

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA

Beta-laktamáza pozitivní *Haemophilus influenzae* u dětí

Bakalářská práce

Autor práce: Pavla Bromová

Vedoucí práce: MUDr. Radim Kramář, CSc.

6. 5. 2010

Abstract

This Bachelor thesis, called **”Beta-lactamase Positive *Haemophilus influenzae* in Children“** deals with the basic properties and current occurrence of the bacteria *Haemophilus influenzae*, and also with the occurrence of other hemofils (*Haemophilus species*) in children, which occurred in the biological material sent to the microbiological laboratory- Laboma s.r.o. in České Budějovice, where some of them were producers of β -lactamase. The occurrence of these enzymes might be a serious problem for the right choice of antibiotics for the treatment of diseases caused by these hemofils.

The essential objective was to collect and assess all data about β -lactamase positive hemofils in the material from airways of children from birth to 15 years of age and with a certain numbers of diagnoses in the aforementioned microbiological laboratory.

The data for my thesis was collected in the second half of 2008 and first half of 2009 and was later statistically processed into graphic figures and charts in the form of results. I have also learned to use an easy and used diagnostic method for the verification of β -lactamase (β -LACTAstrip test), during which the color was changed in the zone of the indicator paper if β -lactamase was present. I have also visited pediatricians, who co-operate with this laboratory. They were willing to reply to four questions in my questionnaire. The main objective of these questions was to focus on the treatment of ill children whose biological material from upper airways shows present β -lactamase positive hemofils.

From the collected data I managed to reject hypothesis No. 1 by calculating the average relative quantity from the total occurrence of hemofils producing β -lactamase, and I have found that the production of these enzymes is lower by 50 %. Then, I confirmed hypothesis No. 2 that more common producers of β -lactamase are other hemofils (*H. species*) than *H. influenzae*. From replies provided by pediatricians, I found out that all of these pediatricians take the presence of β -lactamase into consideration

when they chose antibiotics and this confirmed hypothesis No. 3.

This Bachelor thesis can be used as an argument for pediatricians to take into consideration the presence of β -lactamase in the biological material of producers, when they choose antibiotics.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma **Beta-laktamáza pozitivní *Haemophilus influenzae* u dětí** vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených 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/v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, dne 6. 5. 2010

Podpis studenta:

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Mudr. Radimu Kramářovi, CSc. za odbornou pomoc, ochotu a trpělivost, kterou mi věnoval při tvorbě této práce, dále děkuji mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o., respektive jejím ochotným pracovníkům za trpělivost a vstřícnost.

Obsah

Úvod	8
1. Současný stav	9
1.1 <i>Haemophilus influenzae</i>	9
1.1.1 Morfologie a fyziologie	10
1.1.2 Klinický význam	12
1.1.2.1 Patogeneze	13
1.1.2.2. Patogenita	13
1.1.3 Diagnostika	15
1.2. Beta-laktamázy	16
1.2.1 Definice a význam	17
1.3 Streptokoky	18
1.4 Terapie	18
1.4.1 Beta-laktamy	19
1.4.1.1 Peniciliny	20
1.4.1.2 Cefalosporiny	21
2. Cíl práce a hypotézy	22
2.1. Cíl práce	22
2.2. Hypotézy	23
3. Metodika	24
3.1 Charakteristika souboru	24
3.2 Stanovení beta-laktamázové aktivity	25
3.2.1 Diagnostický test β -LACTAstrip	25
3.3 Dotazník	26
4. Výsledky	27

4.1 Výskyt hemofilů produkujících β -laktamázy u dětí během druhého pololetí roku 2008 a prvního pololetí roku 2009	27
4.1.1 Celkový výskyt β -laktamázy pozitivní bakterie <i>Haemophilus influenzae</i> u dětí	27
4.1.2 Celkový výskyt β -laktamázy pozitivní bakterie <i>Haemophilus species</i> u dětí	30
4.2 Celkový výskyt <i>Streptococcus pyogenes</i> v odebraném materiálu společně s β -laktamáza pozitivními hemofily (<i>H. influenzae</i> a <i>species</i>)	35
4.3 Výsledky získané dotazníkem	36
5. Diskuze	38
6. Závěr	41
7. Seznam použitých zdrojů	43
8. Klíčová slova	48
9. Přílohy	49

Úvod

Haemophilus influenzae je dnes jednou z nejčastěji vyskytujících se bakterií, která má významnou úlohu v řadě respiračních onemocnění, zejména u dětí. Její vysoký výskyt v hltanu dítěte, který se s postupujícím věkem pomalu snižuje (22), má velký vliv na vznik těchto onemocnění. Některé hemofily se vyznačují svou produkcí β -laktamáz, jejichž přítomnost v horních cestách dýchacích je důležitá pro určení správné antimikrobiální terapie. Zajímala mě především otázka, jak častá je produkce těchto β -laktamáz u *Haemophilus influenzae*, jestli je produkce častější u ostatních hemofilů (*Haemophilus species*), a zda berou ošetřující praktičtí lékaři při terapii ohled na jejich přítomnost v horních cestách dýchacích.

Haemophilus influenzae je gramnegativní bakterie, která má kokobacilární až vláknitý tyčkovitý tvar. Je součástí běžné lidské flóry v oblasti horních cest dýchacích, ale také může být původcem široké škály onemocnění (27). Tyto hemofily jsou jednou z hlavních příčin závažných bakteriálních infekcí u dětí v rozvojových regionech, kde způsobují kolem 30 % případů pneumonií a 20-60 % případů bakteriální meningitidy (37). Je také světově významným patogenem v oblasti veřejného zdraví. Kromě pneumonií a meningitid způsobují také záněty středního ucha, vedlejších dutin nosních, septikémie a dnes již méně vyskytující se epiglottitidy u dětí. Tato onemocnění často probíhají s komplikacemi, a proto je důležitá včasná diagnostika a léčba. Pokud nejsou malé děti a kojenci očkováni proti *H. influenzae* typu b, je výskyt těchto onemocnění naopak poměrně častý a průběh smrtelný.

Při výskytu *Haemophilus influenzae* v horních cestách dýchacích, často společně i s přítomností jiných kmenů bakterií (*Streptococcus*, *Moraxella*), je důležité provést vyšetření přítomnosti β -laktamázy, pomocí testu β -LACTAstrip, aby byla antimikrobiální terapie účelná a nedošlo k vysoké, neúčinné spotřebě antibiotik, a především ke vzniku rezistence na antibiotika.

1. Současný stav

Hemofily tvoří přibližně 10 % z normální bakteriální flóry zdravých horních cest dýchacích. Neopouzdřené kmeny *Haemophilus influenzae* jsou přítomny v hltanu u většiny zdravých dětí (80 %), ale obvykle tvoří méně než 2 % z celkové bakteriální flóry (22). Disponovanou skupinou jsou hlavně děti od 3 měsíců do 3 let. *Haemophilus influenzae* je původcem primárních i sekundárních infekcí (27), způsobující zejména sinusitidy, otitidy, meningitidy a epiglottitidy. Kmeny *H. influenzae* mohou produkovat β -laktamázy, což jsou enzymy rozkládající β -laktamová antibiotika, které tak ztrácí svůj antimikrobiální účinek. Proto je nutné brát v úvahu jejich přítomnost při terapii těmito antibiotiky.

1.1 *Haemophilus influenzae*

Bakterie *Haemophilus influenzae* je nejvýznamnějším patogenem z čeledě *Pasteurellaceae*, rodu *Haemophilus* (17). Tyto nepohyblivé, nesporulující, gramnegativní tyčinky, jejichž tvar je zpravidla pleomorfní (proměnlivý), od krátkých kokobacilů až po dlouhé vláknité formy, vyvolávají řadu rozmanitých onemocnění zejména u dětí (34). Kritériem pro zařazení mikroorganismů do rodu *Haemophilus* jsou nároky na růstové faktory, které byly nazvány X a V. Faktor označovaný v tradiční bakteriologické literatuře X se fyziologicky uplatňuje jako hemin, faktor V je totožný s nikotinamidadenin-dinukleotidem (NAD). Podle nároků na uvedené faktory je možné hemofily druhově rozlišit. *H. influenzae*, *H. haemolyticus* a *H. aegyptius* vyžadují k růstu faktor X i faktor V. *H. parainfluenzae* a *H. parahaemolyticum* vyžadují pouze faktor V, *H. aphrophilus* a *H. ducreyi* jen faktor X (3). Tyto faktory se vyšetřují na vhodných kultivačních médiích, jež tyto faktory obsahují, nebo na půdách naočkovaných těmito bakteriemi, na něž se položí papírové disky napuštěné těmito faktory, a podle růstu se dají hemofily druhově rozlišit (2). U člověka nejčastěji izolujeme *Haemophilus influenzae* a *Haemophilus parainfluenzae*. *H. influenzae* byl při svém objevu koncem XIX. století pokládán za etiologické agens

chřipky.

Haemophilus influenzae je možné podle pouzderných antigenů rozdělit do 6 skupin (a-f); nejzávažnější je skupina b (20), což je polymerní ribozylribitolfosfát. Kmeny s tímto pouzdrém jsou invazivní a způsobují závažná onemocnění zejména u dětí.

K rychlé, předběžné diagnóze se provádí mikroskopické vyšetření nátěru odebraného vzorku, obarveného podle Grama (8). Gramovo barvení je diferenciační barvení užívané v bakteriologické diagnostice. Umožňuje rozdělit bakterie na grampozitivní G^+ a gramnegativní G^- . Podstata odlišné barvitelnosti buněčné stěny bakterií je dána rozdíly v její struktuře (21). Fixovaný preparát bakterií se nejprve obarví krystalovou violetí, a po následném působení Lugolova roztoku (Gramova jodového roztoku) vzniká barevný komplex zbarvující preparát intenzivně modrofialově. Po vhodné dobu působení na preparát acetonem nebo acetonalkoholem dokážeme rozlišit grampozitivní bakterie, které modrofialové barvivo působením alkoholu neztrácejí a zůstávají modré, a gramnegativní, které se alkoholem odbarvují a které je možno po odbarvení znovu obarvit např. karbolfuchsinem nebo safraninem, takže jsou pak červené (18). Hemofily se barví dobře, ale určit, že jde o *H. influenzae*, včetně produkce β -laktamázy, je možné jen kultivačně.

1.1.1 Morfologie a fyziologie

Haemophilus influenzae je, podle Gramova barvení, gramnegativní krátká (2 μ m), štíhlá tyčinka až kokobacilus. Jednotlivé tyčinky jsou samostatné, po dvou nebo v krátkých řetězcích. V patologickém materiálu mají často podobu drobných diplokoků, mohou napodobovat pneumokoky, ale jsou podstatně menší a nedají se s nimi splést. Jednotlivé tyčinky mohou být seřazeny do řetízků a tak krátké, že připomínají streptokoky. Jindy se setkáváme s dlouhými, často vláknitými nebo zcela nepravidelnými rohlíčkovitými útvary, na konci zduřelými. Polymorfie vzniká často pod vlivem antibiotik, zvláště β -laktamů. Jde pak vlastně o sferoblasty, někdy nazývané L formy. Tvarová rozmanitost je

pro hemofila charakteristická. *H. influenzae* je velice citlivý na vyschnutí, teplotu a sluneční světlo (24).

Hemofily jsou fakultativně anaerobní a většině z nich vyhovuje atmosféra obohacená o 5-10% CO₂. *Haemophilus influenzae* je CO₂-dependentní kmen, pro svůj růst přímo vyžaduje vyšší koncentrace CO₂ (34). Hemofily se rozlišují především podle nároků na přítomnost takzvaných růstových faktorů. Jsou to hemin označovaný jako X faktor a NAD označovaný jako V faktor (20).

Tab. 1. Rozdělení hemofilů podle závislosti na růstových faktorech

druh <i>Haemophilus</i>	X faktor	V faktor
<i>H. influenzae</i>	+	+
<i>H. haemolyticus</i>	+	+
<i>H. aegyptius</i>	+	+
<i>H. parainfluenzae</i>		+
<i>H. parahaemolyticum</i>		+
<i>H. aphrophilus</i>	+	
<i>H. ducreyi</i>	+	

Na základě průkazu tvorby indolu a přítomnosti ureasy a ornitindekarboxylasy jsou kmeny *H. influenzae* řazeny do osmy biotypů. Nejčastěji se vyskytují biotypy I, II a III (34).

Tab. 2. **Biotypy *H. influenzae***

Biotyp	indol	ureasa	ornithinkarboxylasa
I	+	+	+
II	+	+	-
III	-	+	-
IV	-	+	+
V	+	+	+
VI	-	-	+
VII	+	-	-
VIII	-	-	-

Zdroj: (34)

Podle charakteru polysacharidů pouzdra se hemofily třídí do šesti antigenních typů, které se označují písmeny a až f (3). Specifickým typovým antigenem je rozpustný polysacharid pouzdra. Mohou se tedy typovat jen kmeny opouzdrěné.

Hemofilus obsahuje dva bílkovinné tělové antigeny, a to P substanci, která tvoří většinu bílkovin bakteriálního těla a je rozličná u různých kmenů, a povrchovou M substanci, toxickou pro laboratorní zvířata, kterou nalezneme u všech kmenů (24).

1.1.2 Klinický význam

Haemophilus influenzae tvoří přibližně 10 % normální bakteriální flóry zdravých horních cest dýchacích. Převažujícím druhem je především *H. parainfluenzae*, který představuje 3/4 hemofilové flóry v dutině ústní a v hltanu, ale chybí v nosní dutině. Je zde pokládán za saprofyta. V hltanu, u většiny zdravých dětí, se vyskytují neopouzdrěné kmeny *H. influenzae* především biotypu II nebo III. Při lokální infekci kmeny *H. influenzae* obvykle dominují nad ostatní bakteriální flórou v hltanu a nosní dutině (22).

1.1.2.1 Patogeneze

Infekce se přenáší obvykle kapénkami, případně kontaktem. K rozvoji klinicky manifestního onemocnění však dochází pouze u části infikovaných, zvláště pokud jsou jejich sliznice už poškozeny virovou infekcí (34).

Virulence kmene *H. influenzae* je podmíněna tvorbou pouzder (2), kdy neúčinnější jsou pouzdra s antigenem typu b, jež obsahují polysacharid. Proto jsou kmeny *H. influenzae* s pouzdrem typu b nejvíce virulentní, a jsou častými původci těžkých invazivních infekcí u dětí (34).

Neopouzdržené hemofily se u člověka považují za součást běžné flóry horního dýchacího traktu. Ukazuje se však, že i tyto formy se mohou uplatňovat u akutních a chronických bronchitid. Řada kmenových typů b uvolňuje proteázu, která štěpí IgA₁. Opouzdržené hemofily (a z nich především typ b) vyvolávají hnisavé sinusitidy, laryngotracheitidy, konjunktivitidy a otitidy. Vážnými onemocněními jsou hemofilová epiglottitis a obstrukční laryngitis. Hemofilové pneumonie se u dětí vyskytují jako komplikace virových onemocnění, především chřipky. Nejzávažnějším hemofilovým onemocněním v dětském věku je meningitis (2).

1.1.2.2 Patogenita

Haemophilus influenzae netvoří žádný exotoxin, a role toxických somatických antigenů u onemocnění není jasná. Neopouzdržené kmeny tvoří normální flóru respiračního traktu člověka, opouzdržené formy *H. influenzae*, zejména typ b, vyvolává hnisavé infekce respiračního traktu (sinusitidy, laryngitidy, otitidy, epiglottitidy, a u malých dětí zejména meningitidy) (15).

Sinusitis vzniká nejčastěji jako sekundární onemocnění, navazující na bakteriální záněty probíhající v blízkém okolí. Pravidelnou příčinou je rýma, při které dochází k přímému přestupu infekčního agens do přilehlých dutin. Zánět je nejčastěji lokalizován

v čelistních dutinách a v čichových sklípcích, pak v dutinách čelních a kosti klínové. Průběh může být akutní nebo chronický (26).

Laryngitis může probíhat buď jako samostatné onemocnění nebo jako součást rozsáhlejšího postižení dýchacích cest. Nejčastěji je pokračováním infekce HDC. *Haemophilus influenzae* je častou příčinou tohoto onemocnění zejména u dětí předškolního věku.

Vzhledem k možnosti přestupu infekce horních dýchacích cest do středoušní dutiny Eustachovou trubicí, je otitis media obávanou komplikací rhinitid a rhinopharyngitid, a to především u kojenců a malých dětí. Průnik bakterií do středouší často usnadňuje předchozí virová infekce HDC (26).

Akutní epiglottitida je infekce způsobená *H. influenzae* typu b, při níž epiglottis a okolní tkáň mohou uzavřít dýchací cesty. Projeví se systémovou infekcí s příznaky zvýšené obtížnosti v dýchání. Začíná náhle, s horečkou, bolestí v krku, chrapotem a rychlou progresí k vážnému vyčerpání během 24 hodin (30). Epiglottitida se vyskytuje hlavně u dětí ve věku kolem 5 let, může mít velmi rychlý průběh a být smrtelná.

Nejzávažnějším onemocněním je ovšem hemofilová meningitida, kterou jsou ohroženy hlavně děti ve věku zhruba 1 až 4 roky, u nichž jsou hemofily původcem meningitid v 70 % případů (17).

Tab. 3. Etiologie akutních bakteriálních meningitid dle věku (v %), stupeň letality a časnost neurologických následků

věk	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	ostatní	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
0-1 měs.	49	5	< 1	33	3	9
1-4 roky	2	70	13	6	9	< 1
5-29 let	< 1	8	43	28	18	2
průměr	5	45	14	15	18	3
letalita	+	+	+	+	+++	+++
následky	+	+++	+	++	++	++

Zdroj: (36)

Do centrálního nervového systému bakterie pronikají přes epitel nasopharyngu a krevní a lymfatický systém. Bez léčby (adekvátní terapie) je onemocnění téměř vždy smrtelné, smrti nebo trvalému poškození však někdy nezabrání ani včasná a vhodná terapie (17).

Meningitidy vyvolané hemofily (a jinými kmeny, kromě *Neisseria meningitidis*) jsou vlastně komplikace jiného onemocnění: zánětu středního ucha, vedlejších dutin nosních či onemocnění dýchacích cest a plic. Nemocní si stěžují na stále úpornější bolesti hlavy, opakovaně zvrací, mívají vysokou horečku a brzy můžeme zpozorovat poruchy vědomí. Není-li nemocný léčen, upadá do bezvědomí a během několika dní často umírá (29).

1.1.3 Diagnostika

K rychlé předběžné diagnóze se provádí mikroskopické vyšetření nátěru odebraného vzorku, obarveného podle Grama - mozkomíšního moku, hnisu, sputa, aspirátu, z kloubní

dutiny, ze středouší nebo z paranazálních dutin.

Po odběru, *Haemophilus influenzae* rychle hyne, zejména při vyschnutí a teplotě 4 °C i nižší. Odebraný vzorek se musí dopravit do laboratoře na tamponu ponořeném ve vhodné transportní půdě a neprodleně naočkovat na vhodnou kultivační půdu. Pro kultivaci je nejvhodnější čokoládový agar. Plotny se inkubují za anaerobních podmínek v atmosféře obsahující 5-10 % CO₂ (8).

V transportních půdách vydrží až 24 hodin, ale čím kratší je interval mezi odběrem a zpracováním, tím je vyšší záchytnost.

Nejčastějšími materiály pro odběr u dětí je výtěr z krku, nasofaryngeální výtěr, sputum a u meningitid likvor.

Pro izolaci se používá obvykle čokoládový agar nebo jiné půdy (KA) s obsahem růstových faktorů, případně se využívá satelitový fenomén, schopnost hemofilů růst na krevním agaru v okolí kolonií *Staphylococcus aureus* (viz obr. 11) (34). Vhodné je také použití selektivních půd s vybranými antibiotiky pro potlačení ostatní flóry.

Na vhodných kultivačních médiích obsahujících faktory X a V vyrůstají hemofily do 24 až 48 hodin. Pro druhotné rozlišení hemofilů se rutinně užívá papírových disků, které jsou napuštěny růstovými faktory X, V a X + V. Disky se kladou na naočkované půdy, které neobsahují ani hemin ani NAD. Typizace zachyceného kmene se provádí latexovou aglutinací, testem bobtnání pouzdra a imunofluorescencí (2).

1.2 Beta-laktamázy

Haemophilus influenzae je bakterie, která může produkovat β-laktamázy. Tyto enzymy kromě hemofila produkují i jiné bakterie, jejichž produkce, pokud jsou bakterie ve své blízkosti, se může navzájem různě ovlivňovat. Pro průkaz β-laktamáz je proto důležité odlišení těchto jednotlivých bakterií od sebe. V dutině ústní a horních cestách dýchacích jsou důležité β-laktamázy, které rozkládají penicilin G a V, a dále ampicilin/amoxicilin. Přítomnost β-laktamáz je proto nutné při terapii brát v úvahu.

1.2.1 Definice a význam

Beta-laktamázy (penicilinázy) byly poprvé izolovány v materiálu s bakterií *Escherichia coli* v roce 1940 (32). Dnes existuje již víc jak 340 samostatných β -laktamáz, které byly identifikovány (6). Jedná se o nejdůležitější druh enzymů, které jsou nejrozšířenějším mechanismem rezistence k β -laktamovým antibiotikům, jako jsou peniciliny a cefalosporiny (14). Tyto enzymy rozštěpí choulostivý beta-laktamový kruh, čímž antibiotikum ztratí antimikrobiální účinnost (35).

Rezistence bakterií mezi β -laktamovými antibiotiky a inhibitory β -laktamáz, je stále větším problémem, často se vyskytujícím, který ohrožuje klinickou úspěšnost léčiv, jež tvoří dnešní základ pro terapii bakteriálních onemocnění (13). Beta-laktamázy jsou produkovány jak grampozitivními tak gramnegativními bakteriemi, ale jejich klinický význam je mnohem větší u gramnegativních výsledků (28). Jelikož u gramnegativních patogenů jsou β -laktamázy hlavním mechanismem zapojených do rezistence vůči β -laktamovým antibiotikům.

Dnes jsou β -laktamázy, podle jejich primární struktury, popsány ve čtyřech třídách: A, B, C a D. Třídy A, C a D jsou enzymy se složkou serinu ve svém aktivním centru, zatímco struktura enzymů třídy B je tvořena kofaktorem, kterým je kov (25).

Největší klinický význam mají Ambler třídy C enzymů, a rostoucí význam Ambler třídy B metalo beta-laktamáz (MBLs), jež jsou dnes velkou hrozbou pro kliniku z důvodu jejich širokého specifického substrátu (28).

Nicméně vznikly také nové třídy β -laktamáz tzv. enzymy rozšířeného spektra beta-laktamázy (ESBL), které byly poprvé objeveny v Evropě na počátku roku 1980 (23), a jejich četné a neustálé mutace vedly k vývoji enzymů s rozšířeným profilem substrátu. K dnešnímu dni existuje těchto enzymů s rozšířeným profilem, více než 130 TEM typů a více než 50 SHV typů β -laktamáz, které můžeme nalézt v produkci gramnegativních bakterií (9). Tyto enzymy jsou nejvážnější z novějších β -laktamáz, a obsahují enzymy v každé ze čtyř skupin uvedených výše. V důsledku schopnosti plazmidů, nadále získávají

tyto enzymy rozšířeného spektra další faktory, které mají vliv na rezistenci antibiotik a stávají se vůči lékům multi-rezistentní. V kombinaci se sníženou propustností se mohou organismy stát prakticky neléčitelnými současnou terapií (5).

1.3 Streptokoky

Streptokoky jsou fakultativně anaerobní grampozitivní koky, rodu *Streptococcus*, které se řadí do dvojic až řetízků, a mohou být přítomny společně s hemofily v materiálu horních cest dýchacích.

Důležité jsou beta-hemolytické streptokoky především druh *Streptococcus pyogenes*, způsobující časté hnisavé onemocnění akutní tonsilofaryngitidu (anginu), kde se předpokládá, že podaná β -laktamová antibiotika (peniciliny) byla rozložena v tonsilách přítomnými mikroorganismy produkujícími β -laktamázu, např. *H. influenzae* (34). Z toho vyplývá, že pokud se v tonsilách vyskytuje společně *S. pyogenes* s bakterií produkující β -laktamázu může být ovlivněn účinek těchto antibiotik, které se stanou neúčinnými, proto se zde také musí brát při volbě léčiv ohled na přítomnost producentů β -laktamáz.

1.4 Terapie

Haemophilus influenzae je citlivý k řadě antibiotik. K terapii se používají především beta-laktamová antibiotika (ampicilin/amoxicilin, cefalosporiny 2. generace).

Ve většině případů dochází k rezistenci vůči beta-laktamovým antibiotikům, což bývá způsobeno produkcí β -laktamáz těmito hemofily (22). V současné době 40-55 % *Haemophilus influenzae* jsou rezistentní vůči penicilinu (4). Kromě těchto ATB se dnes využívá k terapii zejména kombinace aminopenicilinů a inhibitorů β -laktamáz např. kyselina klavulanová/amoxicilin (př. augmentin) (16).

Velký význam pro terapii mají i alergie na β -laktamová antibiotika, zejména

na peniciliny, které bývají často hlášeny. Je potvrzeno asi 1-10 % případů alergií na tyto léky (19). Ve skutečnosti se většinou jedná o nesnášenlivost β -laktamů. Často pomůže (a je to uvedeno na příbalových letácích) polknout před podáním antibiotika sousto jídla. V případě alergií se podávají nejčastěji makrolidy, jejichž nevýhodou je častý vznik rezistence.

1.4.1 Beta-laktamy

Mezi nejdůležitější léky používané v boji proti bakteriální infekci patří beta-laktamová antibiotika (beta-laktamy), které jsou považovány za nejúspěšnější antimikrobiální látky od počátku éry ATB (25). Beta-laktamová antibiotika obsahují tzv. β -laktamový kruh, členěnou strukturu ze tří atomů uhlíku a jednoho atomu dusíku. Různé typy beta-laktamů se liší složením dalšího kruhu připojeného na cyklus β -laktamový, například u penicilinů jde o pětičlenný kruh s atomem síry (35).

Působení beta-laktamů v bakteriální buňce je dáno jejich vazbou na enzymy (acyl-enzymový komplex), rovněž označované jako proteiny vázající penicilin (PBP), které se podílejí na tvorbě peptidoglykanu, základní složky jejich buněčné stěny. Touto vazbou dojde v rostoucí bakterii k zastavení (inhibici) tvorby peptidoglykanové vrstvy, a k uvolnění autolytických enzymů, které rozvolní buněčnou stěnu bakterie. Výsledkem je rozpad bakteriální buňky (35).

Beta-laktamy jsou tvořeny dvěma základními antibiotiky, a to peniciliny a cefalosporiny, které patří mezi nejstarší známá antibiotika, používaných proti bakteriálním infekcím. Bohužel, dnes je účinnost těchto léků stále více zpochybňována vznikem rezistentních bakterií, což je hlavně kvůli jejich produkci β -laktamáz, které způsobují u těchto antibiotik jejich neúčinnost v terapii (viz 1.2 Beta-laktamázy) (11).

1.4.1.1 Peniciliny

Peniciliny jsou vysoce účinná antibiotika s extrémně nízkou toxicitou. Získávají se z kultury plísně *Penicillium chrysogenum* a dalších, které produkují kyselinu 6-aminopenicilinovou. V její molekule je β -laktamový kruh konjugován s pětičlenným kruhem thiazolidinovým (35).

Mezi základní peniciliny patří hlavně penicilin G (*benzylpenicilin*), penicilin V (*phenoxymethylpenicilin*), nejdůležitější širokospektré peniciliny jsou ampicilin a amoxicilin. Tyto typy penicilinů se využívají k terapii nejvíce (16) a jsou léky první volby v terapii streptokokových onemocnění.

Ze základních penicilinů je na prvním místě penicilin G, který je ve formě sodné nebo draselné soli aplikován do svalu nebo nitrožilně, má relativně úzké spektrum účinku, je baktericidní, netoxický. Penicilin V je u nás ve formě sirupu nebo tablet a hodí se k terapii lehčích infekcí. Je vhodný pro ambulantní léčbu. Orálně se aplikuje každé 4-5 hodin.

Z širokospektrých penicilinů je dodnes nejužívanější ampicilin, který má původní silnou účinnost penicilinu G proti grampozitivním kokům, ale působí dobře i na řadu gramnegativních bakterií. Lze jej podávat perorálně, v tomto případě se ale vstřebává hůř, proto se dává přednost amoxicilinu před ampicilinem, ale i parenterálně, kdy se podává 0,5-1,5 gramu třikrát až čtyřikrát denně (12). Je vhodným lékem u lehčích gramnegativních a smíšených infekcí, např. u otitid, bronchitid, epiglottitid nebo i u meningitid.

Modernějším derivátem ampicilinu je amoxicilin s podobným spektrem a indikacemi (10). Pro svou dobrou biologickou dostupnost se podává prakticky jen perorálně. Používá se při infekcích horních a dolních cest dýchacích, u akutních sinusitid, zánětů středního ucha a u infekcí močových cest (35). Amoxicilin se podává po 8 hodinách (10).

Jak ampicilin tak amoxicilin mohou vyvolávat alergické reakce u léčených osob včetně dětí.

Kromě těchto druhů penicilinů se dnes používají, zejména při průkazu producentů β -laktamáz, kombinace amoxicilinu s inhibitory β -laktamáz tzv. potencované amino-peniciliny (amoxicilin/kyselina klavulanová – co-amoxicilin, ampicilin/sulbaktam) (35).

1.4.1.2 Cefalosporiny

Základem cefalosporinových antibiotik je kyselina 7-aminocefalosporinová, poprvé izolovaná z plísně rodu *Cephalosporium*. V její molekule je na β -laktamový kruh připojen šestičlenný dihydrothiazinový cyklus obsahující atom síry. Tato antibiotika účinkují stejně jako ostatní beta-laktamy: inhibují syntézu buněčné stěny a na množící se bakterie působí baktericidně. Podle spektra účinnosti, citlivosti vůči β -laktamázám a podle průniku buněčnou stěnou se rozdělují do čtyř generací (35).

Cefalosporiny první generace vstoupily na trh v roce 1964. Druhá a třetí generace cefalosporinů byla rozvinuta později, jsou výkonnější než první generace. Čtvrtá generace cefalosporinů je skupina vysoce účinných cefalosporinů, používaná především k terapii sepsí a celkových onemocnění, způsobených *Pseudomonas aeruginosa*, a používá se tedy převážně při hospitalizaci. Každá novější generace cefalosporinů má větší gramnegativní antimikrobiální vlastnosti než předchozí generace, naopak starší generace má větší grampozitivní pokrytí (vysoká účinnost na G + bakterie) (1).

Pro terapii hemofilových infekcí se používají cefalosporiny 2. generace, které působí na většinu bakteriálních patogenů dýchacích cest a mají vyšší rezistenci k β -laktamázám.

2. Cíl práce a hypotézy

2.1 Cíl práce

Haemophilus influenzae a mnohé další bakterie, které se za fyziologických podmínek vyskytují v horních cestách dýchacích, zejména u dětí, se mohou vyznačovat svou produkcí β -laktamáz, jejichž přítomnost v HDC je důležitá pro správné určení antimikrobiální terapie. To znamená, že praktičtí lékaři pro děti a dorost by měli brát v úvahu nejen citlivost na antibiotika a předpokládané bakteriální agens, ale též možnost ovlivnění terapie producenty β -laktamáz.

Cílem této práce je zjistit jak často hemofily produkují β -laktamázu u dětí, ze shromážděných dat, ve spolupráci s mikrobiologickou laboratoří Laboma s.r.o., a osvojit si metodu pro průkaz beta-laktamázové aktivity z jednotlivých narostlých kolonií hemofilů. Dále zjistím, zda jsou častějšími producenty β -laktamáz jiní hemofilové (*Haemophilus species*) než *Haemophilus influenzae* a získané výsledky následně zpracuji statisticky. Protože mě zajímalo, jaká antibiotika první volby volí praktičtí lékaři pro děti a dorost u onemocnění HDC, a zda berou při volbě antibiotik ohled na přítomnost β -laktamáz, rozhodla jsem se zjistit tyto informace pomocí dotazníku.

Základní cíle této bakalářské práce bych mohla tedy shrnout do několika bodů:

1. zjistit, jak často produkují hemofily β -laktamázu u dětí
2. naučit se ovládat uvedenou metodu v rámci laboratorní praxe
3. zjistit, zda častějšími producenty β -laktamáz nejsou jiní hemofilové než *H. influenzae*
4. pomocí dotazníku, zjistit zda lékaři berou ohled na přítomnost β -laktamáz při volbě antibiotik v terapii

2.2 Hypotézy

Hypotéza 1:

Hemofily přítomné v materiálu dýchacích cest produkují z 50 % β -laktamázu.

Hypotéza 2:

Častějším producentem β -laktamáz v dýchacích cestách jsou ostatní hemofily (*Haemophilus species*) než *Haemophilus influenzae*.

Hypotéza 3:

Při terapii berou ošetřující praktičtí lékaři skutečnost, že v materiálu je přítomen producent β -laktamázy v úvahu při volbě antibiotik.

3. Metodika

3.1 Charakteristika souboru

Data pro svou bakalářskou práci jsem získala z databáze mikrobiologické laboratoře Laboma s.r.o., která sídlí v Českých Budějovicích. Veškeré informace o pacientech jsou vázány povinnou mlčenlivostí, proto jsou zmiňovány anonymně. Materiál pro mikrobiologické vyšetření sem přichází zejména od praktických lékařů z jižních Čech.

Data jsem sbírala v období od července do prosince roku 2008 a v období od ledna do června roku 2009. Zaměřila jsem se na dětskou populaci, jak už napovídá téma mé bakalářské práce, ve věku do 15 let. Odebraným materiálem u dětí je zejména materiál z HDC (nasopharyngeální a krční výtěry). Do souboru dat jsem zahrнула děti s výtěrem, u kterého byla určena tato čísla diagnóz: J03.9 (akutní tonzilitida NS), J03.8 (akutní tonzilitida způsobená jinými určenými organizmy), J03.0 (streptokoková tonzilitida), J02.9 (akutní zánět hltanu NS), J02.8 (akutní zánět hltanu způsobený jinými urč. org.), J02.0 (streptokokový zánět hltanu), J00. (akutní zánět nosohltanu), J01.9 (akutní zánět vedlejších nosních dutin NS), J04.0 (akutní zánět hrtanu), J06.0 (akutní zánět hltanu a hrtanu), J04.1 (akutní zánět průdušnice), J20.9 (akutní bronchitida), J06.9 (akutní infekce HCD NS), J06.8 (jiné akutní infekce HCD na více místech), H68.1 (obstrukce Eustachovy trubice), H66.9 (zánět středního ucha NS), H65.0 (akutní zánět středního ucha), R05 (kašel), J11.1 (chřipka s jinými projevy na dýchacích cestách), R50.9 (horečka NS). Podle těchto dat jsem vybírala pacienty (děti) a následně zpracovala potřebná data statisticky ve výsledcích, za již zmíněné období.

Průběh léčby a postup, pokud je v materiálu přítomen producent β -laktamázy, jsem zjišťovala pomocí dotazníku, se kterým jsem navštívila praktické lékaře pro děti a dorost ve spolupráci s laboratoří Laboma s.r.o.

3.2. Stanovení beta-laktamázové aktivity

Stanovení β -laktamáz je důležité dnes pro správné určení antibiotik, k použití proti jednotlivým onemocněním, způsobovaných kmenem *Haemophilus influenzae* ale i jinými bakteriemi.

Pokud by lékař podal dítěti antibiotikum, zejména beta-laktamy, proti bakterii tvořící β -laktamázu v HDC, mohlo by dojít k tomu, že použité antibiotikum ztratí svou účinnost, což je způsobeno rozštěpením β -laktamového kruhu antibiotika, působením β -laktamázy. Proto v některých případech onemocnění nestačí zjistit jen citlivost na antibiotika a předpokládané agens, ale měla by se stanovit i přítomnost beta-laktamáz, nejčastěji pomocí jednoduchého testu β -LACTAstrip (viz obr. 12), který jsem si v průběhu své laboratorní praxe, v laboratoři Laboma s.r.o., osvojila a několikrát provedla.

3.2.1 Diagnostický test β -LACTAstrip

β -LACTAstrip je rychlý, proužkový diagnostický test, β -laktamázové aktivity mikroorganismů. Principem testu je hydrolyza β -laktamového kruhu benzylpenicilinu za vzniku kyseliny penicilinové. Tím dojde k okyselení bakteriální suspenze a změně zbarvení acidobazického indikátoru. Acidobazický test β -laktamázové aktivity je vhodný pro *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* a *Staphylococcus* spp. Výsledná reakce se odečítá za 2-10 minut.

Test obsahuje plastové proužky s instalovanou funkční zónou, která je nasycena benzylpenicilinem a acidobazickým indikátorem a je červená. Detekční zóna slouží jako reakční ploška pro kolonie setřené z kultivační misky. Je zde také zvlhčovací roztok, který obsahuje pH indikátor - pH 7,5 - 7,6 (31).

Potřebný materiál, tubu s diagnostickými proužky i zvlhčovací roztok, pro provedení průkazu β -laktamázové aktivity, najdeme v ledničce, ze které je vyndáme a necháme chvíli stát při laboratorní teplotě na stole. Připravíme si naočkovanou plotnu

s koloniemi *H. influenzae*. Tubu otevřeme a vyndáme z ní diagnostický proužek, který navlhčíme zvlhčovacím roztokem několika kapkami pomocí jednorázového kapátka tak, aby byl celý vlhký.

Otevřeme si naočkovanou půdu a připravenou navlhčenou zónou indikátorového papírku setřeme z kultivační misky několik kolonií hemofila. Plotnu pak zavřeme a testovaný proužek si na ní položíme (aby bylo jasné ke kterému číslu vzorku plotna patří, pokud provádíme více testů na β -laktamázovou aktivitu najednou) a necháme 2-10 minut takto ležet. Po uplynutí této doby se podíváme na proužek, a můžeme z něj odečíst zda hemofil, ze kterého jsme získali kolonie, je producentem β -laktamázy nebo není.

Pokud je zóna na diagnostickém proužku červená, nedošlo ke změně barvy proužku, je test negativní. V pozitivním případě zóna na proužku zežloutne (žlutě-oranžová skvrna) to znamená, že testovaný hemofil je producentem β -laktamázy (viz obr. 13).

Tento test nemusí být vždy jednoznačný, proto když si nejsme jisti provedeme jej ještě jednou.

3.3. Dotazník

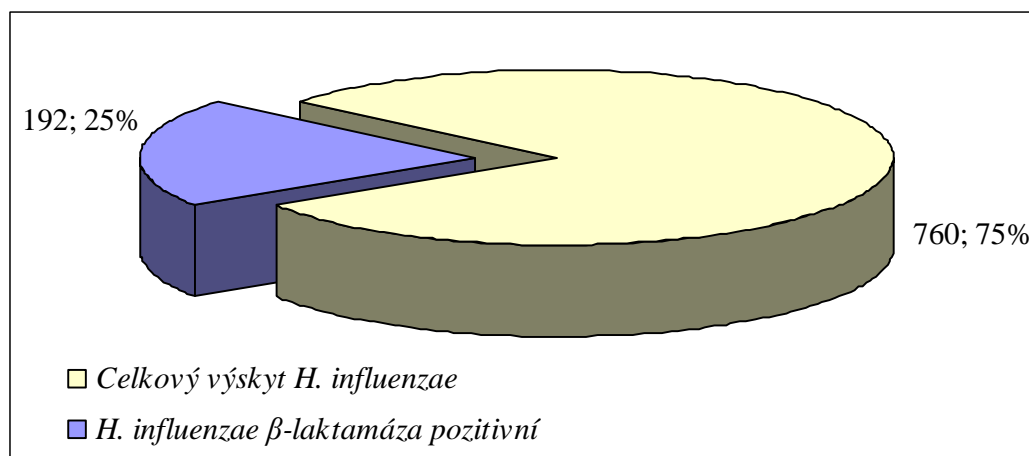
Navštívila jsem 10 praktických lékařů pro děti a dorost, ve spolupráci mikrobiologické soukromé laboratoře Laboma s.r.o., kteří byli ochotni odpovědět na otázky mého dotazníku, které zní:

1. Které antibiotikum volíte jako antibiotikum první volby, když nemáte mikrobiologický nález?
2. Kterým antibiotikům dáváte přednost při pozitivním průkazu β -hemolytických streptokoků?
3. Berete v úvahu při volbě antibiotik, že je v materiálu přítomen producent β -laktamázy?
4. Jakým způsobem postupujete, pokud je v nálezu prokázán hemofilus tvořící β -laktamázu? A jaké antibiotikum podáváte pak nejčastěji?

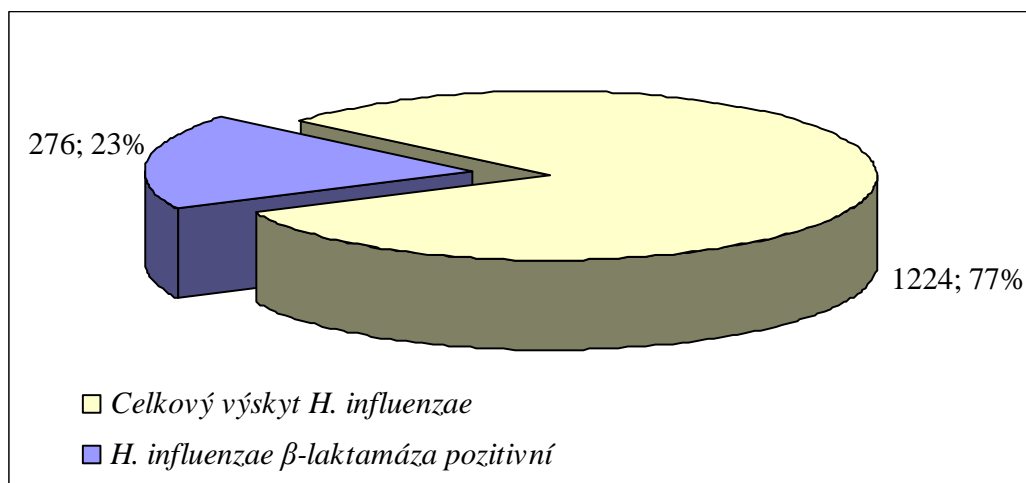
4. Výsledky

4.1 Výskyt hemofilů produkujících β -laktamázy u dětí během druhého pololetí roku 2008 a prvního pololetí roku 2009

4.1.1 Celkový výskyt β -laktamázy pozitivní bakterie *Haemophilus influenzae* u dětí za druhé pololetí roku 2008 a první pololetí roku 2009 v laboratoři Laboma s.r.o. v Českých Budějovicích

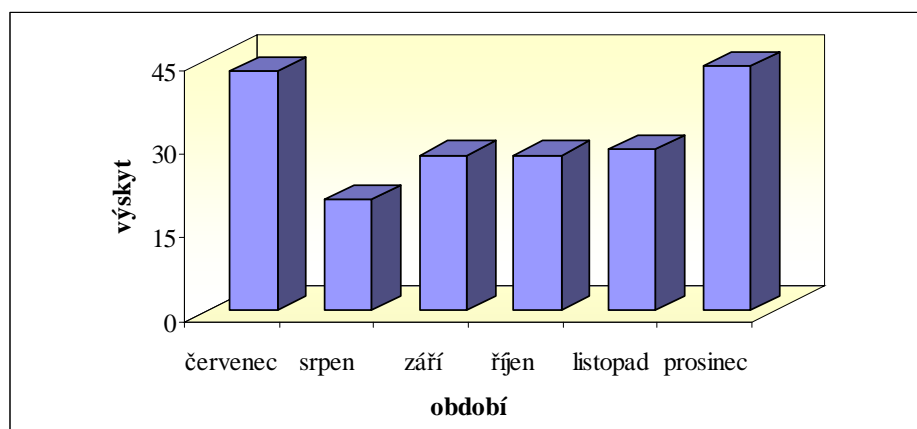


Obr. 1. Celkový výskyt β -laktamázy pozitivního *H. influenzae* v horních cestách dýchacích u dětí za druhé pololetí roku 2008

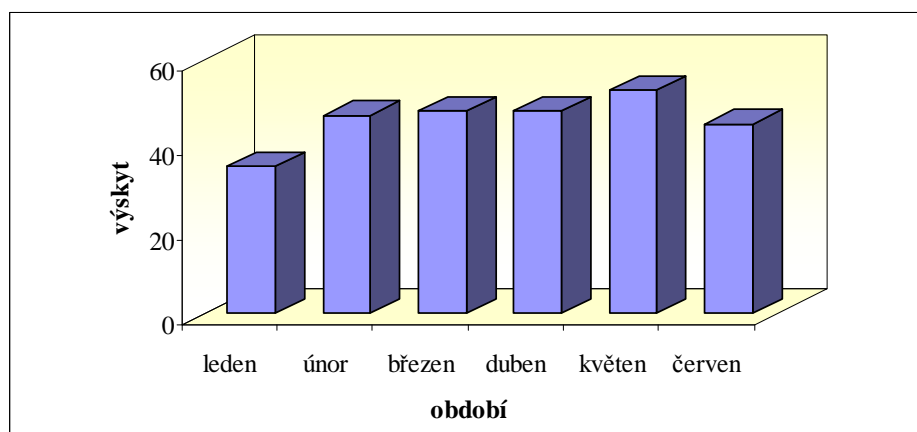


Obr. 2. Celkový výskyt β-laktamázy pozitivního *H. influenzae* v horních cestách dýchacích u dětí za první pololetí roku 2009

Z těchto obrázků vyplývá, že celkový výskyt *H. influenzae* v materiálu horních cest dýchacích, odebraného u dětí a zaslaného do laboratoře Laboma s.r.o., bylo za druhé pololetí roku 2008 celkem 760, z nichž 192 β-laktamáza pozitivních vzorků, a za druhé pololetí roku 2009 jich bylo celkem 1224 s 276 vzorky β-laktamáza pozitivních *H. influenzae*. Byl prokázán vyšší výskyt jak počtu nemocných dětí s *H. influenzae*, tak β-laktamázy pozitivních vzorků za první pololetí roku 2009.



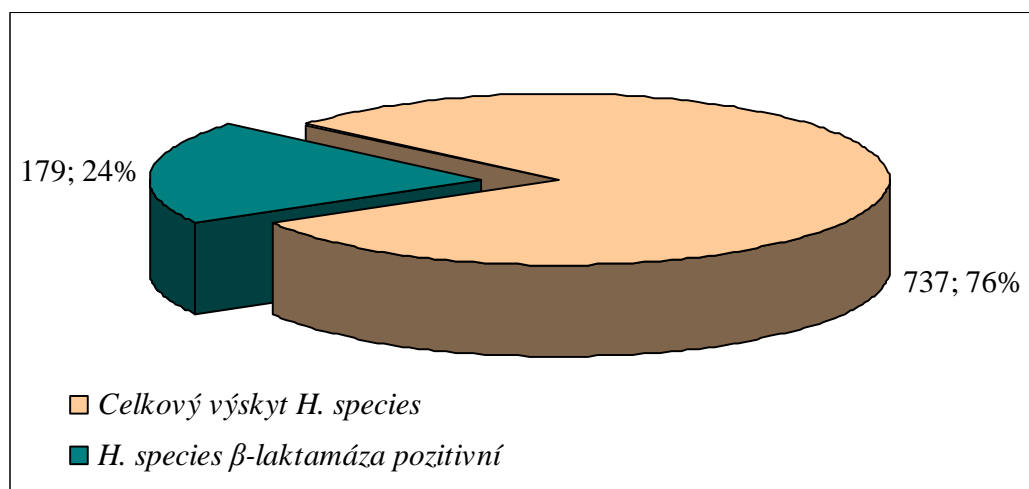
Obr. 3. Výskyt β -laktamázy pozitivního *H. influenzae* u dětí za druhé pololetí roku 2008



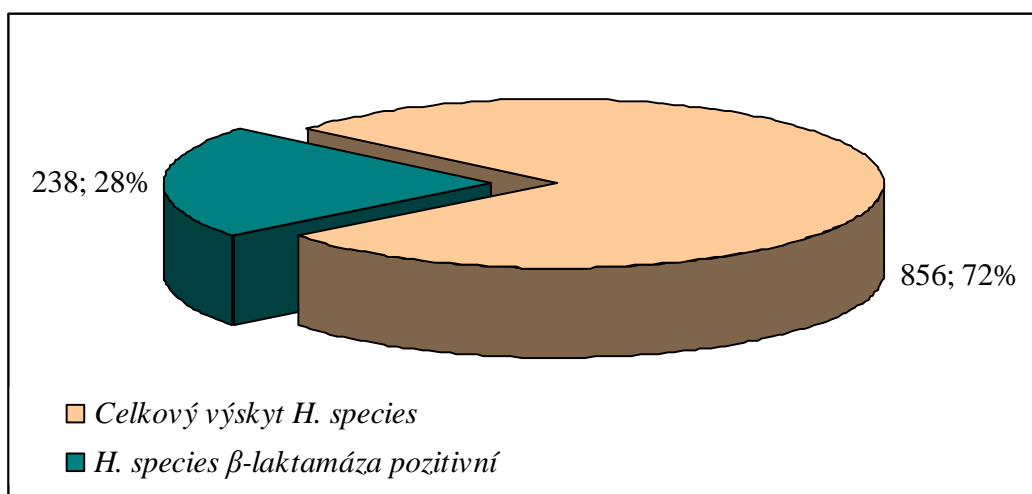
Obr. 4. Výskyt β -laktamázy pozitivního *H. influenzae* u dětí za první pololetí roku 2009

Tyto obrázky znázorňují, že během druhého pololetí roku 2008 výskyt β -laktamázy pozitivního *H. influenzae* u dětí byl nejvyšší v prosinci a to v počtu 44 případů ze 192 (22,9%), a během prvního pololetí roku 2009 byl výskyt nejvyšší v květnu s 53 případy z 276 (19,2%).

4.1.2 Celkový výskyt β -laktamázy pozitivní bakterie *Haemophilus species* u dětí za druhé pololetí roku 2008 a první pololetí roku 2009 v laboratoři Laboma s.r.o. v Českých Budějovicích

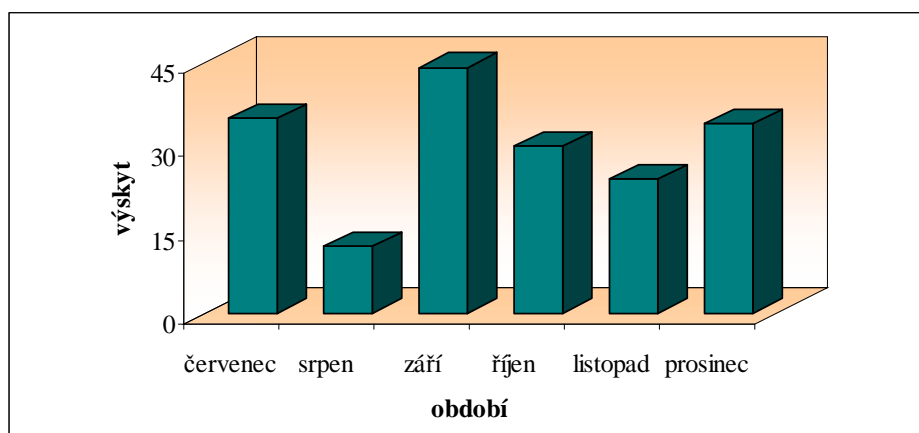


Obr. 5. Celkový výskyt β -laktamázy pozitivního *H. species* v horních cestách dýchacích u dětí za druhé pololetí roku 2008

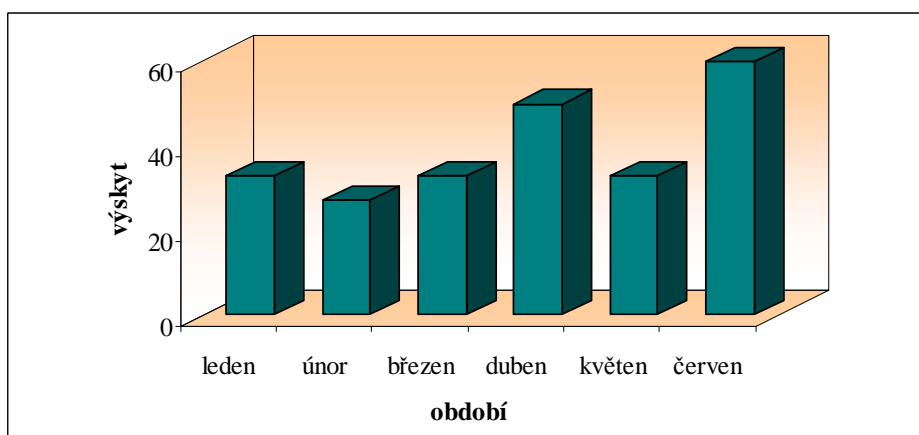


Obr. 6. Celkový výskyt β -laktamázy pozitivního *H. species* v horních cestách dýchacích u dětí za první pololetí roku 2009

Tyto obrázky znázorňují celkový výskyt *H. species* v materiálu horních cest dýchacích, odebraného u dětí a zaslánoho do laboratoře Laboma s.r.o., kdy jich za druhé pololetí roku 2008 bylo celkem 737, z nichž 179 β -laktamáza pozitivních vzorků a za druhé pololetí roku 2009, jich bylo celkem 856 s 238 vzorky β -laktamáza pozitivních *H. species*. Je tedy vyšší výskyt počtu nemocných dětí s *H. species* a β -laktamáza pozitivních vzorků za první pololetí roku 2009.



Obr.7. Výskyt β -laktamázy pozitivního *H. species* u dětí za druhé pololetí roku 2008



Obr. 8. Výskyt β -laktamázy pozitivního *H. species* u dětí za první pololetí roku 2009

Z těchto obrázků můžeme vyčíst, že během druhého pololetí roku 2008 výskyt β -laktamázy pozitivního *H. species* u dětí byl nejvyšší v září a to s počtem 44 případů ze 179 (25%), a během prvního pololetí roku 2009 byl výskyt nejvyšší v červnu s 62 případy z 238 (28%).

Tab. 4. Celkové shrnutí výskytu *H. influenzae* a *H. species* podle přítomnosti a nepřítomnosti β -laktamázy za druhé pololetí roku 2008 a první pololetí 2009

	β -Laktamáza	<i>H. influenzae</i>	<i>H. species</i>
2.pol. r. 2008	pozitivní	192 (25%)	179 (24%)
	negativní	568 (75%)	558 (76%)
	celkem	760	737
1.pol. r. 2009	pozitivní	276 (23%)	238 (28%)
	negativní	945 (77%)	618 (72%)
	celkem	1221	856

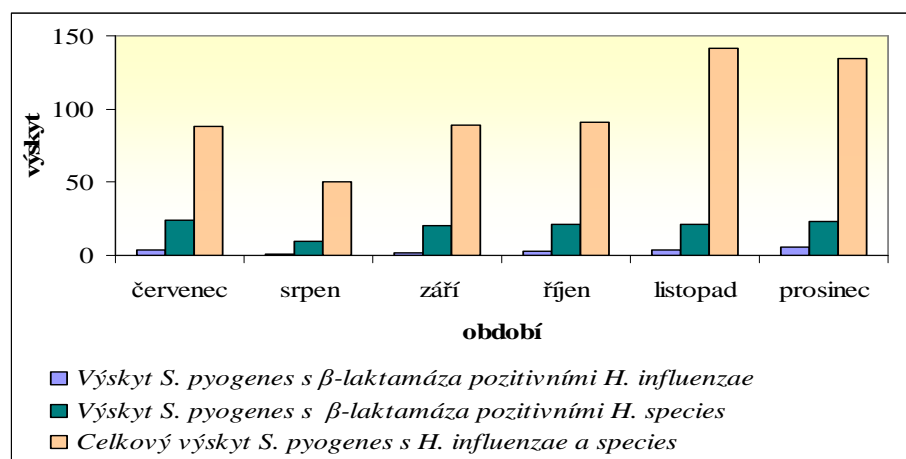
Údaje z tabulky vyznačují celkový počet *H. influenzae* a *H. species* v odebraném materiálu dětí v laboratoři Laboma s.r.o., β -laktamáza pozitivních i negativních, během druhého pololetí roku 2008 a prvního pololetí roku 2009, a jejich relativní četnosti v %.

Tab. 5. Celkový výskyt β -laktamáza pozitivních *H. influenzae* a *H. species* podle věku dítěte za druhé pololetí roku 2008 a první pololetí roku 2009 s relativními četnostmi v procentech

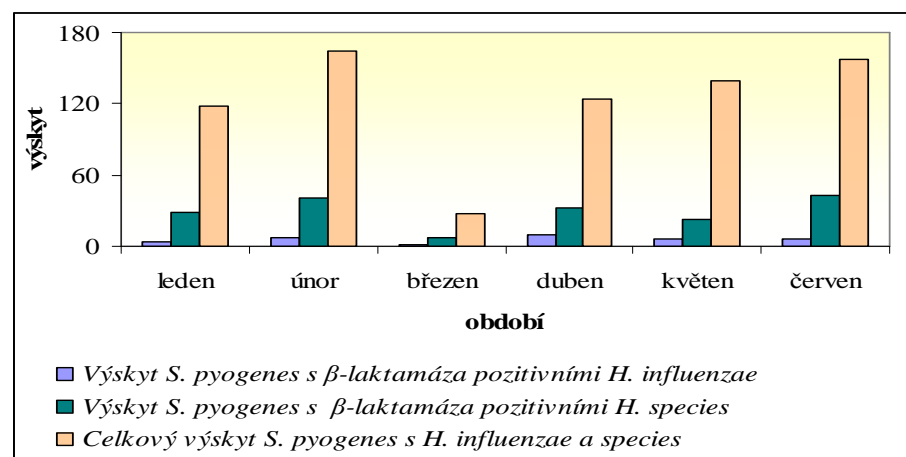
věk	2.pol. r. 2008		1.pol. r. 2009	
	četnost	četnost	četnost	četnost
	<i>H. influenzae</i>	<i>H. species</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>H. species</i>
15	2 (1%)	8 (4,5%)	13 (4,7%)	18 (7,6%)
14	3 (1,6%)	8 (4,5%)	5 (1,8%)	7 (2,9%)
13	4 (2,1%)	7 (3,9%)	9 (3,3%)	11 (4,6%)
12	8 (4,2%)	7 (3,9%)	11 (4%)	6 (2,5%)
11	5 (2,6%)	10 (5,6%)	14 (5,1%)	7 (2,9%)
10	4 (2,1%)	9 (5%)	11 (4%)	21 (8,8%)
9	6 (3,1%)	10 (5,6%)	28 (10,1%)	19 (8%)
8	15 (7,8%)	10 (5,6%)	26 (9,4%)	31 (13%)
7	22 (11,5%)	28 (15,6%)	23 (8,3%)	32 (13,4%)
6	29 (15,1%)	23 (12,8%)	24 (8,7%)	22 (9,2%)
5	22 (11,5%)	22 (12,3%)	46 (16,7%)	26 (10,9%)
4	29 (15,1%)	21 (11,7%)	22 (8%)	18 (7,6%)
3	20 (10,4%)	8 (4,5%)	10 (3,6%)	13 (5,5%)
2	6 (3,1%)	6 (3,4%)	16 (5,8%)	6 (2,5%)
1	12 (6,3%)	2 (1,1%)	17 (6,2%)	1 (0,4%)
< 1	5 (2,3%)	0	1 (0,4%)	0

Z této tabulky vyplývá, že nejčastěji postiženými dětmi β -laktamázu pozitivními *H. influenzae* jsou děti ve věku od 5 do 8 let a *H. species* děti od 4 do 7 let.

4.2 Celkový výskyt *Streptococcus pyogenes* v odebraném materiálu společně s β -laktamáza pozitivními hemofily (*H. influenzae a species*)



Obr. 9. Celkový výskyt *Sreptococcus pyogenes* v materiálu dýchacích cest u dětí společně s β -laktamáza pozitivními *H. influenzae a species* za druhé pololetí roku 2008



Obr. 10. Celkový výskyt *Sreptococcus pyogenes* v materiálu dýchacích cest u dětí společně s β -laktamáza pozitivními *H. influenzae a species* za první pololetí roku 2009

Na obrázcích je zobrazeno, jak častý je výskyt *S. pyogenes* společně s β -laktamáza pozitivními hemofily, v odebraném materiálu, za jednotlivá pololetí, kdy nejvyšší výskyt je s β -laktamáza pozitivním *H. influenzae* v dubnu roku 2009, a to s 9 případy ze 124 (7,3%) všech případů v tomto měsíci se *S. pyogenes*, a u β -laktamázy pozitivního *H. species* v červnu roku 2009 ve 43 případech ze 157 (27,4%) všech případů tohoto měsíce se *S. pyogenes*.

4.3 Výsledky získané dotazníkem

Otázka č.1

Které antibiotikum volíte jako antibiotikum první volby, když nemáte mikrobiologický nález?

Na tuto otázku z 10 lékařů odpovědělo 8, že volí antibiotikum podle klinického stavu nemocného dítěte, nikdy nelze říci které. Nejčastěji podávají v případě anginy peniciliny a u onemocnění dýchacích cest klaritromyciny (makrolidy) či co-aminopeniciliny (antibiotika s inhibítorem β -laktamáz). Další dva lékaři bez rozmýšlení uvedli peniciliny.

Otázka č. 2

Kterým antibiotikům dáváte přednost při pozitivním průkazu β -hemolytických streptokoků?

Všech 10 praktických lékařů odpovědělo jednoznačně penicilinům.

Otázka č. 3

Berete v úvahu při volbě antibiotik, že je v materiálu přítomen producent β -laktamázy?

Jednoznačnou odpovědí bylo od všech ANO.

Otázka č. 4

Jakým způsobem postupujete, pokud je v nálezů prokázán hemofilus tvořící β -laktamázu?
A jaké antibiotikum podáváte pak nejčastěji?

Na první z otázky odpověděli lékaři jednoznačně, že záleží na klinických obtížích nemocného dítěte a důležité jsou především výsledky z mikrobiologické laboratoře, laboratorního vyšetření hemofila na citlivost k jednotlivým antibiotikům, a ohledně tohoto výsledku pak podávají vhodné antibiotikum.

Na otázku jaká antibiotika lékaři podávají, pokud je v materiálu přítomen hemofilus tvořící β -laktamázu, byli jednotlivé odpovědi všech lékařů směřovány k tzv. potencovaným aminopenicilinům (amoxiciliny s inhibitory β -laktamáz - zejména augmentin).

5. Diskuze

Základním cílem mé práce bylo zjistit jak často produkují hemofily β -laktamázy u dětí, s předpokladem produkce tohoto enzymu z 50 % v materiálu dýchacích cest, s pomocí dat získaných v laboratoři Laboma s.r.o. Ze získaných výsledků, které jsem zpracovala do jednotlivých grafických obrázků (viz obr. 1., 2., 5., 6.) a shrnula do tabulky (viz tab. 4.), jsem prokázala, že v materiálu s obsahem *H. influenzae*, za druhé pololetí roku 2008 a první pololetí 2009, byla produkce β -laktamázy v průměru 24% a u materiálu s *H. species*, za tato období, byla v průměru 26%, tedy obecně hemofily produkují dohromady v průměru 46 % β -laktamázy, čímž jsem předpoklad 50% produkce nepotvrdila, v mém případě je produkce β -laktamáz u hemofilů nižší o 4 %. Produkce hemofilů se pohybuje kolem 40 %, jak naznačuje studie, při níž byla stanovena produkce β -laktamáz z krčního materiálu dětí, kdy ze 154 hemofilových izolovaných kmenů bylo 42 (*H.influenzae*, 27%) a 20 (*H. species*, 13%) izolátů β -laktamáza pozitivních (33). Tudíž můj výsledek 46% produkce β -laktamázy je vůči výsledku této studie poměrně vysoký, což může být dané rozdílem oblastí ze kterých byl získán materiál k β -laktamázovému vyšetření.

Zato v produkci u jednotlivých druhů hemofilů bývají patrné rozdíly. Ve většině zemí se produkce β -laktamázy u *H. influenzae* pohybuje v rozmezí od 5 do 30 % ale v některých oblastech může překročit 60% produkci. Nicméně, jsou údaje o tom, že produkce β -laktamáz u *H. species* bývá vyšší než u *H. influenzae* (22). Z mých výsledků porovnáním produkcí β -laktamáz u *H. influenzae* (24%) a *species* (26%) jsem zjistila, že se produkce liší ve 2 %, kdy vyššími producenty jsou *H. species*, tudíž jsem dokázala potvrdit druhou hypotézu, že jsou častějšími producenty ostatní hemofily než *H. influenzae*.

Podle mých výsledků z grafických obrázků (viz obr. 3., 4., 7. a 8.) jsem zjistila, že v získaném materiálu dýchacích cest dětí z laboratoře Laboma s. r. o., byl za jednotlivá stanovená období (2.pol. 2008 a 1.pol. 2009) nejvyšší výskyt β -laktamázy pozitivních *H. influenzae* v prosinci s 44 případy ze 192 (22,9%) vzorků a u β -laktamázy pozitivních

H. species v červnu s 62 případy z 238 (28%). Vysoký výskyt hemofilů v jednotlivých měsících, zejména v zimních, můžeme přičíst oslabenému organismu jinou infekcí či přítomností jiných patogenů (*Streptococcus*, *Moraxella*) v horních cestách dýchacích společně s hemofily produkujícími β -laktamázy (18). V případě onemocnění způsobených druhem *Streptococcus*, přítomnost β -laktamáz produkovaných jmenovanými rody bakterií, mohou negativně ovlivnit terapii streptokokového onemocnění.

Podle mých výsledků v grafických obrázcích (viz obr. 9. a 10.) je během období, mých získaných dat (2.pol. 2008 a 1.pol. 2009) z laboratoře, nejvyšší výskyt *S. pyogenes* s β -laktamázy pozitivními *H. influenzae* v dubnu s 9 případy z 124 (7,3%) všech případů v tomto měsíci a u β -laktamázy pozitivního *H. species* v červnu v 43 případech ze 157 (27,4%) případů tohoto měsíce. Proto se předpokládá že podaná β -laktamová antibiotika (peniciliny), v případě streptokokového onemocnění (angina), rozložily v tonsilách přítomné mikroorganismy produkující β -laktamázu (34). Z čehož vyplývá, že musí být také v případě *S. pyogenes* kultivačně zjištěn i možný výskyt hemofilů, či jiných bakterií produkujících β -laktamázy pro správné podání β -laktamů.

Z materiálu dýchacích cest u dětí, jež jsem získala z dat databáze v laboratoři Laboma s.r.o., jsem zjistila, že β -laktamáza pozitivními hemofily jsou nejčastěji postiženy děti ve věku od 4 do 8 let (viz tab. 5.). Nejvyšší výskyt těchto hemofilů v dýchacích cestách, které mohou způsobit onemocnění, je u zdravých dětí ve věku 3-6 let, kdy dochází s postupujícím věkem k pomalému snížení kolonizace těmito bakteriemi, jak naznačuje studie, ve které byly takto staré zdravé děti vyšetřeny, kdy z 425 dětí v materiálu byla celková přeprava patogenů 62,8%, z toho 38,1 % *H. influenzae* z nichž 4,6 % β -laktamáza pozitivních (38).

Protože mě zajímalo, zda při terapii berou ošetřující praktičtí lékaři v úvahu skutečnost, že v materiálu je přítomen producent β -laktamázy, při volbě antibiotik, zjistila jsem tuto informaci pomocí dotazníku, ve kterém jsem se ptala 10 praktických lékařů na několik otázek (viz 4.3 Výsledky získané dotazníkem), z nichž jsem nabyla dojmu, že lékaři přihlížejí při volbě β -laktamových antibiotik ke klinickému stavu dítěte, k výsledkům

citlivosti na antibiotika pro daný hemofil a k produkci β -laktamáz, z odebraného materiálu dítěte, získaných kultivací a testem β -LACTAstrip v mikrobiologické laboratoři.

6. Závěr

Cílem této práce bylo shromáždit a vyhodnotit veškerá data o β -laktamáza pozitivních hemofilech, převážně z materiálu horních cest dýchacích u dětí, od narození po 15 let, během druhého pololetí roku 2008 a prvního pololetí roku 2009, v mikrobiologické laboratoři Laboma s.r.o. v Českých Budějovicích, a tato data statisticky zpracovat do grafických obrázků a tabulek. Dále se naučit ovládat jednoduchou diagnostickou metodu pro průkaz β -laktamázové aktivity z jednotlivých narostlých kolonií hemofilů (β -LACTAstrip), a navštívit praktické lékaře pro děti a dorost, ve spolupráci s touto laboratoří, jež mi byli ochotni odpovědět na 4 otázky v dotazníku, jejichž hlavní cíl byl zaměřen na léčbu dětí, které mají v materiálu horních cest dýchacích přítomné β -laktamáza pozitivní hemofily, a zda přítomnost těchto enzymů tyto lékaři berou v úvahu při volbě β -laktamových antibiotik. Všechny stanovené cíle se mi podařilo splnit.

Prostřednictvím svého šetření jsem vyvrátila hypotézu 1 a potvrdila hypotézy 2 a 3. Hemofily přítomné v materiálu dýchacích cest u dětí v laboratoři Laboma s.r.o. produkují méně jak 50 % β -laktamáz, čímž jsem vyvrátila 1. hypotézu. Nižší produkce β -laktamáz může být podle mého názoru ovlivněna zejména oblastí v níž dítě žije a ročním obdobím, kdy jednotlivý výskyt onemocnění způsobené hemofily v jednotlivých měsících kolísá. Potvrdila jsem 2. hypotézu, kdy jsem dokázala, že častějším producentem β -laktamáz v dýchacích cestách jsou ostatní hemofily (*H. species*) než *H. influenzae*, což může být dáno tím, že ostatní hemofily, zejména *H. parainfluenzae*, jsou normální běžnou flórou v dýchacích cestách, a tudíž se mohou uplatnit více v onemocněních, které vznikají při oslabení organismu. Prostřednictvím dotazníku, který jsem předložila praktickým lékařům pro děti a dorost, jsem pomocí otázek potvrdila 3. hypotézu, že lékaři při volbě antibiotik berou v úvahu přítomnost producentů β -laktamáz v materiálu horních cest dýchacích.

Má bakalářská práce může sloužit jako argument pro to, aby praktičtí dětské lékaři před vlastním podáním antibiotika, kromě základního vyšetření materiálu

v mikrobiologické laboratoři, citlivosti na antibiotikum, nechali provést i test pro průkaz β -laktamázy, pokud je, v případě nemocného dítěte, možnost ovlivnění antibiotik těmito enzymy.

7. Seznam použitých zdrojů

1. Barber, M.S., Giesecke, U., Reichert, A., Minas, W. (2004): Industrial enzymatic production of cephalosporin-based beta-lactams. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 88: 179-215.
2. Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. (1996): *Lékařská mikrobiologie*. 1. vydání. Praha, Marvil: 279-280.
3. Bednář, M., Souček, A., Vávra, J. (1994): *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*. 1. vydání. Praha, Triton: 100-101.
4. Brook, I. (2004): Use of oral cephalosporins in the treatment of acute otitis media in children. *International journal of antimicrobial agents* 24: 18-23.
5. Bush, K. (1999): Beta-lactamases of increasing clinical importance. *Current pharmaceutical design* 5: 839-845.
6. Bush, K. (2001): New beta-lactamases by gram-negative bacteria: Diversity and effect to selection antimicrobial therapy. *Clinical infectious diseases* 32: 1085-1089.
7. Eliasson, I., Kamme, C., Prellner, K. (1986): Beta-lactamase production in the upper respiratory tract flora. *European journal of clinical microbiology* 5: 507-512.
8. Greenwood, D., Slack, R.C.B., Peutherer, J.F. a kol. (1999): *Lékařská mikrobiologie*. 1. vydání. Praha, Grada Publishing: 319-322.

9. Gusta, V. (2007): An update on newer beta-lactamases. *Indian journal of medical research* 126: 417-427.
10. Hadašová, E. (1982): Antibiotika pro použití v pediatrii. 1. vydání. Brno, rektorát univerzity J. E. Purkyně: 36-37.
11. Handal, T., Olsen, I. (2000): Antimicrobial resistance with focus on oral beta-lactamases. *European journal of oral sciences* 108: 163-174.
12. Hejzlar, M. a kol. (1985): Základy lékařské mikrobiologie. 1. vydání. Praha, Státní pedagogické nakladatelství: 19.
13. Helfand, M.S., Bonomo, R.A.(2003): Beta-lactamase: a survey of protein diversity. *Current drug targets Infectious disorders* 3: 9-23.
14. Hermann, J.C., Hensen, C., Ridder, L., Mulholland, A.J., Höltje, H.D. (2005): Mechanisms of antibiotic resistance: QM/MM modeling of the acylation reaction of a class A beta-lactamase with benzylpenicillin. *Journal of the american chemical society* 127: 4454-4465.
15. Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A (1980): *Medizinische Mikrobiologie*. 5. auflage. Berlin, Springer: 313.
16. Jedličková, A. (1996): Antimikrobiální terapie. 1. vydání. Praha, Maxdorf: 38-39.
17. Julák, J. (2006): Úvod do lékařské bakteriologie. 1. vydání. Praha, Karolinum: 245-248.
18. Kaprálek, F. (1999): Základy bakteriologie. 1. vydání. Praha, Karolinum: 10.

19. Karabus, S., Motala, C. (2009): Penicillin allergy in children. *Current allergy a clinical immunology* 22: 64-66.
20. Kramář, R. (2007): *Lékařská mikrobiologie*. 1. vydání. České Budějovice, Jihočeská univerzita: 40 .
21. Malachová, K. (2002): *Praktikum z mikrobiologie I*. 1. vydání. Ostrava, Ostravská univerzita: 3.
22. Murray, P. R. et al. (2003): *Manual of Clinical Mikrobiology*. 8th. edition. Washington, ASM Press: 623-632.
23. Paterson, D.L. (2001): Extended-spectrum beta-lactamases: Europe experiences. *Current opinion in infectious diseases* 14: 697-701.
24. Patočka, F. a spol. (1970): *Lékařská mikrobiologie*. 1. vydání. Praha, Avicenum: 441-442.
25. Pérez-Llarena, F.J., Bou, G. (2009): *Beta-Lactamase Inhibitors: The story so far*. *Current medicinal chemistry* 1.
26. Potužník, V. a kol. (1989): *Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie*. 1. vydání. Praha, Státní pedagogické nakladatelství: 12-13.
27. Přecechtěl, F. a kol. (1992): *Lékařská mikrobiologie 2*. 1. vydání. Brno, Státní pedagogické nakladatelství: 135.

28. Rice, L.B., Bonomo, R.A. (2000): Beta -Lactamases: which ones are clinically important? Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy 3: 178-189.
29. Riedl, O., Švancara, J. a kol. (1971): Domáci lékař. 1. vydání. Praha, Avicenum: 295.
30. Sherris, J.C., Kenneth, J.R., Ray C.G., Plorde, J.J., Corey, L., Spizizen, J. (1984): Medical Mikrobiology An Introduction to Infectious Diseases. New York, Elsevier: 219.
31. TEST-LINE, Clinical Diagnostics, spol. s r.o. (2009): β – LACTAstrip [online]. Brno, webProgress.
Dostupné z: <<http://www.test-line.cz/beta-lactastrip>>
32. Turner, P.J. (2005): Extended-spectrum beta-lactamases. Clinical infectious diseases 41: 273-275.
33. Uraz, G., Simsek, H., Celik, B. (2000): Beta-lactamase activities and resistance to antibiotics of Haemophilus influenzae, H. parainfluenzae and H. aphrophilus strains identified in throat cultures from children. Drug metabolism and drug interactions 16: 217-228.
34. Votava, M. a kol. (2003): Lékařská mikrobiologie speciální. Dotisk. Brno, Neptun: 78-115.
35. Votava, M. (2005): Lékařská mikrobiologie obecná. 2. přepracované vydání. Brno, Neptun: 245-250.

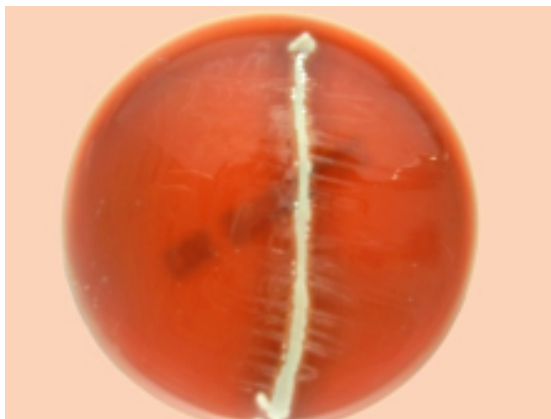
36. Votava, M., Ondrovčík, P. (2002): Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie. 1.vydání. Brno, Masarykova univerzita: 28.
37. Ward, J., Funkhouser, A., Steinhoff, M.C. (1991): Haemophilus influenzae disease and immunization in developing countries. Reviews of infectious diseases 13: 542-554.
38. Zemličková, H., Urbánková, P., Adámková, V., Motlová, J., Lebedová, V., Procházka, B. (2006): Characteristics of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis and Staphylococcus aureus isolated from the nasopharynx of healthy children attending day-care centres in the Czech Republic. Epidemiology and infection 134: 1179-1187.

8. Klíčová slova

- Beta-laktamázy - penicilinázy
- Beta-laktamová antibiotika - β -laktamy
- β -LACTAstrip
- cefalosporiny
- Gramovo barvení
- *Haemophilus influenzae*
- peniciliny
- satelitový fenomén

9. Přílohy

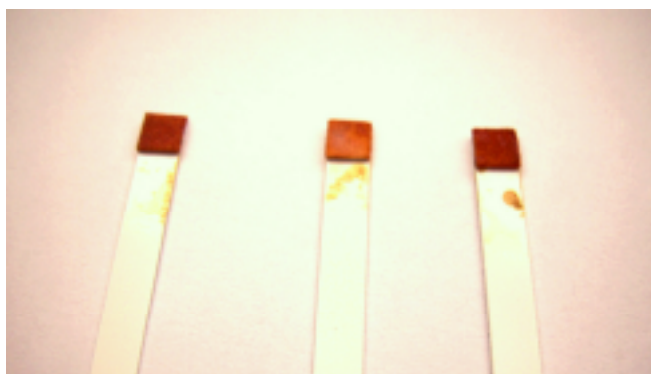
9.1 Obrázky



Obr. 11. Satelitový fenomén: růst *Haemophilus influenzae* na krevním agaru v okolí čáry *Staphylococcus aureus*



Obr. 12. Diagnostický test β -LACTAstrip



Obr. 13. Zóny diagnostických proužků, po provedeném testu β -LACTAstrip na přítomnost producenta (hemofila) β -laktamázy, s pozitivní žlutě-oranžovou zónou v proužku uprostřed

9.2 Použité zkratky

zkratka	název
NAD	nikotinamidadenin-dinukleotid
G + a G -	grampozitivní a gramnegativní
CO ₂	oxid uhličitý
IgA ₁	imunoglobulin třídy A ₁
HDC	horní dýchací cesty
KA	krevní agar
MBLs	metalo beta-laktamázy
ESBL	beta-laktamázy rozšířeného spektra
ATB	antibiotika
PBP	proteiny vázající penicilin