



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Výskyt *Enterobacteriaceae* produkujících širokospektré beta-laktamázy typu ESBL a AmpC u pacientů s komunitní infekcí močových cest

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Jessica Jírová

Vedoucí práce: MUDr. Věra Cihlová

České Budějovice 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Výskyt *Enterobacteriaceae* produkujících širokospektré beta-laktamázy typu ESBL a AmpC u pacientů s komunitní infekcí močových cest“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 4.5.2021

podpis

Poděkování

Poděkování patří vedoucí mé práce, MUDr. Věře Cihlové, za poskytnutí prostoru pro výkon mé praktické části, cenné rady a trpělivost. Děkuji i zaměstnancům mikrobiologické laboratoře za pomoc a ochotný přístup.

Výskyt *Enterobacteriaceae* produkujících širokospektré beta-laktamázy typu ESBL a AmpC u pacientů s komunitní infekcí močových cest

Abstrakt

Rezistence na antibiotika je celosvětovým problémem a každým rokem stoupá. Jelikož infekce močových cest jsou jednou z nejčastějších příčin k předepisování antibiotik, výskyt bakterií rezistentních k běžně užívaným antimikrobiálním látkám se zvyšuje. Zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, gramnegativní tyčky, patří k nejrozšířenějším patogenům způsobující uroinfekce. Jedná se o producenty beta-laktamáz, které rozkládají a inaktivují beta-laktamová antibiotika, jinak běžně používané terapeutikum k léčbě uroinfekcí.

Teoretická část bakalářské práce se zabývá charakteristikou komunitních močových infekcí, zejména jejich diagnostikou, terapií a prevencí vzniku. Jsou zde popsány obecné vlastnosti a laboratorní diagnostika čeledi *Enterobacteriaceae*. V závěrečné části je nastíněna náplň činnosti antibiotické politiky a středisek v České republice. Navazuje popis působení antimikrobiálních látek, konkrétně beta-laktamových antibiotik. Následuje rozdělení mechanismů rezistence k antibiotikům. Pozornost je zaměřena na rezistence k beta-laktamům, pomocí produkce enzymů beta-laktamáz (zejména typu ESBL a AmpC), které beta-laktamová antibiotika inaktivují. Teoretická část končí popisem laboratorní diagnostiky beta-laktamáz ESBL a Ampc.

Praktická část se zabývá zpracováním moče v mikrobiologické laboratoři a průkazem enterobakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy. Proces zpracování zahrnuje odběr moče, transport a kultivace vzorku na příslušné diagnostické půdě. Následuje mikroskopie preparátu a izolace čisté kolonie mikrobů z čeledi *Enterobacteriaceae*. Enterobakterii diagnostikujeme pomocí biochemických vlastností mikroba vyrostlého na speciální Švejcarově půdě a změnou barev reagensů v INDOL testu. K průkazu produkce beta-laktamáz, typu ESBL a AmpC slouží soubor testů. Diskovým difuzním testem prokážeme, zda je kmen citlivý či rezistentní k příslušné antimikrobiální látce. DDST test slouží k průkazu enterobakterií produkujících ESBL a AmpC beta-laktamázy. Chromogenní ESBL půda určí kmeny produkující širokospektrou beta-laktamázu.

Výzkum byl prováděn v mikrobiologické laboratoři Stafila za období 3 měsíců. Byla zde porovnána četnost jednotlivých zástupců enterobakterií způsobujících komunitní infekce močových cest, v závislosti na věku a typu odebrané moči. Další porovnání bylo z hlediska procentuálního zastoupení ESBL a AmpC pozitivitu u polyrezistentních *Enterobacteriaceae*, také v závislosti na věku a typu odebrané moči. *Escherichia coli* je nejzastoupenějším patogenem diagnostikovaným v moči u pacientů s uroinfekcí, a to až z 60,67%. Přehlíženi by neměli být ani *Proteus mirabilis* a *Klebsiella pneumoniae*. Průměrný věk pacientů se zánětem močových cest je 54 let. ESBL pozitivních vzorků bylo 9% z celkového počtu zpracovaných močí. AmpC pozitivních močí bylo o něco méně, konkrétně 4% z celkového počtu močí. Dle výsledků do nejohroženější skupiny pacientů patří senioři v pečovatelských zařízeních, se zavedeným permanentním katétreem či jednorázově vycévkování.

V závěrečné části bakalářské práce se poukazuje na možná řešení problému výskytu polyrezistentních kmenů u pacientů s komunitní infekcí močových cest.

Klíčová slova

Komunitní infekce močových cest; *Enterobacteriaceae*, širokospektré beta-laktamázy typu ESBL a AmpC

Occurrence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL and AmpC type) in patients with community acquired urinary tract infection

Abstract

Antibiotic resistance is a global problem and is increasing every year. As urinary tract infections are one of the most common causes for prescribing antibiotics, the incidence of bacteria resistant to commonly used antimicrobials is increasing. Representatives of *Enterobacteriaceae*, a gramnegative bacteria, are among the most common pathogens causing UTIs. They are producers of beta-lactamases, that break down and inactivate beta-lactam antibiotics, that are commonly used therapeutics to treat UTIs.

The theoretical part of the bachelor thesis deals with the characteristics of community-acquired urinary tract infections, especially their diagnosis, therapy and prevention. General properties and laboratory diagnostics of the *Enterobacteriaceae* family are described here. The final part outlines the content of antibiotic policy and centers in the Czech Republic. The description of the action of antimicrobial substances, specifically beta-lactam antibiotics, follows. The following is a division of the mechanisms of antibiotic resistance. Attention is focused on the description of beta-lactam resistance, the production of beta-lactamase enzymes (especially of the ESBL and AmpC types), which inactivate beta-lactam antibiotics. The theoretical part ends with a description of laboratory diagnostics of beta-lactamases (ESBL and Ampc types).

The practical part deals with urine sample processing in a microbiology laboratory and the detection of enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases. The process involves urine collection, transport and culture process of the sample on the appropriate diagnostic medium. This is followed by microscopy of the microbes and isolation of a pure colony of microbes from the family *Enterobacteriaceae*. Enterobacteria is diagnosed by using biochemical properties of a microbe grown on a special Švejcar medium and by changing colors by reagents in the INDOL test. A set of tests is used to demonstrate the production of beta-lactamases, ESBL and AmpC types. Disk diffusion test shows whether the strain is sensitive or resistant to the relevant antimicrobial agent. The DDST test is used to detect Enterobacteria producing ESBL and AmpC beta-

lactamases. Chromogenic ESBL medium identifies strains producing extended-spectrum beta-lactamase.

The research was performed in the Stafila microbiological laboratory for a period of 3 months. The frequency of individual representatives of enterobacteria causing community-acquired urinary tract infections was compared here, depending on the age and type of urine collected. Another comparison was in terms of the percentage of ESBL and AmpC positivity in polyresistant Enterobacteriaceae, also depending on the age and type of urine collected. *Escherichia coli* is the most common pathogen diagnosed in the urine of patients with urinary tract infections, with up to 60.67%. *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae* should not be overlooked either. The average age of patients with urinary tract inflammation is 54 years. ESBL positive samples were 9% of the total number of processed urine. AmpC positive urine was slightly less, 4% of the total urine count. According to the results, the most vulnerable group of patients are the elderly in care facilities, with an permanent catheter or one-time catheterisation.

The final part of the bachelor thesis points to possible solutions to the problem of poly-resistant bacteria in patients with community-acquired urinary tract infections.

Key words

Community-acquired urinary tract infections; Enterobacteriaceae, Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL and AmpC type)

Obsah

1.	Teoretická část	11
1.1	Infekce močových cest	11
1.1.1	Klasifikace infekcí	11
1.1.2	Komunitní infekce močových cest	12
1.1.3	Prevence vzniku infekce	13
1.1.4	Diagnostika infekcí	14
1.1.5	Bakterie způsobující infekce močových cest.....	14
1.1.6	Terapie infekcí	15
1.2	<i>Enterobacteriaceae</i>	16
1.2.1	Obecné vlastnosti	16
1.2.2	Laboratorní průkaz.....	17
1.3	Antibiotika.....	18
1.3.1	Antibiotická politika	18
1.3.2	Působení antibiotik	19
1.3.3	Mechanismy účinku antibiotik.....	20
1.3.4	Beta – laktamová antibiotika	20
1.4	Rezistence na antibiotika.....	23
1.4.1	Rozdělení rezistence	23
1.4.2	Rezistence k beta – laktamovým antibiotikům	23
1.5	Beta – laktamázy	24
1.5.1	ESBL.....	25
1.5.2	AmpC.....	25
1.6	Laboratorní diagnostika beta – laktamáz typu ESBL a AmpC	26
1.6.1	Fenotypové metody detekce	26
1.6.2	Genotypové metody detekce.....	29
2.	Cíl práce a hypotéza.....	30
3.	Metodika	31
3.1	Zpracování moče	31
3.1.1	Odběr a transport moče do laboratoře.....	31
3.1.2	Příjem moče v laboratoři.....	31
3.1.3	Kultivace	32
3.1.4	Mikroskopie	33
3.1.5	Izolace bakterií.....	34
3.2	Průkaz beta – laktamáz typu ESBL a AmpC	35
3.2.1	Diskový difuzní test	35

3.2.2	DDST	37
3.2.3	ESBL půda	38
4.	Výsledky	39
4.1	Zastoupení jednotlivých <i>Enterobacteriaceae</i> způsobujících IMC v závislosti na věku a typu odebrané moči	39
4.2	Procentuální zastoupení ESBL a AmpC pozitivních <i>Enterobacteriaceae</i> v závislosti na typu odebrané moči a na věku.....	41
5.	Diskuze	45
6.	Závěr	47
7.	Literatura.....	49
8.	Seznam zkratk	53
9.	Přílohy.....	54

Úvod

Infekce močových cest patří mezi nejčastější infekce dospělých, u kterých je předepisována antibiotická léčba. Většina uroinfekcí je zapříčiněna zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, gramnegativními bakteriemi. Zástupci této čeledi patří do rizikové skupiny bakterií způsobujících rezistenci k antimikrobiálním látkám. Svoji produkcí enzymů, širokospektrých beta – laktamáz (speciálně typu ESBL a AmpC), štěpí beta-laktamový kruh a inaktivují antibiotikum. Bakterie tak primárně citlivé se stávají rezistentní k běžně užívaným terapeutikům používaných v léčbě uroinfekcí.

Do komunity ohrožené na záněty močových cest patří jednoznačně gerontologičtí pacienti. Vzhledem k fyziologickému stárnutí se mění stavba močového ústrojí a zvyšuje se tak riziko infekce. Díky zdravotním problémům je vzorek moči často u seniorů odebírán zavedením permanetního katétru, nebo jednorázovým vycévkováním. Nesprávné hygienické návyky při zavádění a výměně katétru zvyšují šanci nástupu infekce močových cest. Časté předepisování antibiotické léčby tak zvyšuje i výskyt rezistentních patogenů.

Bakteriální rezistence se díky každoročnímu nárůstu polyrezistentních bakterií stává stále aktuálnější. Nadužívání a preskripce špatného antimikrobiálního léčiva souvisí s vyšší smrtností a nemocností v populaci. Proto je důležitá surveillance o vývoji rezistence.

1. Teoretická část

1.1 Infekce močových cest

Močové infekce (dále jako IMC nebo uroinfekce) se řadí spolu s respiračními infekcemi mezi nejčastější zánětlivá onemocnění, vyskytující se u obou pohlaví v průběhu celého života. Jako uroinfekci můžeme definovat patologický stav, při kterém je v moči nebo ve tkáních močového ústrojí prokázána přítomnost patogenních mikroorganismů (Kolombo et al., 2007).

1.1.1 Klasifikace infekcí

IMC můžeme rozdělit dle lokalizace na postižení *horních* či *dolních* močových cest. Infekce dolních močových cest postihují uretru a močový měchýř, mezi nejčastější infekce patří uretritida, prostatitida, cystitida (Beneš, 2009). Záněty se často kombinují. Pro ženy procházející si záněty močového měchýře, vaginózami či STD je typickým příznakem dysurie. Mezi příznaky infekcí dolních močových cest se řadí teplota, zvracení, celkové nepohodlí, velmi častým příznakem je sexuální dysfunkce. Do zánětů horních močových cest postihující ureter, ledvinový parenchym, ledvinové pánvičky řadíme například pyelonefritidu, absec ledvin či papilární nekrózu. Klinickými příznaky jsou zimnice provázené třesavkou, bolest odlišné intenzity (Matoušková, 2005).

Uroinfekce zároveň rozdělujeme podle vyvolávajících příčin na *bakteriální* (nejčastější příčiny IMC), *virové*, *parazitální*, *kvasinkové* infekce. Histopatologické změny nám infekce rozdělují na *nespecifické* (jedná se o nejfrekventovanější typ zánětu, který je vyvolán gramnegativními a grampozitivními uropatogeny) a *specifické* (mykobakterie, aktinomycety a treponemy zodpovědné za specifické záněty s typickými histopatologickými změnami).

Podle patogeneze je důležité si definovat IMC *nekomplikované* (jinak zdraví pacienti, kteří mají funkčně a strukturálně normální močové ústrojí) a *komplikované* (oslabení jedinci s funkčními nebo strukturálními změnami močopohlavního ústrojí) (Kolombo et al., 2007).

Problematickou skupinou, která se nezařazuje ani do jedné z kategorií je *asymptomatická bakteriurie* vyznačující se přítomností významného množství uropatogenu v moči (10^5 a více bakterie v 1 ml moče) s absencí klinických příznaků. ABU je charakteristická u pacientů vyššího věku, u pacientů se zavedenými močovými katétry (Bartoničková et al., 2006). Pro správnou léčbu močových infekcí je významné schématické rozdělení na infekce způsobené *nozokomiálními a komunitními* kmeny bakterií (Bartoničková, 2004).

1.1.2 Komunitní infekce močových cest

Komunitní močové infekce způsobují vyskytující se bakteriální původci ze střeva, slizničních a kožních povrchů. Výskyt a četnost mikroorganismů závisí na věku a pohlaví. IMC se šíří 3 způsoby: hematogenně, lymfogenně nebo ascendentě. Nejčastější je ascendentní forma šíření infekce z oblasti zevního genitálu močovou trubicí (Bartoničková, 2005).

V novorozeneckém věku se vyskytují IMC až 5x více u chlapců. Dále se IMC vyskytují u mužů pravidelně až od 60 let a výše. U dívek se výskyt uroinfekcí zvyšuje až v období dospívání. Během období reprodukce uroinfecce výrazně převyšují právě u žen (Kolombo, 2007). Alespoň jedna ze tří žen v reprodukčním věku do 24 let si projde symptomatickou IMC, na kterou je nutno zareagovat podáním antibiotické léčby (Bartoničková, 2005).

Výraznými zástupci komunitních IMC jsou geriatrictí pacienti, pro které uroinfekce patří spíše do skupiny komplikovaných infekcí, vzhledem k fyziologickým změnám v těle. U mužů to má souvislost se subvezikální obstrukcí dolních močových cest a následného zavedení permanentního močového katétru. Ženám po menopauze klesá hladina estrogenů, tudíž dojde ke ztenčení sliznic v močové trubici a pochvě. Statistiky uvádí, že po jednorázové katetrizaci se infekce objevuje u 1-7 % pacientů, při zavedení permanentního katétru číslo stoupá až na 25% (Romžová, 2013). Asi 5% hospitalizovaných geriatrických pacientů má zaveden permanentní močový katétr, všichni se potýkají 3-4 den po zavedení katéru s bakteriurií (Nicolle, 1997).

1.1.3 Prevence vzniku infekce

Spolu se správnou diagnostikou a léčebným postupem je velice důležitá prevence opakovaných IMC. To zahrnuje především poučení o správné hygieně.

U mladých dívek a žen v reprodukčním věku je dobré učinit preventivní kroky proti recidivujícím cystitídám. Zahrnujeme tam například: vymočení se po koitu s nejkratší možnou časovou prodlevou, doporučuje se preferování hormonální antikoncepce oproti bariérové, často měnit menstruační pomůcky a dát si pozor na jejich vhodný výběr (bez parfermace). Mezi rizikové postupy se naopak řadí až přehnaná hygiena, způsobená nadužíváním desinfekčních mýdel, intimních mycích prostředků se špatným pH nebo s parfemací. U žen v období menopauzy se doporučuje v důsledku ubývajících estrogenu k jeho náhradě ve formě lokálních krémů obsahujících estriol (Bartoníčková et al., 2006).

U hospitalizovaných geriatrických pacientů se zavedeným permanentním katétrem je prevence velice důležitá. A to konkrétně, aby katetrový systém byl uzavřený a doba katetrizace pacienta by měla být dle okolností co možná nejkratší. Výměna permanentního katétru by měla být pravidelná a měla by se uskutečnit v intervalu 4-6 týdnů. Samotná má být prováděna za aseptických podmínek bránící kontaminaci a podporována antibiotickou profylaxí. Při podezření na IMC je vhodné zavedený katétr vyměnit, odeslat na mikrobiologické vyšetření sedimentu a kultivace. Poté je doporučeno zahájit terapii pomocí antibiotik, důležité je dávat si pozor na jejich nadměrné užívání (Romžová, 2013).

Současné informace nedoporučují při asymptomatické bakteriurii nasadit léčbu, ani při dlouhodobé katetrizaci. Léčba, která je příliš krátká, nebo naopak příliš dlouhá, může zapříčinit výskyt rezistentních kmenů bakterií (Naber et al., 2005).

1.1.4 Diagnostika infekcí

Stanovení diagnózy močových cest závisí na klinickém stavu vyšetřovaného pacienta a vyšetření moče. Chemické vyšetření moče je pouze orientační. Mikrobiologické a mikroskopické vyšetření patří mezi nezbytné, bývá vodítkem k diagnostice IMC a nasazení správné terapie. Nejprůkaznějším vyšetřením je kultivace moči a následná identifikace uropatogenu (Matoušková, 2005).

Kvantitativní kultivace moči zahrnuje izolaci a identifikaci organismu, stanovení počtu bakterií – CFU (jednotky tvořící kolonie na jednotku objemu). Kvantifikace bakterií umožňuje interpretaci významnosti bakterií přítomných ve vzorku moči (Olin et al., 2015).

U mladších lidí se IMC projeví častou mikcí. Močení může být doprovázeno dysurií, v některých případech i inkontinencí o různé síle. Pro pacienty je indikátorem zápach moči, či přítomnost krve. U starších pacientů je možná absence výše uvedených příznaků, velmi častá je pro ně inkontinence, je možné pozorovat i změny v chování (zmatenost, rozrušení) (Romžová, 2013).

1.1.5 Bakterie způsobující infekce močových cest

Bakteriálními původci, kteří vyvolávají většinu IMC pochází zejména z čeledi *Enterobacteriaceae*. Nejčastějším uropatogenem komunitních infekcí močových cest je prokazatelně z 75-95% *Escherichia coli* (Matoušková, 2005). Mezi další významné zástupce čeledi *Enterobacteriaceae* způsobující IMC patří *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter sp.*, *Providencia sp.*, *Morganella sp.* a *Serratia sp.* (McLellan, 2016).

Jako další bakterie způsobující IMC můžeme uvést: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis* (Kawaciuk, 2009).

1.1.6 Terapie infekcí

Antimikrobiální léky jsou základním kamenem léčby IMC. Ve většině případů by zvolené ATB mělo být založeno na testování citlivosti uropatogenu. Nadužívání a zneužívání antimikrobiálních léčiv může mít za následek vznik rezistentních organismů, což je situace, která má negativní důsledky pro úspěšnou léčbu infekcí u pacientů (Olin et al., 2015).

Smyslem ATB léčby je eliminovat patogen z tkání urogenitálního traktu a moče. Léčba se zahajuje většinou empiricky – na předpokladu uropatogenu, rezistence na antibiotikum, alergie daného pacienta. U recidivujících zánětů se vyčkává s nasazením terapie až po zhodnocení a přímé identifikaci bakterie (Matoušková, 2005). Empirická léčba se používá z důvodu rychlosti a efektivity zvládnutí IMC. Roli zde hraje i ekonomický aspekt. (Bartoníčková, 2005).

K léčbě komunitních infekcí močových cest se volí ve většině případů relativně stejná skupina beta-laktamových ATB, peniciliny a cefalosporiny, cotrimoxasol, fluorochinolony, aminoglykosidy (Bartoníčková, 2005). Mezi běžně používané aminoglykosidy patří gentamicin a amikacin. Při empirické úvodní terapii se v některých případech používají v kombinaci s beta-laktamy, kvůli rozšíření spektra účinku. Jako další důvod kombinace těchto antibiotik je jejich synergický účinek při léčbě těžkých infekcí, každé ATB působí na jiný metabolický proces v buňce. Velice zastoupené perorální antibakteriální chemoterapeutikum, používané k terapii infekcí močových cest, je nitrofurantoin. Mechanismus účinku spočívá v proniknutí do bakteriální buňky a poškození jejích struktur toxickými metabolity antibiotika. Zatím nízká rezistence močových patogenů k tomuto ATB se vysvětluje právě jeho působením na více míst v bakteriální buňce. Je nutné brát zřetel na to, že nitrofurantoin neproniká do tkání, jeho účinek je tak omezen jen na moč a nelze ho využít k terapii pyelonefritidy, prostatitidy a urosepsy. Fosfomycin je schválen jako terapeutikum pro nekomplikované infekce močových cest, toto ATB si zatím zachovává účinnost na bakterie produkující beta-laktamázy typu ESBL, AmpC a karbapenamázy. Fosfomycin inhibuje časnou fázi syntézy buněčné stěny. Proniká do tkání, a proto ho lze použít i k léčbě prostatitid (Štefan, 2017).

V současné situaci se výrazně zvyšuje výskyt rezistentních bakterií jako původců uroinfekcí. K nejdůležitějším patogenům patří již zmiňované gramnegativní bakterie, zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, produkující různé typy širokospektrých beta-laktamáz. Výskytu multirezistentních kmenů a vzniku rezistence můžeme preventivně při léčbě předcházet tak, že se antibiotika nebudou nadměrně užívat. U zbytečném zaléčování asymptomatických bakteriurií jsou pacienti ohroženi selekcí rezistentních patogenů, což pak v případě skutečné IMC v budoucnosti může komplikovat léčbu (Štefan, 2017).

1.2 *Enterobacteriaceae*

Z pohledu klinické mikrobiologie patří mezi nejdůležitější čeledi a bakterie vůbec. Přirozeným prostředím výskytu většiny enterobakterií je střevo savců. Působí tam buď jako komenzálové, saprofyty, ale také jako patogeni – například může jít o druh s vyšší patogenitou, nebo virulencí. Schopnost jejich patogenity se může uplatňovat i mimo střevo. IMC jsou nejčastější infekce způsobené právě enterobakteriemi. Mezi další možné infekce řadíme: infekce dýchacích cest či pohybového aparátu, patří mezi méně běžné. U novorozenců jsou časté sepse, mezi závažnější klinické stavy patří meningitidy (Votava et al., 2003).

1.2.1 *Obecné vlastnosti*

Bakterie, které tvoří tuto čeleď jsou gramnegativní tyčky dlouhé v rozmezí mezi 1 až 6 μm a tlusté od 0,4 do 1 μm . Jsou si velice podobné metabolismem i geneticky. Vyznačují se svojí schopností pohybu což zajišťuje bičík (až na nějaké výjimky), nepohyblivé jsou shigely, klebsiely, *Yersinia pestis*. Součástí vnější stěny membrány je lipopolysacharid, který má až 150 chemicky a antigenně rozdílných druhů. Mají 3 hlavní typy antigenů: H-bičíkové, O – tělové, K – pouzderné (Schindler, 2010). Pro diferenciaci bakterií se používají jejich biochemické vlastnosti, pro virulenci je to jejich antigenní složení. Pro výskyt velkého počtu druhů, se v praxi rozlišují jen několik významných rodů, nejčastěji izolujících se v laboratořích. Uvádějí se tedy zejména rody: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Morganella*, *Providencia*, *Salmonella*, *Shigella*. Mezi další klinicky významné rody patří: *Yersinia*, *Hafnia*, *Plesiomonas* (Schindler, 2010). V současnosti rozeznáváme v čeledi *Enterobacteriaceae* již 53 rodů a více jak 170 druhů bylo pojmenováno (Santos et al., 2020).

1.2.2 Laboratorní průkaz

Enterobakterie jsou dobře laboratorně průkazné. Zásadní význam má kultivace a biochemická identifikace. Rostou dobře při 37°C, jsou kultivačně nenáročné (Kramář, 2007).

K přímém průkazu enterobakterií se ke kultivaci používají selektivně diagnostické půdy. Mezi nejpoužívanější patří: *Endova půda*, *MacConkeyho agar*, *XLD*, *DC*, *WB*, *MAL*. Ty dokážou na základě jejich biochemických vlastností rozlišit jednotlivé mikroby. V posledních letech je nejvíce užíván *chromogenní agar*, protože odlišuje jednotlivé bakterie na základě specifické barvy kolonií. Nesmí se zapomenout zmínit ani tekuté selektivně pomnožovací půdy, selenitový bujon. Biochemické testy se využívají kvůli vzájemnému odlišení bakterií. Pro nejzákladnější biochemické testování se využívají kombinované diagnostické půdy – biochemický klín, agar podle Hajny. Vnitrodruhová diagnostika se testuje antigenní analýzou, detekují se tak kmeny s vyšší virulencí (Votava et al., 2010).

V posledních letech je k identifikaci bakterií hojně využívaná metoda MALDI-TOF-hmotnostní spektrometrie. Je to přesná, rychlá a nákladově efektivní metoda. Poskytuje jedinečný hmotnostní spektrální otisk mikroorganismů. Základní vlastností hmotnostní spektrometrie je detekovat poměr hmotnosti k náboji sledovaného analytu, který poskytuje spektra během několika minut (Carbonnelle et al., 2011).

Pokud je příslušná bakterie považována za patogena, součástí diagnostiky bývá zjištění citlivosti na antibiotika. Rezistentní kmeny jsou testovány na přítomnost širokospektrých beta-laktamáz (Votava et al., 2010).

1.3 Antibiotika

Antimikrobiální látky se využívají k terapii a profylaxi infekčního onemocnění. Většina z těchto látek je mikrobiálního původu, označující se jako antibiotika. Chemicky modifikované a synteticky vyráběné antimikrobiální látky se nazývají chemoterapeutika. Jelikož se jako antibiotika klasifikuje většina látek s antibakteriálním účinkem, tento termín se v praxi používá pro všechny látky a nerozlišuje se jejich původ.

Aby se antimikrobiální látky daly použít jak terapeutika, musí být selektivně toxické pro mikroba, ale nesmí poškozovat organismus. Toto se definuje chemoterapeutickým indexem, což je poměr mezi dávkou toxickou pro hostitelský organismus a dávkou účinnou na mikroba (Votava et al., 2005).

1.3.1 Antibiotická politika

Vzhledem k vzrůstající rezistenci na vybraná antimikrobiální léčiva a jejich nevhodné užívání, se zavedl souhrn opatření pro účinné a bezpečné užívání antibiotik. Cílem je omezit vznik a šíření rezistentních kmenů, zachovat co nejdelší účinnost ATB. Hlavní náplní antibiotické politiky je rozdělení antimikrobiálních látek na vázaná a volná. Volná antibiotika předepisují lékaři bez omezení (většina perorálních forem antibiotik). Vázaná ATB jsou předepsány po předchozí konzultaci s lékařem antibiotického střediska (většina injekčních forem antimikrobiálních látek) (Votava et al., 2005).

Antibiotická střediska jsou specializované mikrobiologické laboratoře. Ovlivňují a dohlíží na dodržování zásad antibiotické profylaxe a usměrňuje uvážené používání ATB v ambulantní, primární i lůžkové péči. Sledují a analyzují údaje o epidemiologii rezistence. Poskytují odborné konzultace a hodnotí spotřebu těchto terapeutik. Vytváří a poté i aktualizují lokální postupy na užívání antibiotik, která vychází z národních odborných doporučení garantované ČLS JEP (Šturma, 2010).

1.3.2 Působení antibiotik

Subinhibiční účinek nastává při podání velmi nízké koncentrace ATB. Díky tomu nastávají v bakterii morfologické změny. Dochází tak k trvalým poruchám adheze na epiteální povrch, prodloužení generační doby a dysfunkci toxinů a enzymů. Tento typ účinku je reverzibilní a podílí se na vzniku rezistence (Jedličková, 2004).

Bakteriostatický (inhibiční) účinek přichází s podáním terapeuticky účinné koncentrace ATB. Zabrání se tak množení, růstu mikroba (Jedličková, 2004). Klinický efekt antimikrobiálních látek trvá 3-4 dny. Vysazením ATB se mikrob začíná opět množit, účinek působení je tedy reverzibilní. Terapeutika s inhibičním účinkem jsou například: tetracykliny, makrolidy, sulfonamidy, linkosamidy, nitrofurany, trimethoprim a chloramfenikol (Votava et al., 2005).

Baktericidní látky zastavují množení a dochází tak až k lýze mikrobiální buňky. Docílí se tak podáním dostatečně vysoké koncentrace ATB. Působení je ireverzibilní (Jedličková, 2004). Jejich působení je rychlé a klinický účinek se dostavuje již do 48 hodin. Podávání látek s baktericidním účinkem se dává přednost u závažných stavů. Mezi tyto ATB řadíme například: beta-laktamy, aminoglykosidy, glykopeptidy, polypeptidy, ansamyciny. Patří tam i některá kombinovaná chemoterapeutika a antituberkulotika (Votava et al., 2005).

Účinnost ATB na příslušného mikroba můžeme laboratorně stanovit pomocí 2 základních laboratorních hodnot.

Minimální inhibiční koncentrace (*MIC*) se definuje jako nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která zabráni množení a růstu daného mikroba -90 % testovaných kmenů určitého druhu (Jedličková 2004, Votava et al. 2005).

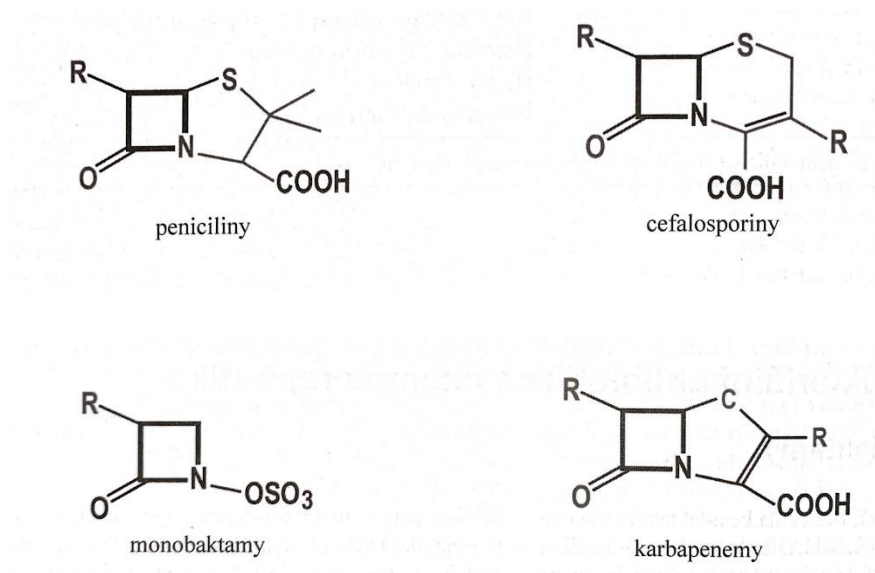
Minimální baktericidní koncentrace (*MBC*) je nejnižší koncentrace ATB, která během 24 hodin usmrtí až 99,9 % testovaných kmenů. Při volbě antibiotika s baktericidním účinkem se musí brát v úvahu farmakokinetické a farmakodynamické vztahy. Podle vztahů můžeme baktericidní antibiotika rozdělit na: ATB s účinky závislými na koncentraci dávky (aminoglykosidy, metronidazol, fluorochinony, azithromycin a clarithromycin), ATB s účinky závislými na čase (beta-laktamy, erytromycin) (Votava et al., 2005).

1.3.3 Mechanismy účinku antibiotik

Antibiotika se liší jak velikostí molekuly, tak svojí skladbou. Proto je jejich mechanismus účinku různý. Závisí na tom, jaká syntéza makromolekul je v buňce zasažena. Může být postížena syntéza buněčné stěny, nukleových kyselin a bílkovin, funkce buněčné membrány. Antimetabolity patří mezi inhibitory syntézy kyseliny listové (Votava et al., 2005).

1.3.4 Beta – laktamová antibiotika

V roce 1928 Alexander Fleming pozoroval baktericidní účinek plísně *Penicillium notatum*, což vedlo k identifikaci prvního beta-laktamového antibiotika, penicilinu. Od té doby byla objevena nebo syntetizována celá řada beta-laktamových antibiotik s různými antimikrobiálními profily, jako jsou deriváty penicilinu, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy. Všechna beta-laktamová antibiotika sdílejí společné jádro obsahující beta-laktamový kruh (Zeng et al., 2013). Příklad chemických struktur beta-laktamových antibiotik je uveden na obrázku č.1. Rozdělení jednotlivých ATB do tříd je uvedeno v tabulce č.1.



Obrázek č.1: Beta-laktamová antibiotika, chemická struktura (zdroj: Votava et al., 2010)

Tabulka č.1: Rozdělení beta-laktamových antibiotik do jednotlivých tříd

Rozdělení beta-laktamů	
Peniciliny	
<i>acidolabilní</i>	benzylpenicilin (penicilin G)
<i>acidostabilní</i>	fenoxymethylpenicilin (penicilin V)
<i>odolné vůči stafylokokové penicilinase</i>	Oxacilin
<i>aminopeniciliny</i>	ampicilin, amoxicilin, co-ampicilin, co-amoxicilin
<i>ureidopeniciliny</i>	azlocilin, piperacilin, co-piperacilin
<i>karboxypeniciliny</i>	co-ticarcilin
Cefalosporiny	
<i>I. generace</i>	inj.: cefalotin, cefazolin p.o.: cefalexin, cefadroxil, cefaclor
<i>II. generace</i>	inj.: cefuroxim p.o.: cefuroxim axetil, cefprozil
<i>III. generace</i>	inj.: cefotaxim, ceftriaxon, ceftazidim, cefoperazon, co-cefoperazon p.o.: cefixim
<i>IV. generace</i>	inj.: cefepim p.o.: -
monobaktamy	Aztreonam
karbapenemy	imipenem, cilastatin, meropenem

Zdroj: Votava et al., 2010

1.3.4.1 Mechanismy účinku beta – laktamů

Pro beta-laktamová ATB je charakteristická inhibice syntézy bakteriální stěny, do té zasahují velmi účinně beta-laktamázy. Enzymy, které vyrábějí v buněčné stěně peptidoglykan, na sebe vážou beta-laktamy a ty jejich funkce zruší. Tento typ enzymů se označuje zkratkou PBP (proteiny vázající penicilin). U bakterií s poškozenou buněčnou stěnou dochází k jejímu rozpadu. Účinek je baktericidní (Schindler, 2010).

1.3.4.2 Klinické využití beta – laktamů

Beta-laktamy patří mezi nejužívanější třídy antibiotik k léčbě bakteriální infekce, zejména kvůli jejich spektru aktivity, způsobu terapeutického působení a vynikajícím bezpečnostním kvalitám (Lomovskaya et al., 2017). Toxicita těchto ATB je nízká. Mohou vyvolat vedlejší reakce lehčího typu, jako je alergické reakce projevená kopřivkou. Mezi těžší vedlejší reakce patří anafylaktický šok, který v některých případech nastává po podání penicilinu. Jejich spektrum účinku je velice odlišné. Obecně můžeme říct, že

působí na grampozitivní a gramnegativní bakterie. Naopak nemohou ovlivnit mykoplazmata, mykobakterie a intracelulární bakterie (Votava et al., 2010).

Je důležité si uvést farmakokinetický aspekt beta-laktamových antibiotik: závislost účinku na čase. Pro jejich rychlé vylučování ledvinami, je nutné časté podání (každých 6-8 hodin). Optimální účinnost antimikrobiální látky je dosažena, jestliže koncentrace volného léčiva zůstává nad MIC po co nejdelší dobu užívání antibiotik. Prodloužená (3-4 hodiny) nebo kontinuální infuze IV. třídy beta-laktamů má vyšší pravděpodobnost dosažení farmakodynamických cílů ve srovnání se standardními 30 minutovými přerušovanými infuzemi. Jak výskyt rezistence stoupá, zlepšení farmakodynamiky může umožnit klinický úspěch i u pacientů infikovaných rezistentními mikroby (Bolus et al., 2015).

Pro léčbu IMC se historicky používaly aminopeniciliny, konkrétně ampicilin a amoxicilin. Produkce beta-laktamáz gramnegativními bakteriemi, zapříčinila vývoj a užití antibiotik odolných vůči těmto enzymům. Používají se kombinované přípravky typu amoxicilin-klavulanátu, několik generací cefalosporinů a karbapenemy. Narůstající rezistence nutí více selektovat antibiotika. Proto se více objevují bakterie, které štěpí běžné beta-laktamy, cefalosporiny vyšších generací a karbapenemy. Značný epidemiologický význam má genové přenášení beta-laktamáz i mezi nepříbuznými druhy bakterií (Štefan, 2017).

1.3.4.3 Inhibitory beta-laktamáz

Mezi inhibitory beta-laktamáz patří kyselina klavulanová, tazobaktam a sulbaktam. Kombinace ATB s inhibitory beta-laktamáz se využívá nejčastěji u aminopenicilinů, dalších penicilinů a u cefalosporinů (Votava et al., 2010). Potencované peniciliny vznikají kombinací penicilinů s inhibitory beta-laktamáz. Tato kombinace pomohla odstranit rezistenci bakterií na peniciliny, která vzniká na základě působení beta-laktamáz. Tyto enzymy inaktivují ATB rozštěpením beta-laktamového kruhu dříve, než se penicilin má možnost dostat k místu jeho působení. Inhibitor se irevizibilně váže na beta-laktamázy, které mají vyšší afinitu než daný penicilin a tím enzym inaktivuje. Svou činností přitom neovlivňuje účinnost beta-laktamů. V klinické praxi se používá kombinace amoxicilin s kyselinou klavulanovou, ampicilin se sulbaktamem (Vojtová et al., 2010).

1.4 Rezistence na antibiotika

Odolnost bakterií vůči antimikrobiálním látkám může být přirozená (primární), nebo získaná (Julák et al., 2010).

1.4.1 Rozdělení rezistence

Některé druhy bakterií jsou *přirozeně (primárně)* rezistentní vůči ATB. Příčinou může být snížená citlivost cílové struktury (ribosomy, buněčná stěna) k vybranému antibiotiku. Příkladem jsou enterobakterie, které jsou primárně rezistentní k penicilinu. Cílová struktura může úplně chybět, například mykoplasmata postrádají buněčnou stěnu, proto jsou primárně rezistentní k penicilínům, které působí na její syntézu (Julák et al., 2010).

Větší problém způsobuje *získaná* rezistence. Bakterie jsou na vybrané ATB primárně citlivé, ale mohou si ji vybudovat. Klasickým příkladem je penicilin, který byl objeven pro svůj účinek na *Staphylococcus aureus*, v dnešní době je více než 90 % tohoto kmenu na penicilin rezistentní. Obavy jsou z nadměrného užívání antibiotik, protože výzkum nestíhá připravovat nové typy ATB (Votava et al., 2005).

1.4.2 Rezistence k beta – laktamovým antibiotikům

Rezistence vůči beta-laktamům se nadále zvyšuje, zejména u gramnegativních organismů. A to z důvodu rozšířené terapeutické závislosti na těchto účinných a bezpečných antibiotikách. Mutace PBP je hlavním mechanismem rezistence beta-laktamů u grampozitivních bakterií.

Nejběžnější a nejškodlivější mechanismy rezistence mezi gramnegativními patogeny jsou beta-laktamázy, které štěpí beta-laktamový kruh. Dalším možným mechanismem je snížení propustnosti zevní membrány, eflux antibiotika z buňky. Běžná je kombinace těchto mechanismů. Snad nejvíce povzbudivou vyhlídkou v boji proti rezistenci je vývoj nových tříd inhibitorů beta-laktamáz, které přinejmenším v současné době poskytnou ochranu těmto antibiotikám v klinické praxi (Bush et al., 2016)

Byla popsána vyšší úmrtnost pacientů s infekcemi krevního řečiště způsobenými *Enterobacteriaceae*, produkujícími širokospektré beta-laktamázy, která v případě neadekvátní antibiotické léčby dosáhla 60 %. S účinnou léčbou úmrtnost klesla na 19 %. Problematika šíření multirezistentních bakterií byla nejdříve registrována ve zdravotnických zařízeních. Multirezistentní bakterie způsobují i komunitní infekce. V České republice v oblasti olomouckého regionu se pro příklad uvádí nárůst ciprofloxacin-rezistentních kmenů *E. coli*, původce IMC. V roce 2000 byla četnost 5 %, roku 2006 téměř 20 %. Vývoj rezistencí lze posoudit v databázi EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) (Kolář, 2019).

1.5 Beta – laktamázy

Beta-laktamázy se klasifikují podle 2 systémů. Bush-Jacoby klasifikace je založená na substrátovém a inhibičním profilu, rozděluje beta-laktamázy do 3 skupin (1-3) a podskupin (a-f). Amblerův systém klasifikuje enzymy podle homologie aminokyselinové sekvence do čtyř skupin A-D (Kolář, 2019). Přehled bakteriálních beta-laktamáz nám udává tabulka č.2.

Tabulka č.2: *Hlavní skupiny beta-laktamáz u gram-negativních bakterií*

<i>Bush-Jacoby</i>	<i>Ambler</i>	<i>Preferovaný substrát</i>	<i>Název</i>	<i>Inhibitor beta-laktamázy</i>
1	C	cefalosporiny	cefalosporinázy (AmpC)	kys. 3-aminofenylboritá
2b	A	peniciliny, cefalosporiny I.	penicilinázy	
2be	A	širokospektré cefalosporiny, monobaktamy	ESBL	kys. klavulanová, sulbaktam, tazobaktam, avibaktam
2d	D	kloxacilin	kloxacilinázy	
2df	D	karbapenemy	karbapenemázy	
2f	A	karbapenemy	karbapenemázy	kys. 3-aminofenylboritá
3	B	karbapenemy	karbapenemázy	EDTA, kyselina 2-merkaptopropionová

Zdroj: Kolář, 2019; Htoutou Sedláková, 2015

1.5.1 ESBL

Řada zástupců *Enterobacteriaceae* produkují beta-laktamázy širokého spektra, které se označují zkratkou ESBL. Mezi významné klinické zástupce patří *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Morganella morganii* (Štefan, 2017).

Dle funkční klasifikace spadají do skupiny 2be, část do 2d. Tento typ enzymu hydrolyzuje peniciliny, cefalosporiny I.-IV. generace, monobaktamy. Inhibitorem beta-laktamáz typu ESBL může být například kyselina klavulanová, která se využívá při mikrobiologické diagnostice k inhibici hydrolýzy antibiotika (Hrabák et al., 2009).

V terapii IMC se uplatňují karbapenemy, které jsou vůči působení ESBL odolné. Dále je možné použít aminoglykosidy, nitrofurantoin, fosfomycin, kotrimoxazol a fluorochinolony. Důležité je zmínit i nárůst rezistence bakterií produkující ESBL právě vůči těmto antibiotikům, na které mají být primárně citlivé. Z nově vyvinutých antibiotik se uplatňují i ceftolozan – tazobaktam, ceftazidim-avibaktam (Štefan, 2017).

Existuje riziko přenosu bakterií s ESBL fenotypem v nemocničním prostředí (mezi pacienty a personálem) a v komunitě. Před šířením multirezistentních kmenů se jako prevalence doporučuje nadměrně neužívat širokospektrá antibiotika, dostatečná hygiena rukou. Vhodná je i izolace jednotlivých pacientů v rámci epidemického výskytu ESBL pozitivních kmenů (Štefan, 2017).

1.5.2 AmpC

První beta-laktamáza, AmpC (původně pojmenovaná AmpA), byla identifikována v koloniích *E. coli* K-12 citlivých k beta-laktamům obsažených v kultivačním médiu (Zeng et al., 2013). Enterobakterie schopné produkovat AmpC (Ampicilin C) jsou *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Citrobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (Štefan, 2017).

Beta-laktamázy typu AmpC jsou enzymy, které spadají dle klasifikace do skupiny 1C. Spektrum účinku mají podobný ESBL. Hydrolyzují peniciliny, cefamyciny, monobaktamy a většinu cefalosporinů. Inhibitor typický pro ESBL (kyselina klavulanová) na ně neúčinkuje. Důležitými inhibitory pro AmpC jsou oxacilin (kloxacilin), kyselina boritá a její deriváty (kys. 3-aminofenylboritá) (Hrabák et al., 2008; Hrabák et al., 2009). K terapii se využívají karbapenemy, fluorochinolony, aminoglykosidy, fosfomycin a cefepim (který na rozdíl od ESBL neštěpí) (Štefan, 2017).

1.6 Laboratorní diagnostika beta – laktamáz typu ESBL a AmpC

V rutinním provozu mikrobiologických laboratoří se nejčastěji používají fenotypové metody, které jsou založené na substrátové specifitě a citlivosti k inhibitorům. Genotypové metody se tak často v běžné praxi nepoužívají, nejsou schopny popsat stupeň rezistence diagnostikovaného kmene (Hrabák et al., 2009).

Přítomnost ESBL může maskovat exprese AmpC ve vysokém stupni. Pro potvrzení kmene produkující ESBL se jako infikátor používá cefepim, který AmpC beta-laktamázy nehydrolyzují. Jako alternativu lze použít inhibitor beta-laktamáz typu AmpC – kloxacilin nebo deriváty kyseliny borité (Giske et al., 2017).

1.6.1 Fenotypové metody detekce

1.6.1.1 Screening kmenů produkujících beta-laktamázy

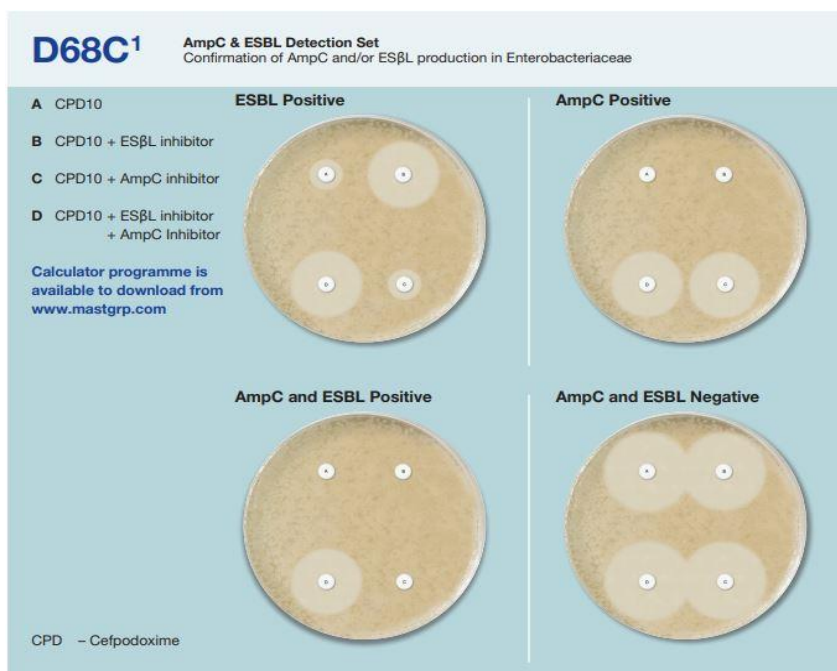
Používají se zde metody vyhledávání podle hodnot minimálních inhibičních koncentrací (MIC) beta-laktamových antibiotik, zástupcem je E-test. Nebo se používá metoda vyhledávání podle průměru inhibičních zón (IZ) okolo ATB disků, typickým zástupcem je: Disková difuzní metoda. Kmen, který je podezřelý z produkce širokospektré beta-laktamázy, má buď nižší hodnotu IZ (či vyšší MIC hodnotu), než je definovaná hraniční hodnota (Hrabák et al., 2008).

1.6.1.2 CLSI (Clinical Laboratory Standart Institute) konfirmační metoda

Využívá se zde srovnání průměru inhibičních zón vytvořených okolo ATB disků na MH agaru. Porovnávají se zde inhibiční zóny vytvořené okolo ATB disků obsahující určitý cefalosporin a inhibiční zóny okolo téhož cefalosporinu společně s inhibitorem – kyselinou klavulanovou. Rozdíl těchto průměrů inhibičních zón nesmí být větší než 5 mm (větší inhibiční zóna je u disku kombinovaného s inhibitorem), jinak je kmen hodnocen jako producent ESBL. Producenti AmpC vytváří deformované inhibiční zóny většího průměru kolem disku bez inhibitoru. Pro průkaz ESBL je nutné inhibovat produkci AmpC, konkrétně inhibitory jako je kloxacilin či kyselina boritá. Důležité je zmínit, že tato metoda platí jen pro určité druhy enterobakterií a to konkrétně – *Klebsiella spp.*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*. (Hrabák et al., 2008).

1.6.1.3 DDST (Double Disk Synergy Test)

Prvním testem speciálně určeným k detekci produkce ESBL u *Enterobacteriaceae* byl právě DDST test. Původně byl navržen k rozlišení mezi kmeny rezistentními na cefotaxim, tj. kmeny s nadprodukcí cefalosporinázy (AmpC) a kmeny produkujícími ESBL. Metoda se provádí se provádí na MH agaru s disky obsahující cefalosporiny a aztreonam a diskem amoxicilin – klavulanát. Disky jsou umístěny ve vzdálenosti cca 30 mm od středu. ESBL pozitivita je znázorněna vytvořením zvětšené inhibiční zóny ve tvaru „champagne-cork“, neboli „zátky od šampaňského“. K tomuto dochází při vytvoření zvětšené inhibiční zóny alespoň kolem jednoho z ATB (cefotaxim, aztreonam, cefepim, ceftazidim), které sousedí s ATB diskem amoxicilin-klavulanát. Producenti AmpC vytváří inhibiční zónu podobnou písmenu D u některého z ATB cefalosporinů (např. aztreonam) na straně, která sousedí s kombinovaným ATB diskem amoxicilin-klavulanát (Drieux et al., 2008). Doporučené rozložení disků k metodě DDST je uvedeno na obrázku č.2.



Obrázek č.2: Doporučené uspořádání disků při metodě DDST k detekci ESBL a AmpC kmenů (zdroj: MASTDISCS Combi – ESBL&AmpC only detection Discs Sets)

1.6.1.4 Gradientní test

Test se hodnotí, provádí a interpretuje podle návodů výrobce. Test je považován za pozitivní, když MIC (minimální inhibiční koncentrace) v cefalosporinu v kombinaci s inhibitorem beta-laktamázy kyselinou klavulanovou je 8x nižší než MIC cefalosporinu bez inhibitoru. Test je pozitivní i za přítomnosti fantomové zóny, deformované elipsy. Neurčitý výsledek testu je, pokud je MIC mimo rozmezí proužku a test tak nelze vyhodnotit. Ve všech ostatních případech se definuje test jako negativní. ESBL gradientní test je určen pouze pro potvrzení beta-laktamázy ESBL, nejsou spolehlivé pro potvrzení MIC (Giske et al., 2017).

1.6.1.5 Bujonová mikrodiluce

Test se provádí v MH bujónu, který obsahuje samostatný cefotaxim, ceftazidim a cefepim v ředění dvojnásobnou řadou při koncentraci 0,25-512 mg/l. To samé ředění se provede v kombinaci s kyselinou klavulanovou při dané koncentraci 4 mg/l. Pozitivní výsledek testu je, pokud MIC cefalosporinu je 8x nižší ve srovnání s MIC samotného cefalosporinu. Všechny další případy značí o negativním výsledku testu (Giske et al., 2017).

1.6.1.6 Biochemické (kolorimetrické) testy

ESBL NDP test používá cefotaxim jako indikátor a tazobaktam jako inhibitor. Test se provádí v destičkách (96 jamek) nebo ve zkumavkách. Pozitivitu určuje změna zbarvení z červené na žlutou. Byla popsána vysoká specifita a senzitivita tohoto testu (Giske et al., 2017).

β – LACTA kolorický test využívá chromogenního cefalosporinového substrátu (HMRZ-86) na izolátech a na pacienstkých vzorcích. Ve studii provedené v Belgii a Francii bylo prokázáno, že test vykazuje skvělou specifitu a senzitivitu u *E. coli* a *K. pneumoniae* (96 a 100%). Producenti indukovatelné beta-laktamázy AmpC prokazují nižší senzitivitu (67%). Vysoká hodnota negativní predikce pro *K. pneumoniae* a *E. coli* tento test činí účinným v predikci rezistence na cefalosporiny třetí generace (Giske et al., 2017).

1.6.2 Genotypové metody detekce

Mezi hlavní geny odpovědné za produkci ESBL patří geny TEM (bla_{TEM}), geny SHV (bla_{SHV}) a geny CTX-M (bla_{CTX-M}). V posledních letech rapidně narůstá produkce beta-laktamáz nesoucích gen CTX-M, které hydrolyzují cefotaxim (Moghaddam et al., 2014).

Molekulární detekce beta-laktamáz je obvykle založena na amplifikaci genu *bla*, pomocí PCR (Polymerázové řetězové reakce). Následuje sekvenování, které se opírá o použití specifických primerů, což umožňuje amplifikaci členů bakteriálního kmene. Protože beta-laktamázy jsou charakterizovány širokou genetickou rozmanitostí, může být detekce enzymů pomocí metody PCR časově náročná a v běžné mikrobiologické praxi se často nepoužívá. Mezi další molekulární testy schopné detekovat beta-laktamázy řadíme restriční analýzu (RFLP) a ligázovou řetězovou reakci (LCR) (Drieux et al., 2008). Výhodou molekulárních metod je dřívější detekce ohnisek a minimalizace šíření rezistentních bakterií mezi populací a v nemocničních zařízeních (Lee et al., 2015).

2. Cíl práce a hypotéza

Rezistence bakterií k antibiotikům je celosvětovým problémem. V posledních letech, vzhledem k jejich nadměrné spotřebě, rezistence bakterií k příslušným antibiotikům stále stoupá. Mezi nejvíce problematické bakteriální kmeny patří bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, gramnegativní tyčky, které produkují širokospektré beta-laktamázy (především typu ESBL a AmpC). Právě zástupci této čeledi jsou původci nejčastějších bakteriálních infekcí, infekcí močových cest.

Mezi mé cíle práce patří zjistit četnost výskytu polyrezistentních enterobakterií u komunitních močových infekcí a porovnat jejich výskyt v jednotlivých věkových kategoriích. Naučit se postupy detekce beta-laktamáz a seznámit se se zpracováním moči v laboratoři.

Hypotéza: Jaká je četnost výskytu polyrezistentních *Enterobacteriaceae* u komunitních infekcí močových cest?

3. Metodika

Sběr dat k mému výzkumu probíhal za období 1.1-31.3.2020 v mikrobiologické laboratoři Stafila k.s. České Budějovice. Výzkumná část obsahuje sledování a vykonávání rutinní laboratorní práce. Výkon byl zaměřen na zpracování moči, detekci beta-laktamáz typu ESBL a AmpC ve vzorcích moče, určení citlivosti antibiotik k bakteriím.

3.1 Zpracování moče

3.1.1 Odběr a transport moče do laboratoře

Moč se odebírá různými způsoby. Můžeme rozlišit moč cévkovanou, moč odebranou z permanentního katétru či moč získanou suprapubickou punkcí. Mezi běžně zasílaný materiál patří spontánní moč ze středního proudu (Benáková, 2006).

Před samotným odběrem spontánního proudu moči je nutné poučit pacienta o důkladném omytí genitálu a zevního ústí uretry. Předchází se tak kontaminaci materiálu nežádoucími mikroby. Moč se odebírá do sterilní nádoby a transportuje se do příslušné laboratoře. Standartní doba transportu moče do laboratoře jsou 2 hodiny po odebrání. Není-li možný transport ve standartní čas, uchovává se moč při teplotě 2-8 °C maximálně 16 hodin (Benáková, 2006). Pacient odmočí první porci moče a poté již bez přerušování močení zachytí střední proud moče do sterilní nádoby. U podezření na zánět močové trubice se odebírá první porce moče. Naopak u podezření na zánět prostaty a parazitární infekci se odebírá poslední porce moče. Pokud nelze zajistit transport vzorku do 2 hodin, použije se souprava Urikult. Smyslem soupravy je okamžitá kultivace vzorku moči. Do odebrané moči se zanoří destička, která obsahuje transportní půdy. Pak se destička ze vzorku vytáhne a vloží se do transportní nádoby, kde dochází ke kultivaci (Votata et al., 2010).

3.1.2 Příjem moče v laboratoři

Při příjmu vzorku laboratoři je důležitá kontrola samotného vzorku. Zda prochází zásadami správného odběru a transportu. Poté je vzorek přiřazen k žádance obsahující údaje pacienta a je k němu přiřazeno laboratorní číslo.

Jestliže je vzorek označen jako nevalidní, je zažádáno o nový odběr a žádanku pacienta.

3.1.3 Kultivace

Moč se naočkuje na příslušnou diagnostickou půdu vytemperovanou na laboratorní teplotu. Očkování se provádí kalibrovanou kličkou o objemu 10 μ l. Ke kultivaci se v laboratoři Stafila používá půda složená z krevního agaru a chromogenního agaru, který nám na základě barevné změny odlišuje jednotlivé kolonie bakterií (obrázek č.2). Poté se uloží vzorek do termostatu při 35–37°C na 18-24 hodin, kde dochází ke kultivaci a růstu bakterií. Následný den lékař identifikuje narostlé kolonie a vyjádří jejich zastoupení pomocí jednotek CFU/ml.

Pro spontánně odebranou moč se nález jednoho mikroba při více jak 10⁵ CFU/ml považuje za pravděpodobnou infekci močových cest. Hraniční je 10⁴–10⁵ CFU/ml, při pochybnosti o kvalitě odběru tento nález může vypovídat o kontaminaci vzorku. Kvantita méně než 10⁴ je považována za kontaminaci. Do tohoto schématu nepatří moč katétrizovaná a punktovaná (Votava et al., 2010).

V případě významného nálezu lékař rozhodne o bližší identifikaci mikroba za pomoci jeho biochemických vlastností, nebo o přímé identifikaci bakterií pomocí MALDI-TOF. Laboratoř Stafila tímto přístrojem nedisponuje, vyřeší se to převozem vzorku do laboratoře, která tento přístroj vlastní. Mikrobiolog po bližším určení bakterie nařídí doprovodné laboratorní testy – vyšetření citlivosti na ATB, testy k průkazu beta-laktamáz.

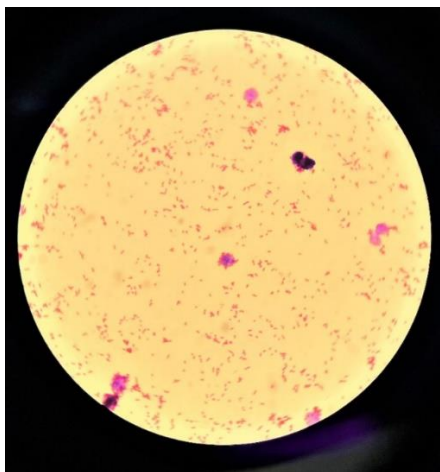


Obrázek č.2: Kultivační půda složená z krevního a chromogenního agaru. Vlevo: *K. pneumoniae*. Vpravo: *E. coli* (zdroj: vlastní).

3.1.4 Mikroskopie

Z moče se připraví mikroskopický preparát. Moč se zcentrifuguje a z močového sedimentu se zhotoví preparát podle Grama. Ten odliší mikroby podle tvaru, uspořádání a velikosti. Rozliší bakterie grampozitivní (modrá až tmavě fialová barva) a gramnegativní (růžová-červená barva) viz obrázek č.3. Mohou být i bakterie gramlabilní. Podstatou barvení dle GRAMA je rozdílná stavba buněčné stěny u grampozitivních a gramnegativních bakterií. Během barvení dochází v bakteriální buňce ke vzniku komplexů jódu a krystalové violeti. U gramnegativních bakterií je tento komplex hned vyplaven díky použitému acetonu nebo alkoholu. Grampozitivní buňky delší dobu vzdorují působení alkoholu, po delší době je může aceton odbarvit (Votava et al., 2010). Díky přístroji na barvení Borealis G se v laboratoři Stafila může obarvit až 20 preparátů najednou, viz příloha č.1.

Podle nálezu z mikroskopie se mikrobiolog rozhodne, jaká citlivost na ATB bude zpracována. Řídí se doporučenými postupy EUCAST. Přímé vyšetření antibiotické citlivosti jako zdroj inokula používá vzorek moči. Výhodou přímého vyšetření ATB citlivosti je rychlejší dostupnost výsledků, na rozdíl od vyšetření citlivosti s použitím čisté kultury. Další výhodou je zahájení včasné léčby pacienta a volba vhodného terapeutika v raném stádiu léčby (EUCAST Návod k přímému vyšetřování antibiotické citlivosti, 2012).



Obrázek č.3: Gram-negativní tyčky *E. coli* obarvené GRAMOVO barvením (zdroj: vlastní)

3.1.5 Izolace bakterií

3.1.5.1 Izolační biochemický klín

K bližšímu dourčení kmene se využívá průkazu biochemické aktivity pomocí biochemického klínu (Švejcarovy půdy). Jedná se o kombinovanou diagnostickou půdu, která nahrazuje několik zkumavkových testů – krátkou biochemickou řadu. Půda je do 1/3 šikmo vylitá na Petriho misce a obsahuje jako substrát ureu, glukózu a tiosulfát sodný. Obsaženými indikátory jsou octan olovnatý a bromthymolová modř. Enterobakterie štěpící ureu produkcí amoniaku zvýší svoje pH a tím se klín zbarví do modra. Fermentace glukózy zabarví klín do žluta. Zbytek misky je vylit Endovo půdou, lze tam pozorovat štěpení laktózy. Na tuto část, kde je Endova půda se přidává tableta sacharózy a mannitolu, štěpení se projeví červeným dvorcem kolem tablet. Na klínu v horní části provádíme vpichy, které po zčernání signalizují produkci sirovodíku. Taktéž klademe do horní části klínu podložní sklíčko, pod kterým se odečítá tvorba plynu (viz. obrázek č.4,5 a příloha č. 2).

Biochemický klín si označíme laboratorním číslem testovaného kmene. Bakteriologickou kličkou vybereme nakultivovanou izolovanou kolonii a inokulujeme ji hustě napříč oběma typům půd v šířce cca 2 cm, hustě šikmo v místě biochemického klínu. Provedeme kličkou několik vpichů do horní části klínu a nad i pod hustým inokulem provedeme konečné rozočkování několika čarami.

Pro snažší identifikaci provádíme také INDOL test a inokulaci na chromogenní agar, kde mikroby rostou v barevných koloniích. Vše provádíme stejnou kličkou. Při odečtu IBK se bere v úvahu také typický vzhled, vůně/ zápach mikroba.



Obrázek č.4: IBK *E. coli*. A – glukosa (+), urea (-); B – plyn (+); C – sirovodík (-); D – sacharóza (+/-); E – manitol (-); F – laktóza (+). (Zdroj: vlastní)

Obrázek č.5: IBK *K. pneumoniae*. A – glukosa (+), urea (+), B – plyn (+), C – sirovodík (-), D – sacharóza (+), E – manitol (+), F – laktóza (+). (Zdroj: vlastní)

3.2 Průkaz beta – laktamáz typu ESBL a AmpC

3.2.1 Diskový difuzní test

Jedná se o kvalitativní test stanovení antibiotické citlivosti. Výhodou tohoto testu je otestování citlivosti kmene na širokou škálu antibiotik. Patří mezi nejrozšířenější techniky vhodné pro vyšetření rychle rostoucích a některých náročných bakteriálních patogenů. Povrch agarové plotny je inokulován a jsou na něj umístěny papírové disky obsahující vhodné množství testovaného agens. Agens difunduje do media za vzniku koncentračního gradientu s vysokou koncentrací v blízkosti disku a snižující se koncentrací směrem od disku. Po inkubaci se vytvoří zóna inhibice růstu a průměry zón jsou interpretovány jako kategorie citlivosti.

Z čistě narostlé kultury na krevním agaru (staré nejvýše 24 hodin) vytvoříme ve sterilním fyziologickém roztoku zákal 0,5 McFarlanda. Pomocí denzitometru, který je kalibrován na stupeň 0,5 McFarlanda zákal změříme a na vortexu protřepeme. Do suspenze ponoříme sterilní vatový tampon a rotací tamponu o stěnu zkumavky vymačkáme přebytečnou tekutinu. Pomocí tamponu rozetřeme hustě inokulum ve třech různých směrech na Mueller – Hintonův bílý agar, nejlépe do 15 minut od přípravy zákalu. Položíme vhodné ATB disky opět do 15 min od přípravy inokula. Celá plocha disku musí být v kontaktu

s povrchem plotny, protože ATB disky difundují do prostředí velice rychle. Plotny se obrátí víčkem dolů a dají se inkubovat při 35-37°C, 16-20 hodin.

Použitá sestava ATB pro G – bakterie MEC: AMP – ampicilin (10), COT – kotrimoxazol (25), AMC – amoxicillin clavulanate (30), CXM – cefuroxim (30), FUR – nitrofurantoin (100), FOS – fosfomycin (200), CIP – ciprofloxacin (5).

Na rozšířenou citlivost E2 pro G – bakterie byly použity ATB: GEN – gentamicin (10), COL – colistin (10), AMI – amikacin (30), MRT (10), PPT – piperacilin tazobaktam (36), CMP – chloramfenikol (30). Všechny uvedené síly antibiotik jsou v µg. Sestavy ATB se mění podle doporučení NRL-EUCAST pro antibiotika.

Následný den po inkubaci se odečítají průměry inhibičních zón (obrázek č. 7 a 8). Při interpretaci citlivosti mikroba k danému ATB se použijí kategorie citlivosti: C, I a R. C – mikroorganismus je definován jako citlivý při standardním dávkovacím režimu, I – mikroorganismus je definován jako citlivý při zvýšené expozici, R – mikroorganismus je definován jako rezistentní. Pro surveillance se výsledky zaznamenávají jako C, I nebo R. Pokud je nezbytné spojení dvou kategorií, je možné spojit jen kategorie C+I. Definice kategorií citlivosti, dávkování a způsoby podávání antibiotik se řídí podle doporučení NRL-EUCAST. Při samotném hodnocení se musí brát v úvahu i přirozená rezistence mikroba k ATB, produkce beta-laktamáz atd. Zároveň je prováděna v laboratoři týdenní kontrola ATB disků.



Obrázek č.7: MEC citlivost pro G – bakterie. *E. coli* produkující beta-laktamázu. (Zdroj: vlastní)

Obrázek č.8: Rozšířená citlivost E2 pro G – bakterie. *E. coli* produkující beta-laktamázu. (Zdroj: vlastní).

3.2.2 DDST

Double Disc Synergy Test se řadí svojí formou do diskového difuzního testu. Slouží k detekci enterobakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy typu ESBL a AmpC. Principem je použití ATB disků napuštěných betalaktamem a disků s kombinací stejného betalaktamu s inhibítorem ESBL nebo AmpC. Podle produkce či absence širokospektrých beta-laktamáz vznikají při použití speciálních MASTDICS inhibiční zóny, které se následně odečítají.

Použije se bílý Mueller – Hinton agar, který se naočkuje pomocí vatového tampónu namočený v 0,5 zákalu McF z čerstvého kmene. Do 15 minut od rozetření inokula se na půdu položí sterilní jehlou 4 speciální ATB disky ve správném pořadí s dostatečnou vzdáleností: A – 10 μ g cefpodoximu, B – 10 μ g cefpodoximu + ESBL inhibitor, C – 10 μ g cefpodoximu + AmpC inhibitor, D – 10 μ g cefpodoximu + ESBL a AmpC inhibitor (obrázek č.8 a 9). Inkubujeme při 35-37 $^{\circ}$ C 18-24 hodin. Další den se odečítají průměry vzniklých inhibičních zón.

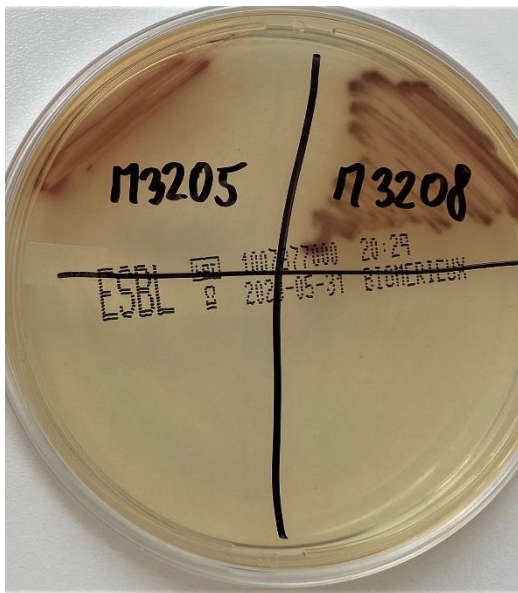


Obrázek č.9: DDST test – *E. coli* produkující širokospektrou beta-laktamázu, rezistentní k ATB (Zdroj: vlastní)

Obrázek č.10: DDST test- *E. coli* neprodukující širokospektrou beta-laktamázu, citlivé k ATB (Zdroj: vlastní)

3.2.3 ESBL půda

Pro potvrzení ESBL kmene, narostlou kolonii naočkujeme i na ESBL půdu. Jedná se speciální chromogenní agar pro určení kmenů produkujících širokospektré beta-laktamázy (obrázek č.11). Médium na bázi agaru obsahuje patentovanou směs ATB (cefpodoxim) a chromogenní substráty. Tato směs umožňuje selektivní růst a přímou identifikaci enterobakterií produkujících širokospektrou beta-laktamázu typu ESBL. Po inkubaci 18-24 hodin při 37°C dojde k zbarvení zvýrazněného chromogenním médiem a lze tak rozlišit jednotlivé druhy podle jejich specifické barvy kolonie (Biomérieux kultivační média).



Obrázek č.11: ESBL půda – potvrzení kmenu produkujícího širokospektrou beta-laktamázu. Vlevo: neprodukuje ESBL, vpravo: produkuje ESBL. (Zdroj: vlastní)

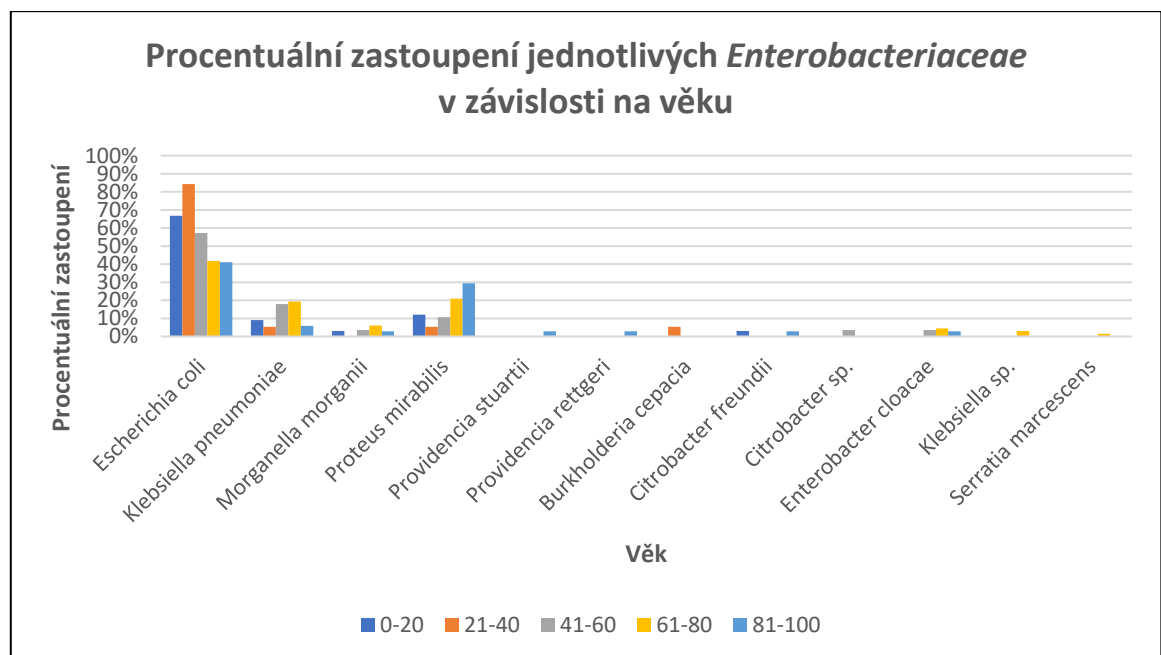
4. Výsledky

Za období 1.1-31.3. 2020 bylo v mikrobiologické laboratoři Stafila zpracováno 1315 patientských vzorků močí včetně urikultů, které byly ze statistiky vyřazeny. Zpracovalo se tedy celkem 1097 močí odebraných třemi způsoby: cévkovaná moč, permanentní katétr, střední proud. Ze souboru bylo vyřazeno 909 kultivačně negativních, kontaminovaných a nevalidních vzorků. Mezi vyřazené moče patřily i ty, kde byl bakteriální nález menší než 10^4 CFU/ml nebo nález více kmenů současně, kmenů odlišných od enterobakterií.

Pozitivních močí, obsahujících bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, bylo napočítáno 181.

4.1 Zastoupení jednotlivých *Enterobacteriaceae* způsobujících IMC v závislosti na věku a typu odebrané moči

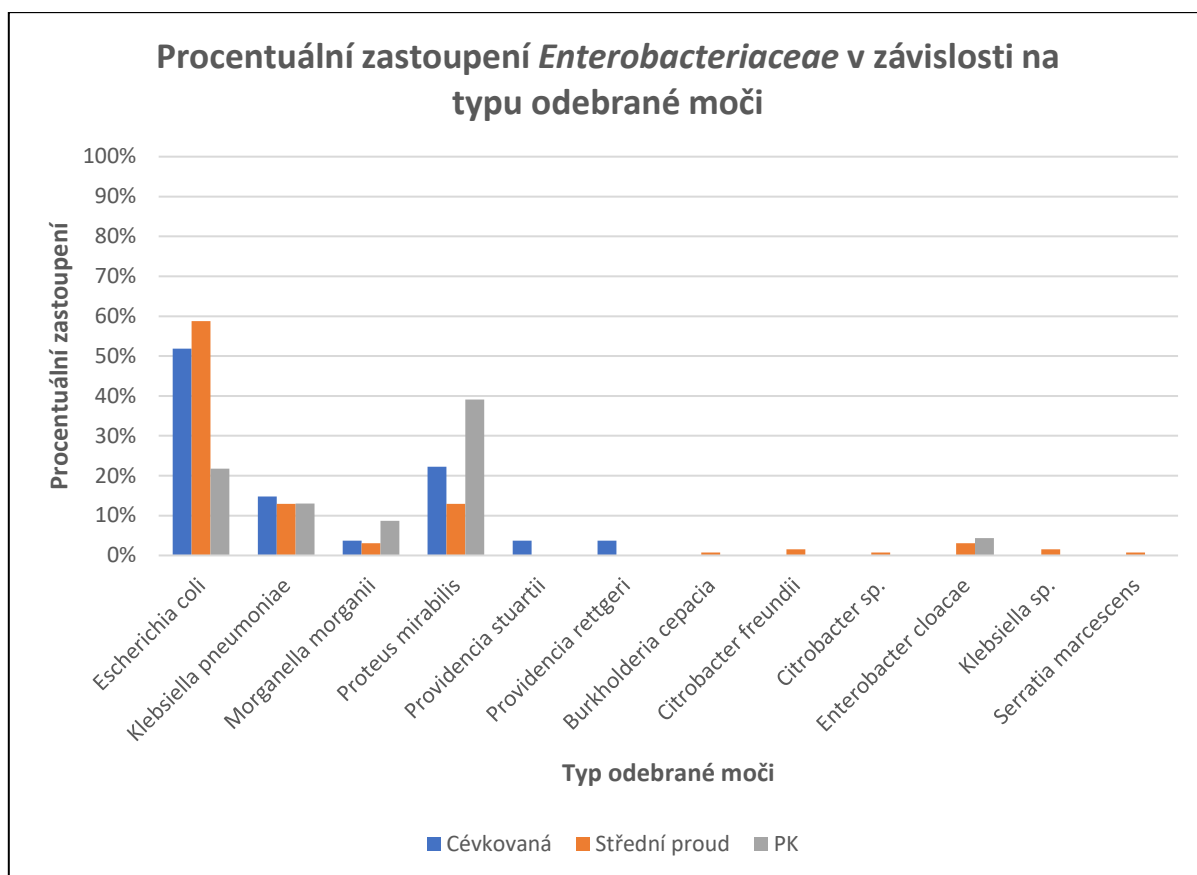
Mezi nejčastější zástupce enterobakterií způsobujících infekce močových cest ve všech věkových kategoriích dle výzkumu patří *E. coli* (nejvíce se bakterie objevuje v kategorii 20-40 let až z 84 %) další velké zastoupení zaujímají *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *M. morganii*. Detailnější informace a další kmeny jsou uvedeny v obrázku č.11.



Obrázek č.11: Graf znázorňující procentuální zastoupení jednotlivých *Enterobacteriaceae* v závislosti na věku. (Zdroj: vlastní výzkum, Stafila laboratoř)

Další porovnání bylo z hlediska typu odebrané moči. Enterobakterie nejvíce zastoupená v odběru středního proudu moči je *E. coli* z 59%, dále je nejvíce zastoupená v moči cévkované.

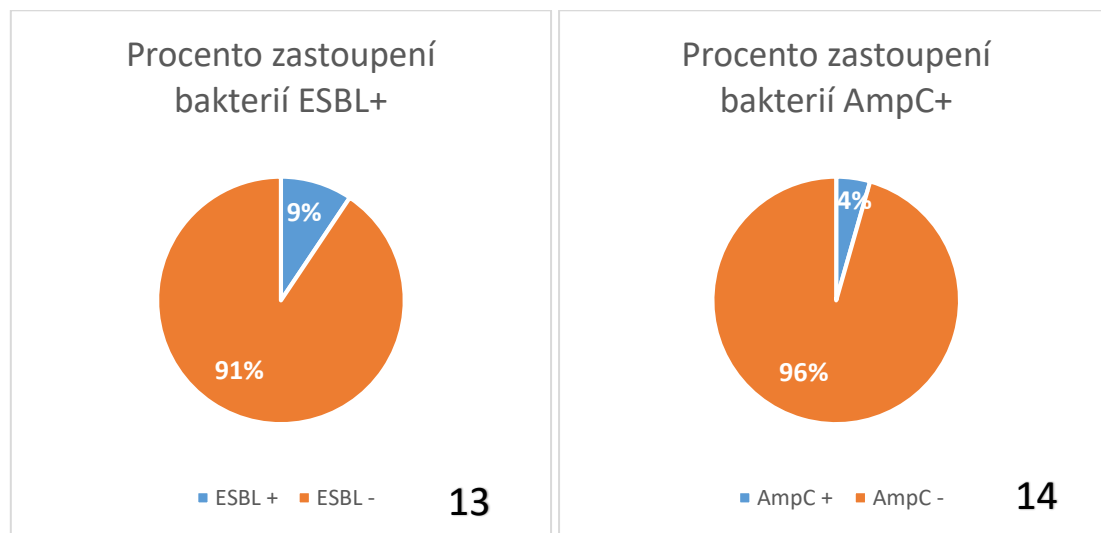
Naopak *P. mirabilis* je dle výzkumu nejvíce zastoupený u moči z permanentního katétru, a to z 39% ze všech třech možných odběrů (obrázek č.12).



Obrázek č.12: Procentuální zastoupení *Enterobacteriaceae* v závislosti na typu odebrané moči. (Zdroj: vlastní výzkum, Stafila laboratoř)

4.2 Procentuální zastoupení ESBL a AmpC pozitivních *Enterobacteriaceae* v závislosti na typu odebrané moči a na věku

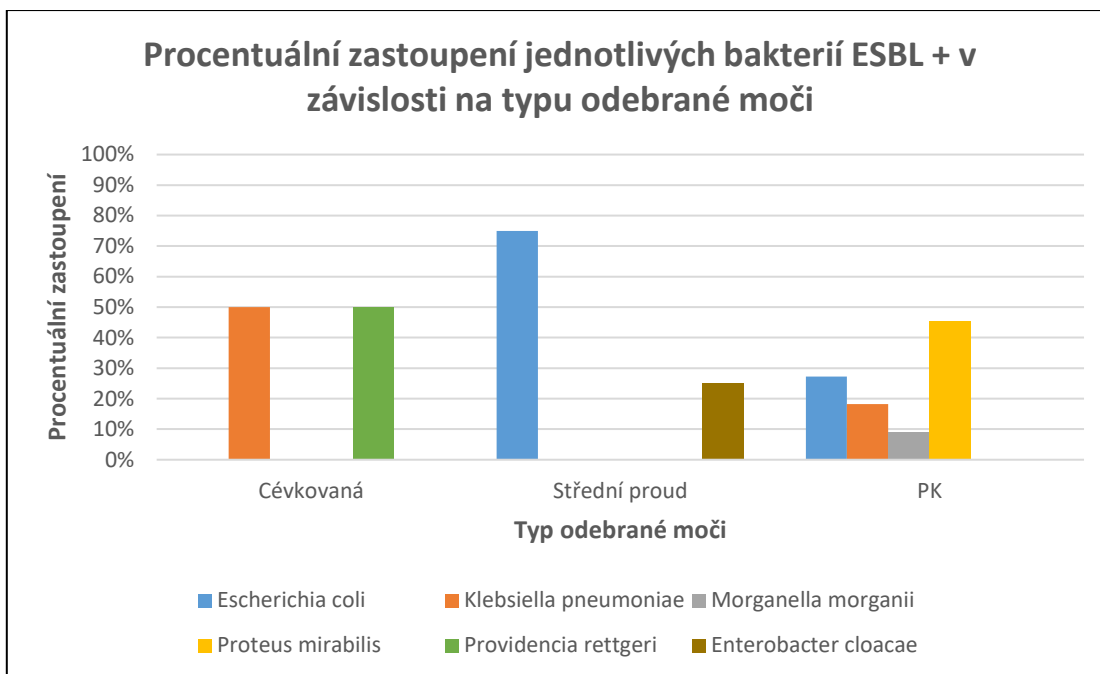
Z 181 močích obsahujících bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* bylo 17 vzorků ESBL pozitivních a 8 močí AmpC pozitivních. Procentuální zastoupení je uvedeno na obrázku č.13 a 14.



Obrázek č.13: Procentuální zastoupení ESBL+ *Enterobacteriaceae*. (Zdroj: vlastní výzkum, Stafila laboratoř)

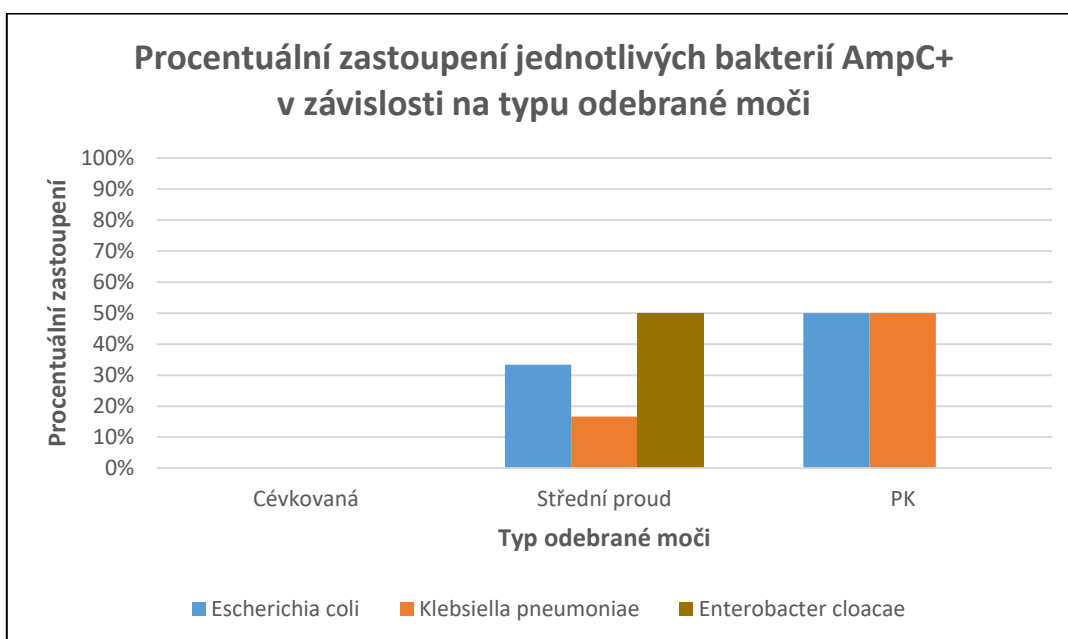
Obrázek č.14: Procentuální zastoupení AmpC+ *Enterobacteriaceae*. (Zdroj: vlastní výzkum, Stafila laboratoř)

Vzhledem k jednotlivým bakteriím ESBL+ v závislosti na typu odebrané moči je nejvíce zastoupena *E. Coli* s 6 pozitivními nálezy ESBL v spontánně odebrané moči (střední proud). Jako další s 5 nálezy je *P. mirabilis* detekovaný v moči odebrané z permanentního katétru. 3 případy jsou zastoupeny enterobakterií *K. pneumoniae* v moči cévkované a z permanentního katétru. Po jednom případě zaujímají své místo *M. morgani*, *P. rettgeri*, *E. cloacae*. Procentuální zastoupení jednotlivých bakterií ESBL+ je uvedeno v obrázku č.15.



Obrázek č.15: Procentuální zastoupení bakterií ESBL+ v závislosti na typu odebrané moči. (Zdroj: vlastní výzkum, Stafila laboratoř)

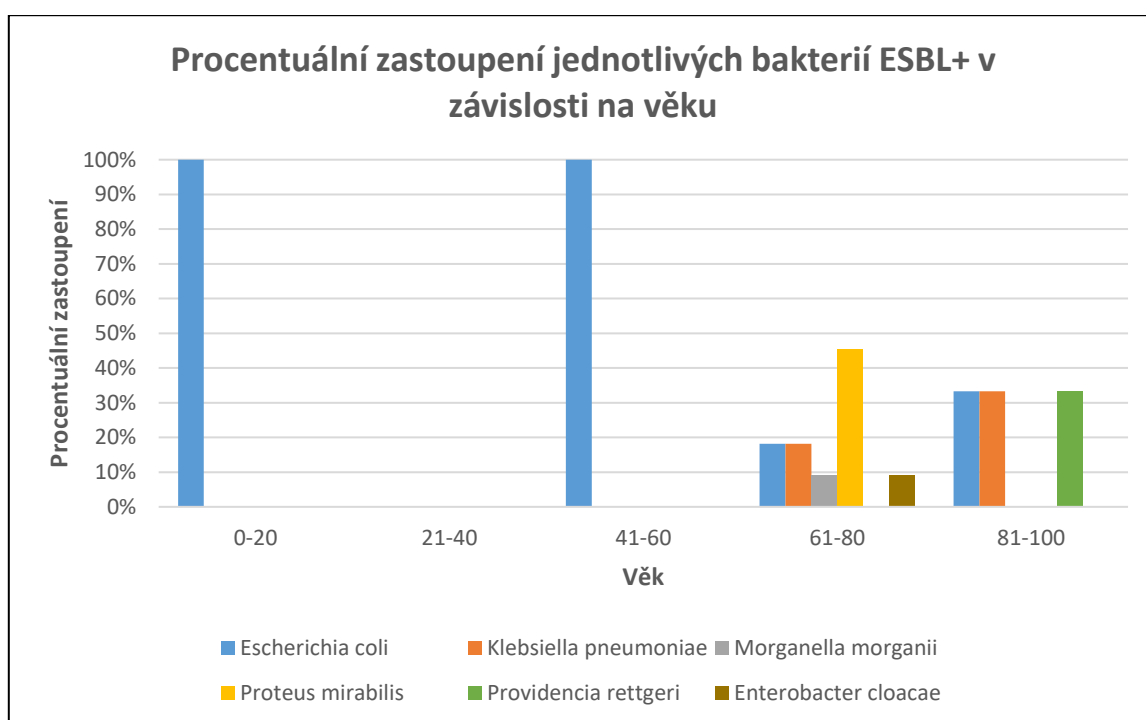
AmpC+ *Enterobacteriaceae*, *K. pneumoniae* i *E. coli* se svými 3 zástupci a *E. cloacae* s 2 zástupci, byly diagnostikovány nejčastěji v moči z permanentního katétru a ze středního proudu. Procentuální zastoupení je uvedeno v obrázku č.16.



Obrázek č.16: Procentuální zastoupení jednotlivých bakterií AmpC+ v závislosti na typu odebrané moči. (Zdroj: vlastní výzkum, Stafila laboratoř)

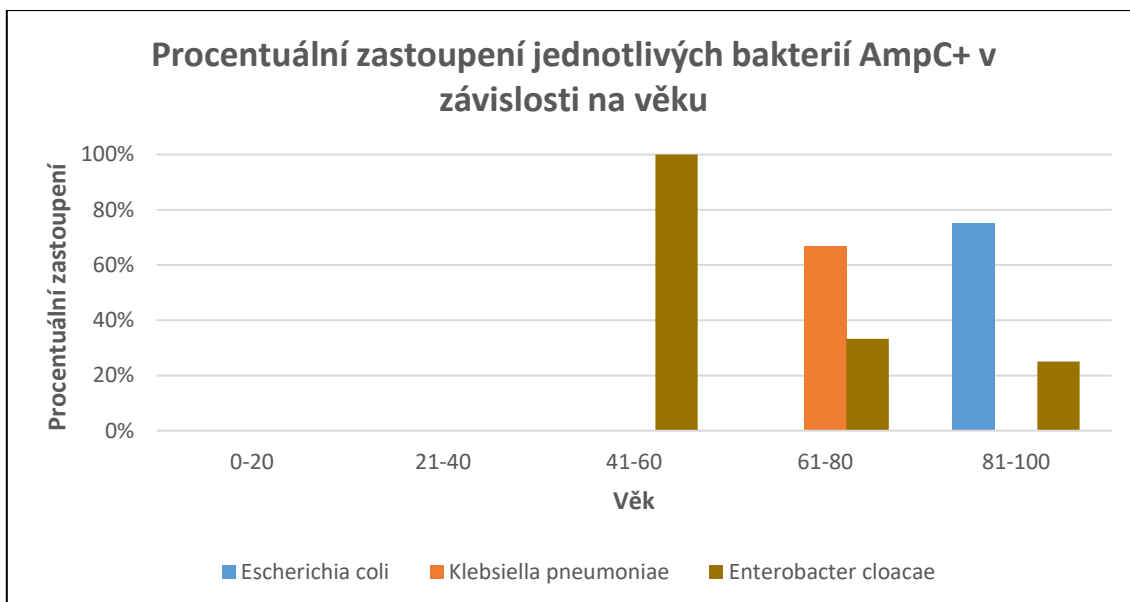
Věkový průměr pacientů s nálezem ESBL+ enterobakterií v moči je 69 let. U věkové skupiny do 20 let a v rozmezí 41-60 let je nejčastějším producentem širokospektré beta-laktamázy kmen *E. coli* a to s četností 100% v moči odebrané ze středního proudu. Senioři byli diagnostikováni nejčastěji na přítomnost *P. mirabilis* ve skupině 61-80 let až z 45%. Ve věku 81-100 let jsou procentuálně rovnoměrně rozloženy *Enterobacteriaceae* *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. rettgeri*.

U pacientů 60+ let jsou polyrezistentní kmeny přítomny v močích cévkovaných či z permanentního katétru. Zastoupení bakterií ESBL+ v jednotlivých věkových skupinách je uvedeno v obrázku č.17.



Obrázek č.17: Procentuální zastoupení jednotlivých ESBL+ bakterií v závislosti na věku. (Zdroj: vlastní výzkum, Stafila)

U pacientů s nálezem AmpC+ beta-laktamázy v moči je věkový průměr 80 let. Ve věkovém rozmezí 41-60 let je nejvíce zastoupen *E. cloacae* diagnostikován v močích odebraných ze středního proudu. U pacientů 60+ byly v moči nejčastěji diagnostikovány polyrezistentní enterobakterie *E. coli* a *K. pneumoniae* rovnoměrně v močích z permanentního katétru a spontánně vymočených. Detailnější procentuální zastoupení je uvedeno v obrázku č.18.



Obrázek č.18: *Procentuální zastoupení jednotlivých bakterií AmpC+ v závislosti na věku.*
 (Zdroj: vlastní výzkum, Stafila)

5. Diskuze

Z celkem 1097 zpracovaných močí v laboratoři Stafila za období 1.1-31.3.2020 mělo 181 vzorků pozitivní nález na bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* způsobujících infekce močových cest, procentuálně to odpovídá 16,50%. Nejzastoupenější bakterie identifikovaná u komunitních IMC je dle tohoto výzkumu *Escherichia coli* z 60,67%. Romžová uvádí procentuální zastoupení tohoto uropatogenu u infekcí močových cest v rozmezí 50-60%, Matoušková dokonce z 75-95% (Romžová, 2013; Matoušková, 2005). Mezi další nejčastější bakterie způsobujících IMC patří *Proteus mirabilis* (15,58%) a *Klebsiella pneumoniae* (11,05%).

Ve výzkumu bylo porovnáváno zastoupení jednotlivých bakterií v závislosti na věku. *E. coli* byla nejčetněji zastoupena ve věkové skupině 21-40 let z 84%. *P. mirabilis* je nejvíce zastoupený u věkové skupiny nad 80 let a *K. pneumoniae* u pacientů v rozmezí 61-80 let. Dle Bartoníčkové má 1 žena ze 3 do věku 24 let zkušenosti s IMC, kde je nutno podat jako terapii ATB. Do nejohroženější skupiny patří rovněž lidé vyššího věku (Bartoníčková, 2005). Věkový průměr pacientů s pozitivním nálezem enterobakterie v moči je 54 let. Výsledek je srovnatelný s výzkumem Fraze et al. z roku 2018, kde je jako průměrný věk u lidí s diagnostikovanou IMC 50 let a výše (Fraze et al., 2018).

Moč byla odebrána třemi způsoby: střední proud, cévkovaná moč a moč odebraná z permanentního katétru. V moči odebrané spontánním způsobem byla diagnostikována *E. coli* u 59% a v cévkované moči u 52% ze 3 možných odběrů. *P. mirabilis* je nejvíce zachycen u odběru z permanentního katétru (39%). Podle Romžové se u jednorázového cévkování může IMC objevit u 7% a při zavedení permanentního katétru až u 25% pacientů (Romžová, 2013).

Procentuální zastoupení ESBL pozitivních vzorků močí je z celkového počtu vzorků 181 9%. *E. coli* má ze 17 ESBL+ vzorků 6 zástupců, *P. mirabilis* 5, *K. pneumoniae* 3. Věkový průměr pacientů s pozitivním nálezem širokospektré beta-laktamázy je 69 let. Zde je *E. coli* nejzastoupenější ve věkových kategoriích 0-20 let a 41-60 let v moči odebrané ze středního proudu. Zbylí zástupci byli detekováni v moči cévkované a z permanentního katétru u pacientů nad 60 let.

AmpC pozitivní moče měly své zastoupení procentuálně nižší a to konkrétně 4% (8 vzorků pozitivních). Bakterie *K. pneumoniae* i *E. coli* se svými 3 zástupci a *E. cloacae* s 2 zástupci, se vyskytovaly v moči odebrané z permanentního katétru a ze středního proudu. Věkový průměr je zde 80 let.

Nárůst *Enterobacteriaceae* produkujících širokospektré beta-laktamázy způsobující IMC v posledních letech stále stoupá. Důsledkem velkého selekčního tlaku ve výběru antibiotik se objevují stále více bakterií, které již neštěpí jen běžná beta-laktamová antibiotika (peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy), ale i cefalosporiny vyšších generací a karbapenemy. Weinstein et al. nás informuje ve svém výzkumu publikovaném v roce 2019, že se rapidně zvýšil podíl komunitních uroinfekcí zapříčiněných zástupci z čeledi *Enterobacteriaceae*, které vykazují rezistenci i na širokospektré cefalosporiny. Například během tříletého období mezi lety 2000 a 2003 Španělská nemocnice zaznamenala trojnásobný nárůst komunitních infekcí močových cest způsobený *E. coli* produkující širokospektré beta-laktamázy typu ESBL. Ve Spojených státech byly během stejného časového období enterobakterie produkující ESBL v komunitě méně časté, v posledním desetiletí však byla jejich přítomnost stále častěji zaznamenávána. Nedávné studie v USA uvádějí, že 36–83% IMC způsobených *E. coli* produkujícími ESBL v USA mělo komunitní nástup (Weinstein et al., 2019).

6. Závěr

Bakteriální rezistence na běžně dostupná antibiotika celosvětově stoupá. Jelikož infekce močových cest patří mezi nejrozšířenější zánětlivá onemocnění vůbec, terapie se díky vyšší odolnosti mikroorganismů stále více komplikuje. *Enterobacteriaceae*, gramnegativní tyčky, patří mezi nejčastější uropatogeny. Jsou to producenti enzymů, širokospektrých beta-laktamáz, které svým hydrolytickým působením na beta-laktamový kruh antibiotika inaktivují. Jinak běžně užívaná beta-laktamová terapeutika k léčbě uroinfekcí se díky těmto rezistentním patogenům stávají neúčinná.

Cílem bakalářské práce bylo na problém rezistencí upozornit a zaměřit se na to, jakou věkovou skupinu pacientů nejčastěji postihuje komunitní infekce močových cest způsobená polyrezistentními *Enterobacteriaceae*, produkující beta-laktamázy typu ESBL a AmpC. Zjistit četnost výskytu jednotlivých polyrezistentních enterobakterií, způsobující IMC. Dalším cílem bylo vykonání rutinní laboratorní práce, která obsahovala zpracování moči a detekce zmíněných beta-laktamáz.

Mezi nejzastoupenější polyrezistentní uropatogeny patří z více jak 60% *Escherichia coli*, nejběžnější zástupce diagnostikovaný ve vzorku moči odebranným spontánním vymočením. Přehlížení by neměli být ani *Proteus mirabilis* a *Klebsiella pneumoniae*, kteří patří mezi další nejčastější patogeny způsobující infekce močových cest. Oproti *E. coli* tito dva zástupci byli diagnosticky potvrzeni nejvíce ve vzorcích moče odebraných z permanentního katétru a jednorázového cévkování. Právě tito tři nejběžnější uropatogeni z čeledi *Enterobacteriaceae* patří mezi nejčastější producenty beta-laktamáz typu ESBL a AmpC u infekcí močových cest.

V naší studii do nejohroženější komunity na uroinfekce patří senioři, kteří pobývají v pečovatelských zařízeních. Diagnostikou polyrezistentních enterobakterií v moči bylo prokázáno, že věkové rozmezí pacientů s ESBL a AmpC pozitivitou je 69-80 let. Díky pokročilému věku a zdravotním problémům bývá vzorek odebírán často zavedením permanentního katétru či jednorázovým cévkováním. Důležitá je prevence a správné hygienické návyky při výměně či zavádění katétru, tyto postupy předchází případné kontaminaci a následnému rozvinutí infekce močových cest. Důraz se musí klást i na zvolení vhodné terapie a výběru správného terapeutického přípravku, aby se zamezilo možné rezistenci uropatogenu vůči danému antibiotiku a ztížení léčby. U geriatrických

pacientů je zhodnocení jejich celkového zdravotního stavu a zvolení správné medikace rozhodující, ovlivňuje to kvalitu jejich života. Je prokázáno, že mezi negativní dopady narůstající rezistence k antibiotikům patří kratší životnost a vyšší úmrtnost.

Do prevence proti šíření polyrezistentních bakterií v komunitě patří soubor činností, které na sebe s jistotou závisí. Začínají už u poučení pacientů o správných hygienických návycích, které předchází možnému rozvinutí samotné infekce. Patří sem i dodržení postupů při odběru materiálu za aseptických podmínek a vhodný transport vzorku. Dalším důležitým krokem je správná a včasná laboratorní diagnostika patogenu. V případě pozitivního nálezu výskytu polyrezistentních bakterií je nutné přijmout příslušná epidemiologická opatření, které brání šíření rezistentních kmenů. Zásadním krokem v prevenci proti šíření polyrezistentních kmenů je nasazení vhodného terapeutického přípravku. Nadužívání a nevhodný výběr antibiotik komplikuje zpomalení rozvoje rezistence. Správná preskripce antibiotik nám pomůže snížit jejich spotřebu i selekční tlak. Pro sledování stavu a vývoje rezistence nám slouží databáze EARS-Net, jejíž je Česká republika součástí.

7. Literatura

1. BARTONÍČKOVÁ, K., 2004. *Léčba močových infekcí* [online]. Urologie pro praxi. [cit. 2021-01-25]. Dostupné z: https://www.urologiepropraxi.cz/artkey/uro-200406-0005_Lecba_mocovych_infekci.php
2. BARTONÍČKOVÁ, K., 2005. *Infekce močových cest v komunitě* [online]. Interní medicína pro praxi. [cit.2021-01-27]. Dostupné z: https://www.internimedicina.cz/artkey/int-200512-0006_Infekce_mocovych_cest_v_komunite.php
3. BARTONÍČKOVÁ, K., BÉBROVÁ, E. et al., 2006. *Doporučený postup pro antibiotickou léčbu komunitních infekcí ledvin a močových cest v primární péči* [online]. ČLS JEP. [cit. 2021-01-27]. Dostupné z: <https://www.splm.cz/doporucene-postupy>
4. BENÁKOVÁ, H., 2006. *Preanalytická příručka klinických laboratoří ÚLBLD* [online]. VFN Praha. [cit. 2021-03-08]. Dostupné z: <https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/3808/preanalyticka-prirucka-v14-pdf.pdf>
5. BENEŠ, J., 2009. *Infekční lékařství*. 1. vydání. Praha: Galén. 680s. ISBN 978-80-7262-644-1.
6. BOLUS, J., TURNER, RB., 2015. Prolonged-Infusion Dosing of Beta-Lactam Antibiotics. *US Pharm.* 40(4), 19-23.
7. BUSH, K., BRADFORD, PA., 2016. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 6(8), doi:10.1101/cshperspect.a025247
8. CARBONNELLE, E., MESQUITA, C. et al., 2011. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry.* 44(1), 104-109, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017.
9. DRIEUX, L., BROSSIER, F. et al., 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect.* 14(1), 90-103, doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01846.x.
10. FRAZEE, BW., TRIVEDI, T. et al., 2018. Emergency Department Urinary Tract Infections Caused by Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Many Patients Have No Identifiable Risk Factor and

- Discordant Empiric Therapy Is Common. *Ann Emerg Med.* 72(4), 449-456, doi: 10.1016/j.annemergmed.2018.05.006.
11. GISKE, CH., MARTINEZ, L. et al., 2017. *Návody EUCAST pro detekci mechanismů rezistence a specifické rezistence s klinickým a/nebo epidemiologickým významem SZÚ Praha* [online]. SZÚ Praha. [cit. 2021-04-22]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/EUCAST_mechanismy_rezistence_v2_2017.pdf
 12. HRABÁK, J., BERGEROVÁ, T. et al., 2009. Detekce širokospektrých β -laktamáz (ESBL), β -laktamáz AmpC, metalo- β -laktamáz (MBL) a karbapenemáz KPC u gramnegativních tyčků. *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie. SZÚ Praha.* 18(3), 100-106.
 13. HRABÁK, J., VANÍŠ, V. et al., 2008. *Průkaz beta-laktamáz širokého spektra (ESBL) a typu AmpC u enterobakterií* [online]. SZÚ Praha. [cit. 2021-02-05]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/prukaz-beta-laktamaz-sirokeho-spektra-esbl-a-typu-ampc-u>
 14. HTOUTOU SEDLÁKOVÁ, M., 2015. *Klinický význam širokospektrých beta-laktamáz.* Olomouc. Disertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Lékařská fakulta.
 15. JEDLIČKOVÁ, A., 2004. *Antimikrobiální terapie v každodenní praxi.* Praha: Maxdorf. 361s. ISBN: 80-7345-029-1.
 16. JULÁK, J., PAVLÍK, E. et al., 2010. *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékařství.* Praha: Karolinum. 443s. ISBN: 978-80-246-1792-3.
 17. KAWACIUK, I., 2009. *Urologie.* 1. vydání. Praha: Galén. 531s. ISBN 978-80-7262-627-7.
 18. KOLÁŘ, M., 2019. Nebezpečné multirezistentní bakterie „superbugs“ v současné medicíně. *Interní Med.* 21(3), 142-148.
 19. KOLOMBO, I., HANUŠ, T. et al., 2007. *Infekce močových cest pro praktické lékaře a specialisty.* Praha: Galén. 292s. ISBN 978-80-7262-445-8.
 20. KRAMÁŘ, R., 2007. *Lékařská mikrobiologie.* České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých budějovicích, Zdravotně sociální fakulta. 72s. ISBN: 978-80-7394-021-8.

21. LEE, JJ., LEE, JH. et al., 2015. Fast and Accurate Large-Scale Detection of β -Lactamase Genes Conferring Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 59(10), 967-75, doi: 10.1128/AAC.04634-14.
22. LOMOVSKAYA, O., SUN, D. et al., 2017. Vaborbactam: Spectrum of Beta-Lactamase Inhibition and Impact of Resistance Mechanisms on Activity in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 61 (11), 1443-17, doi: 10.1128/AAC.01443-1.
23. MATOUŠKOVÁ, M., 2005. *Terapie infekcí močových cest* [online]. Remedia. [cit. 2021-01-25]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Farmakoterapie/Terapie-infekci-mocovych-cest/6-L-aW.magarticle.aspx>
24. MCLELLAN, LK., HUNSTAD, DA. et al., 2016. Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. *Trends Mol Med.* 22(11), 946-957, doi: 10.1016/j.molmed.2016.09.003.
25. MOGHADDAM, MN., BEIDOKHTI, MH. et al., 2014. Genetic properties of blaCTX-M and blaPER β -lactamase genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae by polymerase chain reaction. *Iranian journal of basic medical sciences.* 17(5), 378–383.
26. NABER, KG., BERGMAN, B. et al., 2005. Guidelines eau pro diagnostiku a léčbu infekcí močových cest, včetně pohlavních cest u mužů 1. část. *Urol list.* 3(2), s.71-95
27. NICOLLE, LE., 1997. Asymptomatic bacteriuria in the elderly. *Infect Dis Clin North Am.* 11(3), 647-667, doi: 10.1016/s0891-5520(05)70378-0.
28. OLIN, SJ., BARTGES, JW., 2015. Urinary tract infections: treatment/comparative therapeutics. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 45(4) ,721-46, doi: 10.1016/j.cvsm.2015.02.005.
29. *EUCAST návod k přímému vyšetřování antibiotické citlivosti*, 2012. [online]. SZU. [cit. 2021-22-04]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/pokyny_dalsi/Prime_vysetrovani_atb_citlivosti.pdf?highlightWords=postup+pro+odb%C4%9B
30. ROMŽOVÁ, M., 2013. Diagnostika a léčba infekcí močových cest u starých lidí. *Urologie pro praxi.* 14(5), s. 212-214.

31. SANTOS, A.L., DOS SANTOS, A.P. et al., 2020. Profile of Enterobacteria Resistant to Beta-Lactams. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 9(7), 410, doi:10.3390/antibiotics9070410.
32. SCHINDLER, J., 2010. *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů. I. vydání*. Praha: Grada. 224s. ISBN: 978-80-247-3170-4.
33. STANĚK, L., 2013. Polymerázová řetězová reakce: princip metody a využití v molekulární patologii. *Cesk Patol.* 49(3), s. 119-21
34. ŠTEFAN, M., 2017. Léčba infekcí močových cest v éře antibiotické rezistence. *Urologie pro praxi.* 18(1), s.17-20
35. ŠTURMA, J., 2010. *Antibiotická střediska (ATB střediska)* [online]. SZÚ Praha. [cit. 2021-01-30]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/antibioticka-strediska>
36. VOJTOVÁ, V., URBÁNEK, K., 2010. Potencované peniciliny – spotřeba a náklady v ČR v letech 1997-2008. *Klin Farmakol Farm.* 24(3), s. 117-120
37. VOTAVA, M. et al., 2010. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno: Neptun. 495s. ISBN: 978-80-86850-04-8.
38. VOTAVA, M. et al, 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná. 2. vydání*. Brno: Neptun. 351s. ISBN: 80-86850-00-5.
39. VOTAVA, M. et al., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. 495s. ISBN: 80-902896-6-5.
40. WEINSTEIN, E.J., HAN, J.H. et al., 2019. A Clinical Prediction Tool for Extended-Spectrum Cephalosporin Resistance in Community-Onset Enterobacterales Urinary Tract Infection. *Open Forum Infect Dis.* 6(4), doi: 10.1093/ofid/ofz164.
41. ZENG, X., LIN, J., 2013. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front. Microbiol.* 4, 128, doi: 10.3389/fmicb.2013.00128.

8. Seznam zkratek

ABU – asymptomatická bakteriurie

ATB – antibiotikum

CFU – Colony Forming Units

CFU/ml – Colony Forming Units

ČLS JEP – Česká lékařská společnost J. Ev. Purkyně

DC – deoxycholát-citrát agar

ESBL – Extended Spectrum Beta – Lactamase

IBK – izolační biochemický klín

IMC – infekce močových cest

MAL – mannit-arabinosa-laktosa agar

MBC – minimální baktericidní koncentrace

McF – McFarland

MH-Mueller-Hintonův agar

MIC – minimální inhibiční koncentrace

PBP – penicilin-binding proteins

PCR – polymerázová řetězová reakce

STD – Sexually Transmitted Diseases

UTIs – Urinary Tract Infections

WB – vizmut-sulfitový agar

XLD – xylosa-lysin-deoxycholát agar

9. Přílohy

Příloha č.1: Přístroj na barvení GRAM – Borealys G



Zdroj: vlastní

Příloha č.2: Biochemické vlastnosti vybraných *Enterobacteriaceae* způsobujících IMC

	Glukóza/tvorba plynu	Laktóza	Sacharóza	Manitol	Urea	Sirovodík
E. coli	+	+	+/-	+	-	-
C. freundii	+	+/-	-/+	+	-/+	+
K. pneumoniae	+	+	+	+	+	-
E. cloacae	+	+	+	+	+/-	-
P. mirabilis	+	+/-	+/-	-	+	+
M. morganii	+	-	-	-	+	-

Zdroj: interní pracovní postupy Stafila