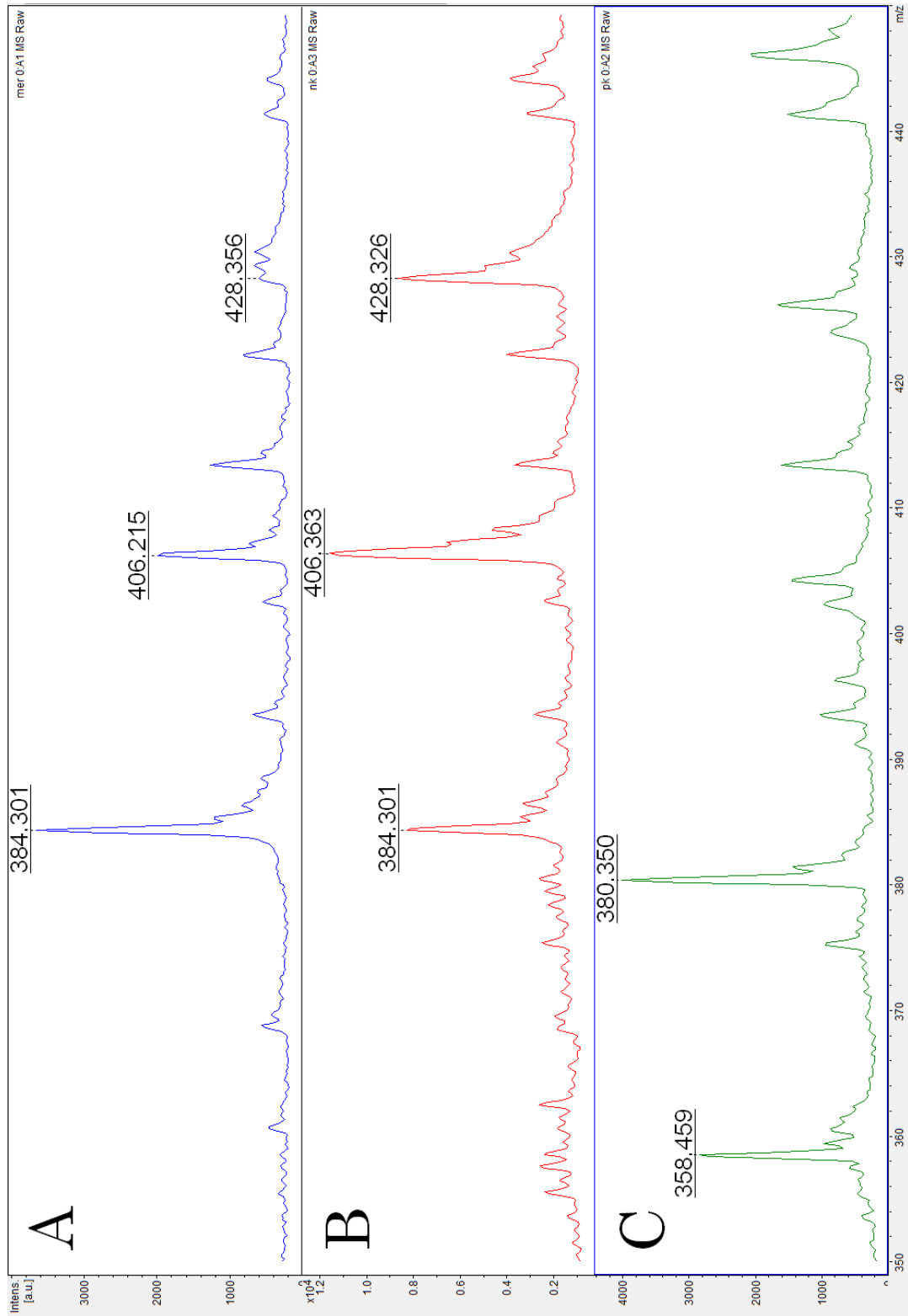
SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Dosažená spektra při detekci karbapenemáz pomocí MALDI-TOF-MS.

Příloha č. 2: Povolení sběru informací ve FN Plzeň.

PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Dosažená spektra při detekci karbapenemáz pomocí MALDI-TOF-MS.



Vysvětlivky: A = roztok meropenemu, B = negativní kontrola, C = pozitivní kontrola

Příloha č. 2: Povolení sběru informací ve FN Plzeň.



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči

Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín
IČO 00669806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní

Adéla Holubová

Studentka oboru Zdravotní laborant

Fakulta zdravotnických studií, Katedra teoretických oborů

Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem informací o laboratorních metodách, používaných v *Ústavu mikrobiologie (MIKRO) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Rychlé testy pro detekci mechanismů antibiotické rezistence u gram negativních tyčků*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vrchní zdravotní laborantka MIKRO souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb.,** o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, pokud budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe a pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je **doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D., odborný pracovník v laboratorních metodách, MIKRO FN Plzeň.**

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová

manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP

zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň

tel.: 377 103 204, 377 402 207

e-mail: chabrovas@fnplzen.cz

20. 10. 2016