

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Jírovцова 24/1347, 370 04 České Budějovice

**MULTIREZISTENTNÍ BAKTÉRIE SPOJENÉ S NEMOCNIČNÍ
PÉČÍ V NEMOCNICI JINDŘICHŮV HRADEC, a.s.**

(bakalářská práce)

Autor práce: Zuzana Krčmářová
Studijní obor: Zdravotní laborant- kombinované studium
Vedoucí práce: MUDr. Blanka Heinigeová
Datum odevzdání práce: 3. 5. 2013

Abstrakt

Pojem nozokomiální nákazy je historicky spojen s infekčním lékařstvím, s lékařskou mikrobiologií a také s rozvíjející se nemocniční epidemiologií a hygienou. Nozokomiální nákazy, nově infekce spojené se zdravotní péčí, jsou infekce vzniklé v příčinné souvislosti s poskytováním zdravotní péče. Etiologickým agens těchto nákaz jsou často tzv. nemocniční kmeny, mající vysokou rezistenci (to jest nejen schopnost přežívat nepříznivé podmínky zevního prostředí, ale i odolnost vůči antibiotikům a dezinfekčním prostředkům).

Výskyt infekcí a kolonizací multirezistentními baktériemi roste po celém světě. Tyto organismy jsou endemické v mnoha zdravotnických zařízeních navzdory opatřením proti šíření těchto nákaz a řízené antibiotické terapii. Zvyšující se četnost multirezistentních baktérií představuje významnou hrozbu pro veřejné zdraví, prodlužuje dobu hospitalizace pacienta, zvyšuje ekonomické náklady a zvyšuje morbiditu i mortalitu.

Nežádoucím trendem je rostoucí frekvence rezistence původců infekčních nemocí k antibiotikům běžně používaným k terapii. Prognózu pacientů s invazivním onemocněním, např. infekcí krevního řečiště, zlepšuje včasná a dostatečně razantní aplikace účinných antibiotik, podávaných na základě včasné a dobré identifikace infekčního agens a stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám, případně znalost baktérií kolujících v konkrétním nemocničním prostředí a jejich rezistence.

Základním zdrojem informací o míře rezistence je surveillance antibiotické rezistence, jejímž cílem je popis a identifikace aktuálních problémů a ovlivňování komplexních opatření i zvýšení obecné povědomosti o antibiotické rezistenci. Vývoj rezistence k antimikrobiálním látkám a hlavně četnost výskytu patogenních baktérií pak podmiňuje i terapii infekcí spojených se zdravotní péčí.

Mezi nejčastější původce infekcí spojených se zdravotní péčí patří stafylokoky, enterobaktérie a pseudomonády, mohou to ale být všechny druhy známých mikroorganismů.

V roce 1998 vydala Evropská komise Kodaňské doporučení pro zahájení kontinuální surveillace antibiotické rezistence bakterií na území Evropy. Projekt EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, dříve EARSS European Antimicrobial Resistance Surveillance Systém) shromažďuje a analyzuje údaje o vybraných původcích invazivních infekcí získané pomocí mezinárodní sítě národních systémů surveillace. Česká republika se těchto aktivit zúčastňuje od roku 2000, naše pracoviště se podílí na sběru dat od vstupu České republiky do systému. Získané údaje o rezistenci u invazivních kmenů jsou potom podkladem pro výběr antibiotik vhodných k léčbě nejen invazivních infekcí, slouží i při zavádění postupů ke snížení frekvence rezistence, k prevenci šíření rezistentních kmenů v nemocnici a ke kontrole účinnosti těchto opatření. EARS-Net funguje pod záštitou Evropského centra pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC).

Navzdory tomu, že se v posledních letech rychle rozvíjí klinická mikrobiologie a s ní úzce související nemocniční epidemiologie a hygiena (a lze konstatovat, že v posledních letech a možná i s přibývajícím akreditacemi nemocnic, jsou oba tyto obory více respektovány), přes to, že je kladen velký důraz zejména na důsledné dodržování hygieny rukou a uplatňování bariérové ošetrovatelské péče, je nepochybně právě ruka zdravotnického personálu stále nejčastějším přenašečem rezistentních nemocničních bakterií.

K růstu rezistence bakterií přispívá i přes osvětovou činnost a restriktivní opatření mnohdy neuvážené podávání antibiotik, spíše mimo nemocniční praxi, u praktických lékařů v tzv. první linii kontaktu s pacientem a také ve veterinární praxi. Baktérie propojují svět lidí a svět zvířat a rezistence je díky úžasnému genetickému vybavení bakterií a jejich rychlé reprodukci také velmi rychle přenosná.

V předkládané bakalářské práci retrospektivně vyhodnocuji výskyt nejčastěji se vyskytujících multirezistentních bakterií v Nemocnici Jindřichův Hradec, a.s. za období uplynulých 11 let, u vybraných druhů invazivních bakterií porovnávám lokální data s dostupnými daty českými a evropskými (EARS-Net) a pokouším se hodnotit trendy ve výskytu těchto bakterií.

Metodika vychází z doporučení Státního zdravotního ústavu Praha, Národní referenční laboratoře pro antibiotika a Národního referenčního centra pro infekce spojené se zdravotní péčí a ze standardních operačních postupů naší laboratoře.

Vzestupný trend počtu rezistentních kmenů bakterií a jejich rychlého šíření, v jindřichohradecké nemocnici skokově nejvíce v posledních dvou letech, je v našich podmínkách pravděpodobně způsoben zejména nevyhovujícím prostorovým uspořádáním některých oddělení nemocnice, zvláště pak oddělení umístěných ve staré budově interny (v současné době před totální rekonstrukcí). Příčinou je jistě, a to i přes všechnu snahu pracoviště nemocniční epidemiologie a hygieny, které je v naší nemocnici součástí oddělení lékařské mikrobiologie, také ne vždy důsledné dodržování protiepidemických opatření, zejména pak hygieny rukou. Důležitou roli jistě hraje i někdy neuvážené empirické podání antibiotik.

Naše zkušenosti s problematikou multirezistentních bakterií i výsledky této retrospektivní práce jsou ve shodě s četnými studiemi z České republiky i ze zahraničí, které poukazují na rostoucí výskyt a na stoupající klinický význam multirezistentních bakterií v celé Evropě i ve světě.

Trendy rezistence v Nemocnici Jindřichův Hradec, a.s. i přes snahu všech zúčastněných, zejména nemocničního týmu pro prevenci a kontrolu infekcí, v posledních letech zdařile kopírují vývoj v republice i v EU, tedy rezistence významně narůstá.

Summary

A nosocomial infection is the notion historically associated with Infectious Medicine, microbiology, epidemiology and hygiene. Nosocomial infections or infections associated with medical care as they are called currently, are infections contracted by patients while under medical care. An etiological agent of these diseases are bacteria with high resistance that are able to survive in unfavorable conditions of an hospital environment and which are resistant against antibiotics and sanitation.

The occurrence of infections and multi-resistant bacteria has been growing all over the world. These organisms are endemic in many hospitals in spite of all sanitation measures and antibiotic therapy. The rising occurrence of multi-resistant bacteria represents a serious threat to public health and prolongs the patient's hospitalization causing thus rising costs, higher morbidity and mortality.

The growing resistance of infectious agents to antibiotics commonly used for therapy is an undesirable trend. Prognosis for patients with invasive diseases such as bloodstream infections is being improved by the timely application of effective antibiotics given to a patient after an early and correct identification of infectious agents and determining sensitivity to antimicrobial agents or when the type of bacteria which is present in a particular hospital and its resistance is known.

The main information source about the measure of resistance is the antibiotics resistance surveillance. Its goal is the description and the identification of current problems and influencing complex measures as well as improvement of general awareness about antibiotics resistance. The precondition for the successful infections therapy is the development of sensitivity to antimicrobial agents and frequency of occurrence of pathogenic bacteria.

The most common cause of infections associated with medical care is staphylococcus, enterobacteria and pseudomonad, however, all known microorganism can cause infection.

In the year 1998 The European Commission issued The Copenhagen Recommendations concerning the launch of the continual surveillance of antibiotic resistance in European countries.

The EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, originally EARSS - European Antimicrobial Resistance Surveillance System) is a project which gathers and analyses data about causes of invasive infections collected by national surveillance systems.

The Czech Republic has been taking part in the project since 2000 and our department has been collecting the data since the time the Czech Republic has joined the project. The data about the resistance of invasive bacteria form the basis for choice of antibiotics that are suitable for treatment of invasive infections and for implementing steps to lower the frequency of resistance and prevention of spreading resistant bacteria in hospitals as well as for effectiveness checks of these measures. EARS-Net works under the auspices of the European Centre for Disease Prevention and Control.

Hands of hospital staff are the most common carrier of resistant bacteria in hospitals in spite of the fact that the clinical microbiology, epidemiology and hygiene has been steadily developing over the last few years and despite stress given on observing rules of hygiene.

Imprudent giving of medicine to patients outside hospitals especially by practitioners and vets causes the growth of antibiotic resistant bacteria in spite of efforts to raise public awareness and despite some restrictive measures. Bacteria link the human world with that of animals and the resistance is transmissible to humans thanks to genetic structure of bacteria and its fast reproduction

My bachelor's thesis evaluates the occurrence of the most widespread multi-resistant bacteria in the Jindřichův Hradec Hospital a.s. in the last 11 years. In my thesis I compare data about chosen invasive bacteria from our hospital with other Czech and European data (EARS-Net) and I try to evaluate trends in occurrence of these bacteria.

Methodology I used is based on recommendations of SZÚ Praha, NRL for ATB (National Health Institute, National Reference Laboratory for antibiotics and National Reference Centre for infections associated with health care) and standard operational methods of our laboratory.

The trend of rising numbers of resistant bacteria and its fast spread in the hospital in Jindřichův Hradec in the last two years has probably been caused by unsatisfactory location of some wards, especially those in the old building of the Department of Internal Medicine (it's being refurbished at the moment). The other cause could be, in spite of efforts undertaken by the Epidemiology and Hygiene Section which is the part of the Department of Microbiology, the negligence of anti-epidemic measures especially hands washing. An important role is sometimes played by the imprudent giving of antibiotic to patients.

Our experience with the multi-resistant bacteria and the results of this thesis are identical with other studies from the Czech Republic and from abroad stressing the fact that the occurrence of multi-resistant bacteria in Europe and in the world has been rising.

Resistance in the Jindřichův Hradec Hospital a.s., despite all efforts of staff and especially efforts of prevention and infection control team, is increasing and shows tendency similar to that of the Czech Republic generally and other countries of EU.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem 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 fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne (datum)

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí práce prim. MUDr. Blance Heinigové za odborné vedení, cenné rady, pomoc při zpracování této bakalářské práce a za čas, který mi věnovala.

Obsah

1 Úvod.....	11
Historie.....	11
Nozokomiální nákazy (nově infekce spojené s nemocniční péčí).....	13
Vznik rezistence.....	14
Přenos rezistence.....	15
Infekce multirezistentními baktériemi	19
Nejčastější multirezistentní bakterie	19
Metodika vyhledávání multirezistentních bakterií	23
2 Cíl práce	25
3 Metodika	26
4 Výsledky	33
5 Diskuse.....	36
7 Seznam použité literatury	51

1 Úvod

V současné době jsme svědky nebezpečné situace, a to nárůstu nozokomiálních infekcí vyvolaných baktériemi s rozsáhlými fenotypy rezistence. I přes velký pokrok v poznání principů vzniku a šíření infekcí spojených s nemocniční péčí, zůstávají tyto infekce závažným problémem. Touto prací bych chtěla rozšířit povědomí o této závažné situaci a zdůraznit jednu z nejjednodušších možností prevence vzniku těchto infekcí, a to dodržování správné hygieny rukou. Její důslednou aplikací lze snížit četnost infekcí rezistentními kmeny o 25-50 %. Je to velmi účinná, jednoduchá a z ekonomického hlediska i levná varianta prevence. V praxi bohužel podceňovaná a stále zanedbávaná.

Historie

Nozokomiální nákazy jsou spojeny s infekčním lékařstvím. Základy byly položeny polovině šestnáctého století lékařem, přírodovědcem a básníkem Girolamo Fracastero, který pomocí empirického sledování infekčních nemocí jako první vyslovil předpoklad, že původcem a nositelem těchto nemocí jsou malá tělíska „contagiosa“. Uplynula další tři století, během nichž v důsledku vzniku a rozvoje vědecké mikrobiologie byla tato tělíska jednotlivých nemocí rozpoznána, izolována a sledována. Jako první uviděl bakterie ve svém mikroskopu Holanďan Antony van Leeuwenhoek (Šrámová et al., 1995).

Prvním, kdo vědecky zdůvodnil patogenní roli některých mikrobů a zároveň položil základy diagnostiky infekčních nemocí a objevil princip aktivní imunizace, byl Louis Pasteur. Vědecky vysvětlil potřeby asepse a antisepte, v roce 1876 zavedl sterilizaci autoklávováním. Maďarský gynekolog a porodník Ignaz Phillipp Semmelweis odporoval souvislost mezi porodem a vznikem „horečky omladnic“ a zjistil, že tato nemoc je přenášena rukama lékařů. Snažil se zavést metodu asepse (1840) , zavedl do praxe očištění rukou roztokem chlorového vápna a tím položil základy principů aseptického způsobu ošetřování (Bencko et al., 2006).

Robert Koch objevil původce sněti slezinné (1876), původce tuberkulózy (1882) a původce cholery (1883), určil základní principy lékařské mikrobiologie a následně vypracoval některá účinná preventivní opatření. Anglický chirurg Joseph Lister, představitel „sterilní chirurgie“, prosazoval antiseptický princip chirurgické praxe (např. nutil chirurgy používat čisté rukavice, mýt si ruce před a po operaci roztokem kyseliny karbolové a stejným roztokem také čistit chirurgické nástroje a potírat s ním rány – šedesátá léta devatenáctého století).

Tím, že byla známá příčina onemocnění, mohli se jí začít zabývat zdravotníci z hlediska racionální prevence, tedy dnešní terminologií začalo období „medicíny založené na důkazu“ (Bencko, 2007).

Vstup antibiotik do medicíny znamenal další zásadní změnu. Zahájení průmyslové výroby penicilínu ve Velké Británii a USA v roce 1941 odstartovalo novou terapeutickou éru v medicíně - éru antibiotik. Poznatky o antibakteriálně působících látkách produkovaných mikroby nebo plísněmi byly známy už dříve (Schejbalová, Bencko, 2008).

Skotský lékař sir Alexandr Fleming při práci s kulturami stafylokoků v bakteriologické laboratoři Saint Maryes Hospital v Londýně učinil významný objev - náhodně objevil penicilín. Dalších 11 let trvalo než oxfordský biochemik sir Ernst Boris Chain a australský biochemik sir Howard Walter Florey vyrobili klinicky použitelný krystalický penicilín. Další vývoj nových léků - antibiotik, kopíroval rychlé tempo rozvoje moderní medicíny a vědy.

Zavedení antibiotik do praxe léčby infekčních chorob spolu se zahájením rozsáhlých imunizačních programů mělo za následek zásadní změnu struktury nemocnosti. V globálním měřítku došlo k významnému snížení incidence nakažlivých chorob, dramatickému zlepšení výsledků jejich léčby a zejména značnému snížení úmrtnosti (Emmerson, 1996).

Zlatá éra antibiotik trvala krátce. Skončila vznikem a relativně rychlým šířením rezistence. Už v roce 1945 byl prokázán první kmen *Staphylococcus aureus* produkující penicilinázu, enzym zajišťující odolnost vůči penicilínu (Jacoby, 2009).

Nozokomiální nákazy (nově infekce spojené s nemocniční péčí)

Jedna z definic nozokomiální nákazy zní: Nemocniční nákazou je nákaza vnitřního (endogenního) nebo vnějšího (exogenního) původu, která vznikla v příčinné souvislosti s pobytem nebo výkony prováděnými v zařízení léčebně preventivní péče v příslušné inkubační době (§ 15 zákona 258/2000 Sb.v platném znění). Jiné definice, např. dle CDC (Centers for Disease Control and Prevention), charakterizují nozokomiální infekci jako lokalizovanou nebo systémovou reakci organismu na přítomnost infekčního původce nebo jeho toxinu, která nebyla přítomna nebo nebyla v inkubační době v čase přijetí do nemocniční péče.

Nozokomiální nákazy se dělí na nespecifické (komunitní), ty jsou většinou odrazem epidemiologické situace v populaci spádového území, nejsou pro zdravotnická zařízení nijak typické a označujeme je jako „zavlečené nákazy“ a specifické nákazy vznikající jako důsledek vyšetřovacích a léčebných metod. Specifické nákazy jsou typické pro zdravotnická zařízení a bývají často exogenního původu, kdy infekce vzniká proniknutím původce nákazy z vnějšího prostředí do vnímavého jedince. Jsou determinovány zdravotnickou činností a vznikají pouze ve zdravotnických provozech. Ve zdravotnickém zařízení mohou přežívat typické kmeny mikrobů, které se adaptují na toto prostředí (Podstatová, 2009).

Cesta přenosu je rozmanitá a závisí na lokalitě orgánu, v němž je infekční proces, na bráně výstupu infekce ze zdroje a na bráně vstupu do vnímavého jedince. Organismus člověka je exponován třemi velkými epiteliálními povrchy: kůží, sliznicí respiračního traktu a alimentárního ústrojí a dvěma menšími: spojivkami a urogenitálním traktem. U nozokomiálních nákaz má velkou roli kůže jako výstupní i vstupní brána infekce, hlavně je-li narušena její kontinuita (rány, kožní traumata, operace, injekční vpichy) (Šrámová, 1995).

Druhou skupinu specifických nákaz tvoří infekce endogenní. Původcem nákaz je mikrob, který je původně součástí normální mikroflóry pacienta a teprve při změně

imunity nebo pronikne-li do tkání, kam se běžně nedostává (např. při chirurgických zákrocích), je schopen vyvolat nemocniční nákazu, pacient se stává sám sobě zdrojem nákazy.

Příčinou vzniku těchto nákaz jsou tzv. nemocniční kmeny, mající vysokou rezistenci, tj. nejen schopnost přežít nepříznivé podmínky zevního prostředí (zaschnutí, vysoká teplota aj.), ale také rezistenci vůči antibiotikům nebo dezinfekčním prostředkům. Liší se ve svých vlastnostech od kmenů běžně se vyskytujících v populaci, tuto charakteristiku získaly dlouhodobou kolonizací a cirkulací v nemocničním prostředí (Podstatová, 2009).

Výskyt nozokomiálních nákaz u kriticky nemocných je mnohem vyšší než u běžných pacientů navzdory ohromnému pokroku v terapeutických technologiích. Těžké nozokomiální infekce přispívají k dlouhodobé intenzivní péči, nemocnosti, úmrtnosti a samozřejmě ke zvýšení výdajů na léčbu (Heyland et al., 1999; Inan et al., 2005). Zvyšující se míra multirezistence bakterií je vážnou hrozbou pro antibiotickou terapii a zvyšuje rizika selhání léčby (Schwaber, 2005; Villegasa, 2004; DiPersioa, 2005; Chlebicki, 2004).

Mezi nejčastější původce nozokomiálních nákaz patří stafylokoky, pseudomonády a enterobaktérie. Původcem infekce mohou být všechny druhy známých mikroorganismů, často až ve dvou třetinách převažují gramnegativní tyčinky (*Escherichia coli*, rody *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* aj.) a asi jednu třetinu tvoří stafylokoky, mohou se uplatnit i streptokoky, klostridia aj. Tyto patogeny jsou celosvětově uznávány jako příčina nozokomiálních nákaz (Bradford, 2001).

Vznik rezistence

Baktérie mají pozoruhodný počet genetických mechanismů k získání rezistence k antibiotikům.

Rezistence bakterií k antibiotikům vzniká obecně dvěma způsoby (Bennett et al., 2004)

1. Mutacemi genů, jejichž produkty jsou cílovými místy antibiotik, genů kódujících enzymy (obecně proteiny) inaktivující účinek antibiotika, který způsobí změnu jejich substrátové specifity a také promotorů, jež způsobují hyperprodukcii inaktivujícího enzymu, efluxních pump, tedy mutacemi dalších strukturálních složek buněčné stěny (např. inaktivace porinů snižujících permeabilitu vnější buněčné stěny).

Jedná se o změnu ve stávajícím genomu a tato rezistence se nazývá adaptivní (Jacoby, 2009; D'Costa a Wright, 2009; Poole, 2005).

2. Akvizicí nových genů dochází k expanzi genetické informace bakterie. Geny rezistence k antibiotikům se mobilizují několika různými mechanismy, a to přenosem na plasmidech, konjugativních transpozomech, integronech nebo transdukcí, tedy pomocí bakteriofágů. Aby vůbec k intercelulárnímu přenosu došlo je velmi důležitá také jejich mobilizace uvnitř bakterie. (Hrabák et al., 2010; Carattoli et al., 2005; Bennett, 2008).

Rezistence k antibiotikům je neustále se rozvíjející problém, umožňující sledování evoluce mikroorganismů v reálném čase. Vývoj rezistence k antibiotikům a hlavně četnost výskytu patogenních bakterií pak podmiňuje i terapii nozokomiálních infekcí.

Přenos rezistence

Přenos genů pro rezistenci k antibiotikům se děje pomocí mobilních genetických elementů (mezi ně zahrnujeme plasmidy, transpozony, inzerční sekvence a integrony) tzv. horizontálním přenosem genů, což má za následek rychlé šíření rezistence. Šíření determinant rezistence na mobilních elementech DNA (Deoxyribonucleic acid) nebo jejich sdružování na integronech je významnější než rezistence vzniklá mutacemi (Hrabák et al., 2010).

PLAZMIDY jsou molekuly dvouvláknové DNA uzavřené do kruhu a schopné samostatné replikace v cytoplazmě bakterií. Nesené geny na plazmidech nejsou pro bakterii esenciální, z toho vyplývá, že plazmidy jsou pro základní funkce bakterie postradatelné (Carattoli et al., 2003). Přirozeně se vyskytující plazmidy mají velký rozptyl vlastností, jak do velikosti, tak do počtu kopií. Molekula může mít velikost až 400 kb a podobně i počet kopií plazmidu v buňce, od jediné kopie až po stovky kopií (např. plazmidy kódující rezistenci nebývají větší než 100 kb). Počet kopií je stálou charakteristikou určitého plazmidu za konstantních podmínek, jeho další replikace je omezená na plazmidu kódovaným systémem (Novick, 1987). Plazmidy obsahují nejen geny pro vlastní replikaci, ale také geny zajišťující trvalou přítomnost plazmidů u daného kmene (Carattoli et al., 2005).

Plazmidy lze rozdělit podle funkce v buňce, a to na fertillní (F-plazmidy), plazmidy nesoucí geny rezistence (R-plazmidy), Col-plazmidy obsahující geny pro koliciny (substance smrtící jiné bakterie), degradativní (schopné pohlcovat nezvyklé látky) a virulentní plazmidy (kódující patogenitu bakterií) nebo podle inkompatibility, což je neschopnost dvou plazmidů být trvale přítomny u stejné buněčné linie. Neschopnost koexistence je následek příbuznosti plazmidů (sdílení replikace, replikačních kontrolních mechanismů nebo dělicích elementů). Dle inkompatibility jsou definovány čtyři základní skupiny: IncF, IncP, Ti, IncI (Rawlings, 2001).

Proces horizontálního přenosu plazmidů je nazýván konjugací. Konjugace je proces kontaktní a na energii závislý. Jedná se o nejdůležitější způsob výměny genetické informace u bakterií. Plazmid, na kterém je kódován celý bílkovinný aparát nutný pro transfer z jedné buňky do druhé se nazývá konjugativní (velikost >30 kb, s malým počtem kopií v cytoplazmě). Plazmid schopný konjugace pouze za účasti pomocného konjugativního plazmidu, je plazmid mobilizovatelný (poměrně malý <15 kb, s vysokým počtem kopií).

Při konjugaci se rozštěpí transferovaná DNA v místě zvaném oriT, enzymem relaxázou, který pak zůstává kovalentně vázán na oriT DNA. Takto vzniklý nukleoproteinový komplex je transportován do buňky recipienta bílkovinným exportním mechanismem T4SS (Type IV secretion systém), vlastní DNA je pak aktivně

vpravena do buňky proteinem T4CP (type IV coupling protein). (Garcillán-Barcia et al., 2009).

INSERČNÍ SEKVENCE (IS) jsou krátké úseky DNA (<2,5 kb), které jsou schopné nezávislé transpozice v mikrobiálním genomu. Způsobují inserční mutace, rekombinace nebo případně mobilizují geny virulence nebo rezistence. Základní složkou je gen transposázy, který je ohraničen krátkými úseky, zvanými invertované repetice levá a pravá (IRL a IRR – Inverted Repeat Left and Right). Tato místa jsou rozpoznávána transposázou, která se skládá ze dvou domén. (Doména I funguje jako štěpné místo, doména II jako vazebné místo). Součástí inserční sekvence jsou ještě generované repetice (DRs- directly repeated sequences). Právě tyto sekvence jsou generovány při inzerci inserční sekvencí do cílové molekuly DNA (Mahillon, 1998).

K transpozici inserční sekvence dochází přímou vazbou transposázy na invertované repetice s následným rozpojením vazby a přenesením na cílové místo recipientní molekuly DNA. Specificita rozpoznávání cílového místa na molekule DNA, kam má být inserční sekvencí vložena, je různá. Inzerční sekvence jsou klasifikovány dle své struktury (složení transposázy, invertovaných a generovaných repetit). (Mahillon, 1998).

Významná úloha inzerčních sekvencí v epidemiologii rezistencí je zvýšení exprese genů rezistence. Zvýšení exprese těchto genů nastává, protože části IS, hlavně invertované repetice, tvoří silné promotory (Poirel et al., 2005).

TRANSPOZONY jsou mobilní genetické elementy schopné intracelulárního přenosu v rámci jedné molekuly, popř. mezi různými molekulami DNA (z chromozomu do plazmidu a naopak). (Roberts et al., 2008; Bennett, 2008). Zvláštní skupinu tvoří konjugativní transpozony, jež mají k dispozici systém pro jejich konjugativní přenos. Při excizi transpozonu z dárcovské molekuly DNA, se vytvoří kovalentně uzavřený kruh dvoušroubovice DNA. Struktura je podobná plazmidu, ale na rozdíl od něj není schopna autonomní replikace (Salyers et al., 1995). Na rozdíl od inzerčních sekvencí mají schopnost kódovat i další geny, které přímo nesouvisí s jejich funkcí. Po přenosu

DNA dojde v obou buňkách (donoru i recipientu) k replikaci druhého vlákna DNA a opětovně se vytvoří původní kruhová forma dvoušroubovice DNA transpozonu.

Transpozony obsahují tři funkční jednotky: gen transposázy, umožňující vlastní transpozici a invertované repetice na koncích transpozonu, rozeznávané transposázou. Klasifikace je obdobná jako u inzerčních sekvencí, založená na jejich struktuře. Další zvláštní skupinu tvoří tzv. kompozitní transpozony, ohraničené dvěma opačně orientovanými inzerčními sekvencemi. Tyto IS transpozony poskytují transposázu a invertované repetice. Různé transpozony se mohou do sebe dále vnořovat a vytvářet složité struktury (Roberts et al., 2008).

INTEGRONY jsou genetické elementy, které sdružují otevřené čtecí rámce a začleňují je do funkčních genů, obvykle jim poskytují silné promotory (Bennett, 1999). Základní složky integronu jsou enzym integráza (zajišťující integraci volných genových kazet do integronu na pozici *attI*), vazebné místo (*attI*) a promotor (P_c), zajišťující expresi integrovaných genových kazet. Genové kazety (*attC*) jsou velmi důležité, podílejí se na formování integronu, jsou to mobilní elementy cirkulární DNA, které se mohou vyskytovat volně v cytoplazmě, ale nejsou schopné autonomní replikace jako plazmidy). Integrony samy o sobě nejsou mobilní elementy, ale jsou mobilizovány, většinou jako součást transpozonů (Fluit et al., 2004; Mazel 2006).

V současnosti je popsáno pět tříd integronů. Liší se opět strukturou integrázy a strukturou 3' konzervativní sekvence (3'CS). Nejčastější jsou integrony první třídy (Mazel, 2006).

Integrony jsou nalézány u řady gramnegativních bakterií, jejich význam roste se šířením metalo- β -laktamáz a dalších získaných karbapenemáz, jejichž geny jsou většinou na integronech kódovány.

Infekce multirezistentními baktériemi

V posledních dvou dekádách narůstá významnost kolonizací a infekcí mikroorganismy s rezistencí k širokému spektru antibiotik (Multi-Drug Resistant Organisms - MDRO). Z epidemiologického hlediska jsou multirezistentní organizmy definovány jako mikroorganismy, zejména bakterie, které jsou rezistentní k jedné nebo více skupinám antibiotik (ATB), jako jsou MRSA (*methicilin-rezistentní Staphylococcus aureus*) nebo VRE (*vankomycin-rezistentní enterokoky*), nicméně většina kmenů z této skupiny vykazuje skutečnou rezistenci k většině dostupných antibiotik. Jedná se také o skupiny GNB (gramnegativní bakterie), včetně producentů širokospektrých beta-laktamáz ESBL (extended-spectrum beta lactamases) (Shlaes et al., 1997).

Výskyt infekcí a kolonizací multirezistentními (MDR) baktériemi roste v nemocnicích po celém světě. Tyto mikroorganismy jsou nyní endemické v mnoha zdravotnických zařízeních, navzdory opatřením proti šíření nozokomiálních nákaz a řízené antibiotické terapii. Délka hospitalizace je rizikovým faktorem pro multirezistenci (Serefhenaglu et al., 2009).

Epidemiologie MDR bakterií v jednotlivých institucích a státech se liší, jak dokazují četné studie. V roce 1983 bylo první ohnisko šíření širokospektrých beta-laktamáz (ESBL) hlášeno v Německu (Knothe et al., 1983). Výskyt bakterií produkujících ESBL se liší v různých geografických regionech: nízká prevalence (3-8 %) ve Švédsku, Japonsku a Singapuru, vyšší (34 %) Portugalsko, (37 %) Itálie, (44 %) New York, (30-60 %) Latinská Amerika a (58 %) Turecko (Paterson et al., 2005; Khanfar 2009).

Nejčastější multirezistentní bakterie

BETA-LAKTAMÁZY jsou nejčastější příčinou rezistence gramnegativních bakterií k beta-laktamovým antibiotikům. V souvislosti se zavedením cefalosporinů třetí

a čtvrté generace do praxe došlo ke vzniku beta-laktamáz schopných hydrolyzovat také tato antibiotika. Velkou skupinu těchto enzymů tvoří tzv.

ŠIROKOSPEKTRÉ- β -LAKTAMÁZY (ESBL), produkované některými gramnegativními baktériemi, hydrolyzují penicilíny, také širokospektré cefalosporiny a monobaktamy, ne však karbapenemy a jsou blokovány kyselinou klavulanovou. ESBL vznikají v důsledku mutací v TEM-1, TEM-2 nebo SHV-1 genů, běžně se vyskytujících v čeledi *Enterobacteriaceae*. Tyto enzymy, které se vyskytují převážně u druhů *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli*, jsou popsány i u jiných rodů včetně *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Salmonella* a *Enterobacter*. Tyto enzymy spadají do skupiny 2be a část do skupiny 2d (klasifikace Bush et al., 1995). Je popsáno několik různých skupin ESBL, které souhrnně čítají několik set příslušníků (Bradford, 2001; Paterson et al., 2005). Jejich počet neustále roste (aktuální údaje viz <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>).

Do nejpočetnější skupiny β -laktamáz patří SKUPINA TEM. Ke vzniku nových odvozených enzymů dochází záměnou aminokyselin na určitých pozicích (např. 21, 39, 42, 51, 92, 104, 153, 164, 182, 218, 237, 238, 240, 244, 265 a 268). Tyto substituce mění fenotyp ESBL, tedy schopnost hydrolyzovat jednotlivé cefalosporiny a rovněž mění izoelektrický bod molekuly (pohybuje se v rozmezí pI 5,2-6,5). (Bradford, 2001). Nejčastěji se s ESBL typu TEM lze setkat u *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae*. Ale byla detekována i u dalších druhů, např. *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* a *Pseudomonas aeruginosa* (Hrabák, 2007).

SKUPINA SHV jejíž enzymy jsou nejčastěji nalézány u druhu *Klebsiella pneumoniae*. Tato skupina má relativně menší počet příslušníků, je to dáno tím, že v genu *bla_{SHV}*, který kóduje enzymy skupiny SHV, dochází mutacemi k menšímu počtu variant, než v případě TEM. Většina záměn v molekule enzymu SHV je vázána na substituci serinu za glycin na pozici 238. Další místa, na nichž dochází k substituci, jsou např. 130, 140 a 240. Izoelektrický bod se pohybuje v rozmezí pI 7,2 a 8,2 (Bradford, 2001). Tyto enzymy jsou nalézány rovněž u druhů *Citrobacter diversus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*.

SKUPINA CTX-M je poměrně mladá, její ESBL je vázána na plazmidu. Příslušníci této skupiny se vyznačují hydrolýzou cefotaximu a jsou nalézáni především u druhu *Salmonella enterica sérovar Typhimurium* a *Escherichia coli*. Izelektrický bod se pohybuje mezi hodnotami pI 7,6 a 8,9.

SKUPINA OXA je klasifikována dle Amblera jako třída D, podle klasifikace Bush et al. Jako skupina 2d (Ambler, 1980; Bush et al, 1995). Enzymy této skupiny jsou charakteristické hydrolýzou oxacilinu a kloxacilinu a jsou slabě inhibovány kyselinou klavulanovou (Bush et al, 1995). Skupina se vyznačuje slabou genotypovou podobností, díky tomu se izoelektrický bod příslušníků této skupiny pohybuje v rozmezí 5,5 až 8,9. Tyto enzymy jsou nalezeny převážně u druhu *Pseudomonas aeruginosa*.

Ostatní skupiny jsou popisovány, ale nemají zatím zásadní význam jako skupina TEM, SHV, CTX-M a OXA. Patří sem např. skupina BES, FEC, GES, CME, PER a VEB (Bradford, 2001; Jacoby, 2009)

β -LAKTAMÁZY AmpC, enzymy produkované řadou gramnegativních bakterií, které hydrolyzují penicilíny, monobaktamy, cefalosporíny a cefamyciny, nejsou inhibovány inhibitory β -laktamáz. Jsou šířeny cestou plazmidů a představují velký epidemiologický a také diagnostický problém (Černohorská, 2008). Tyto enzymy spadají do skupiny 1 (klasifikace Bush et al, 1995) a do skupiny C (klasifikace Ambler, 1980). Geny pro β -laktamázy typu AmpC jsou přítomny v chromozomu celé řady mikroorganismů, např. *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii* (Hrabák, 2007; Hanson, 2003). Původně byly identifikovány pouze chromozomální β -laktamázy AmpC, později byly popsány i β -laktamázy AmpC kódované geny přítomnými na plazmidech (Hrabák, 2007; Thomson, 2001). Inducibilní enzymy AmpC (iAmpC) nejsou exprimovány bez přítomnosti induktoru. Induktorem může být např. imipenem, cefoxitin nebo inhibitor β -laktamáz (kyselina klavulanová, sulbaktam, tazobaktam). V mechanismu indukce hrají důležitou roli proteiny, které vážou penicilín (Jacoby et al., 2006). Některé látky jsou schopny inhibovat enzym AmpC, je to např. kyselina boritá nebo oxacilin. Klinický význam β -laktamáz AmpC je srovnatelný s ESBL (Hrabák, 2007).

METALO- β -LAKTAMÁZY (MBL) jsou enzymy produkované některými gramnegativními baktériemi, hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny všech generací a karbapenemy, monobaktamy (aztreonam) nehydrolyzují. V Amblerově klasifikaci jsou řazeny do skupiny B a v klasifikaci dle Bush et al. spadají do skupiny 3 (Ambler, 1980; Bush et al., 1995). Podle molekulárního členění se MBL dělí do tří základních skupin (B1, B2, B3) lišících se strukturou aktivního místa. Genová kazeta, která kóduje tento enzym je většinou součástí integronu třídy 1. V současnosti nejvíce rozšířené MBL spadají do skupin: VIM, MP, GIM a SIM. Během posledních let došlo k rozšíření další karbapenemázy, enzymu značeného NDM-1 (New Delhi metallo- β -lactamase). V současnosti jsou popsány dvě varianty (NDM-1 a NDM-2), v brzké době se očekává popis dalších dvou typů (Hrabák, 2010).

OXA zahrnují skupinu velmi heterogenních β -laktamáz náležejících do funkční skupiny 2d resp. D podle Amblera. β -laktamázy skupiny OXA hydrolyzují oxacilin a nejsou inhibovány inhibitory β -laktamáz (popř. velmi slabě). Substrátová specifita enzymů OXA je velmi různorodá, od penicilinu až po karbapenemy (Hrabák et al., 2009; Hrabák, Chudáčková, 2008)

KARBAPENEMÁZY 2f jsou serinové karbapenemázy patřící do funkční skupiny 2f. Velmi silně hydrolyzují všechny peniciliny, cefalosporiny a aztreonam. Jsou velmi slabě inhibovány kyselinou klavulanovou. Stejně jako v případě AmpC, jsou tyto enzymy inhibovány kyselinou boritou. Epidemiologie producentů KPC má určitá specifika. K září 2011 bylo popsáno 10 různých variant enzymů KPC (SME-1, IMI-1, NMC-A, GES, KPC-3 aj.) V Evropě popsány zatím jen ve Francii, Skandinávii, Velké Británii a Řecku. Vždy se jednalo o import z Řecka, USA a Izraele, kde je bohužel výskyt producentů KPC již závažný klinicko-epidemiologický problém (Endiamini et al., 2008; Leavitt et al., 2007)

MRSA (*methicilin-rezistentní Staphylococcus aureus*) produkují změněnou transpeptidázu zvanou PBP-PBP2a (penicilin-binding protein 2a), jejíž syntéza je kódována genem mecA. PBP-PBP2a má sníženou afinitu k methicilinu. Způsobuje tak rezistenci k tomuto antibiotiku.

Poměrně rychle se začaly šířit, navíc bývají rezistentní i k řadě dalších antibiotik, nejen k penicilinu a methicilinu (Mutto et al., 2003). MRSA patří mezi nejvýznamnější multirezistentní patogeny. Jeho podíl na invazivních infekcích je od roku 2000 sledován celoevropským systémem EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System). První izolace kmene *methicilin-rezistentního Staphylococcus aureus* byla popsána ve Velké Británii v roce 1961. Ve svých počátcích bylo šíření MRSA vázáno na nemocniční prostředí a stalo se obávanou nozokomiální nákazou v globálním měřítku. V posledních letech jsou stále častěji izolovány i komunitní kmeny.

Metodika vyhledávání multirezistentních bakterií

Každého původce nemocniční nákazy je třeba v mikrobiologické laboratoři co nejpřesněji identifikovat a stanovit citlivost na antibiotika. Základem mikrobiologické diagnostiky je detekce pomocí morfologických a biochemických znaků a metabolické aktivity mikrobů in vitro. V posledních letech se hojně užívá molekulární analýza.

Nejjednodušší metoda pro přímou detekci ESBL producentů je použití selektivně kultivačních médií (např. MacConkey, Drigalski agar) doplněných cefotaximem nebo ceftazidimem v různých koncentracích. Tato média jsou komerčně dostupná (Chemunex, AlphaOmega).

Screeningové testy DDST (double disc synergy test), případně E-test, principem je zesílení citlivosti na cefalosporiny nebo monobaktam.

Na trhu jsou dostupné automatizované testy pro ESBL detekci a potvrzení čistých kultur (BioMérieux, BD Diagnostics)

Další generací médií jsou chromogenní média, která jsou schopna odlišit patogeny pomocí barviva vytvořeného v bakteriální kolonii po hydrolýze cíleného bakteriálního enzymu. Tato média po začlenění mezi selektivně diagnostické půdy

znamenała průlom pro přímou detekci *methicilin-rezistentního Staphylococcus aureus* v klinických vzorcích (MRSA roste na takovém agaru v barevných koloniích v závislosti na barvívu použitém výrobcem, nejčastěji růžově, modře nebo zeleně).

V současné době jsou dostupná i chromogenní média i pro detekci ESBL (BioMérieux, Oxoid Ltd, CHROMagar). Selektivita je umožněna pomocí substrátů a různých antibiotik obsažených v médiu. Analytická citlivost a specifická je srovnatelná s automatizovanými testy a jinými selektivními médii.

Molekulární analýzy k detekci genotypu a fenotypu mikroorganismu. Například genotypová detekce genů MBL metodou Multiplex PCR a genotypová detekce ESBL (Check-Body, Check-MDR CT101, aj.). Test je prováděn za účelem zjištění a rozlišení blaTEM, blaSHV a blaCTX-M genů.

2 Cíl práce

Cílem předkládané práce je potvrdit (nebo vyvrátit) stoupající výskyt multirezistentních bakterií v naší nemocnici, spojený s nutností kontroly infekcí vzniklých během hospitalizace ve zdravotnickém zařízení. A připomenutí zdravotnickým pracovníkům, že nemocniční infekce mohou být z velké části redukovány.

3 Metodika

Metodika vychází z doporučení Státního zdravotního ústavu Praha, Národní referenční laboratoře pro antibiotika a Národního referenčního centra pro infekce spojené se zdravotní péčí a dále ze standardních operačních postupů naší laboratoře.

V mé bakalářské práci jsem použila stanovení kvalitativní diskové citlivosti na Mueller-Hinton agaru, k detekci MRSA screeningový disk cefoxitinu i komerčně vyráběné médium MRSA-select (BioRad), produkci ESBL jsem prokazovala pomocí double disc synergy testu (DDST) a signifikantního rozdílu zón inhibice kolem disků cefotaximu a disku cefotaximu s kyselinou klavulanovou. Tyto metody pro screening ESBL a MRSA jsou poměrně jednoduché, nákladově efektivní a přesto spolehlivé. Mohou se použít v jakékoliv mikrobiologické laboratoři.

MRSASelect je selektivní médium pro detekci a přímou identifikaci MRSA. Selektivita tohoto média je založena na přítomnosti antibiotika a optimalizované koncentrace soli, která inhibuje růst kvasinek a většiny gramnegativních a grampozitivních bakterií, s výjimkou methicilin-rezistentních stafylokoků.

DDST je metoda založená na průkazu synergického účinku mezi inhibitorem beta-laktamázy a cefalosporiny 3. generace nebo aztreonamem. Jako inhibitor se používá kyselina klavulanová, která je přítomna v disku v kombinaci s amoxicilinem. Disky s různými cefalosporiny (resp. aztreonamem) jsou umístěny ve vzdálenosti 20-30 mm od disku s kombinací. Jestliže kmen produkuje ESBL, dochází mezi disky s kombinací a některým cefalosporinem (resp. aztreonamem) k deformaci inhibiční zóny (synergie).

Screeningové vyhledávání ESBL se také provádí pomocí disku cefalosporinu třetí, resp. čtvrté generace a disku téhož cefalosporinu v kombinaci s kyselinou klavulanovou. Srovnává se průměr inhibičních zón u disku s kombinací a disku se

samotným cefalosporinem. Je-li průměr inhibičních zón u disku s kombinací větší než 5 mm, je kmen hodnocen jako producent ESBL.

Epidemiologická sledování jsem prováděla ve spolupráci s pracovištěm nemocniční hygieny a epidemiologie, které je součástí oddělení lékařské mikrobiologie a s využitím nemocniční směrnice S-LP-17 Kontrola, prevence a omezování výskytu infekcí, která je v souladu s metodickými návody Národního referenčního centra pro infekce spojené se zdravotní péčí.

Se souhlasem prim. MUDr. Blanky Heinigeové jsem využila k retrospektivnímu sledování data oddělení lékařské mikrobiologie a data EARS-net, která jsou majetkem EUCAST a jsou volně přístupná na adrese www.eucast.org.

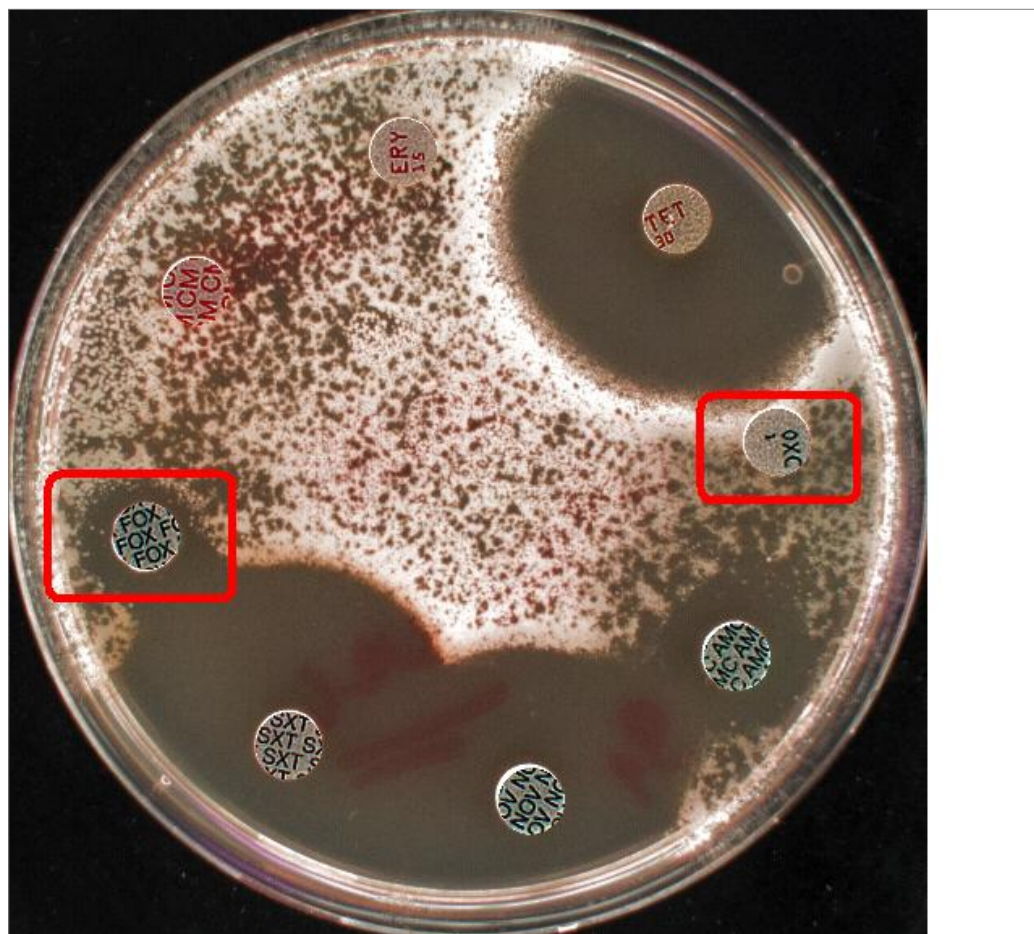
Metodika výběru dat: použitá retrospektivní data jsem čerpala se souhlasem vedoucí oddělení, prim. MUDr. Blanky Heinigeové, z databáze ADAGIO (BioRad), systému dlouhodobě používaného v naší laboratoři k odečtu a hodnocení diskových citlivostí. Zařazen byl vždy první rezistentní izolát od pacienta, vybrány byly pouze kmeny, které byly izolovány v souvislosti s hospitalizací.



Staphylococcus aureus, typicky citlivý „divoký“ kmen

Zdroj databáze ADAGIO,

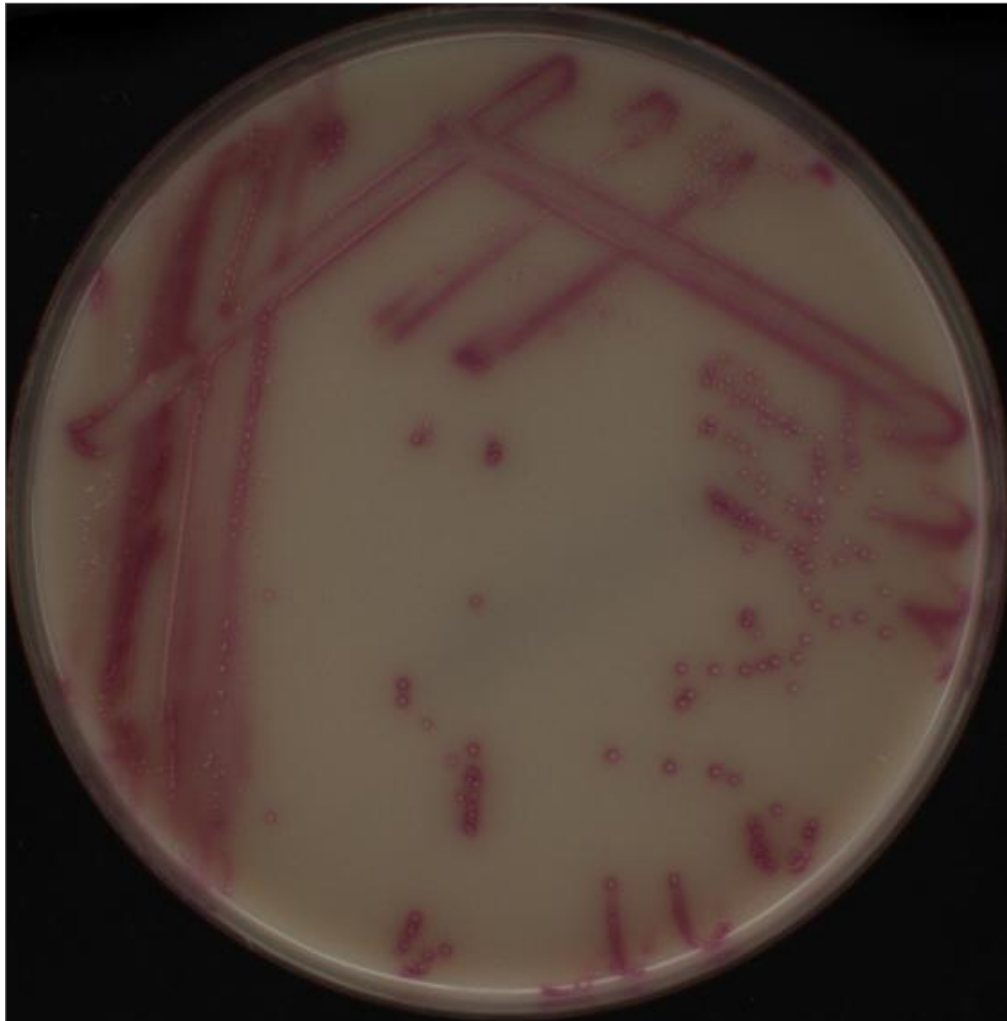
oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.



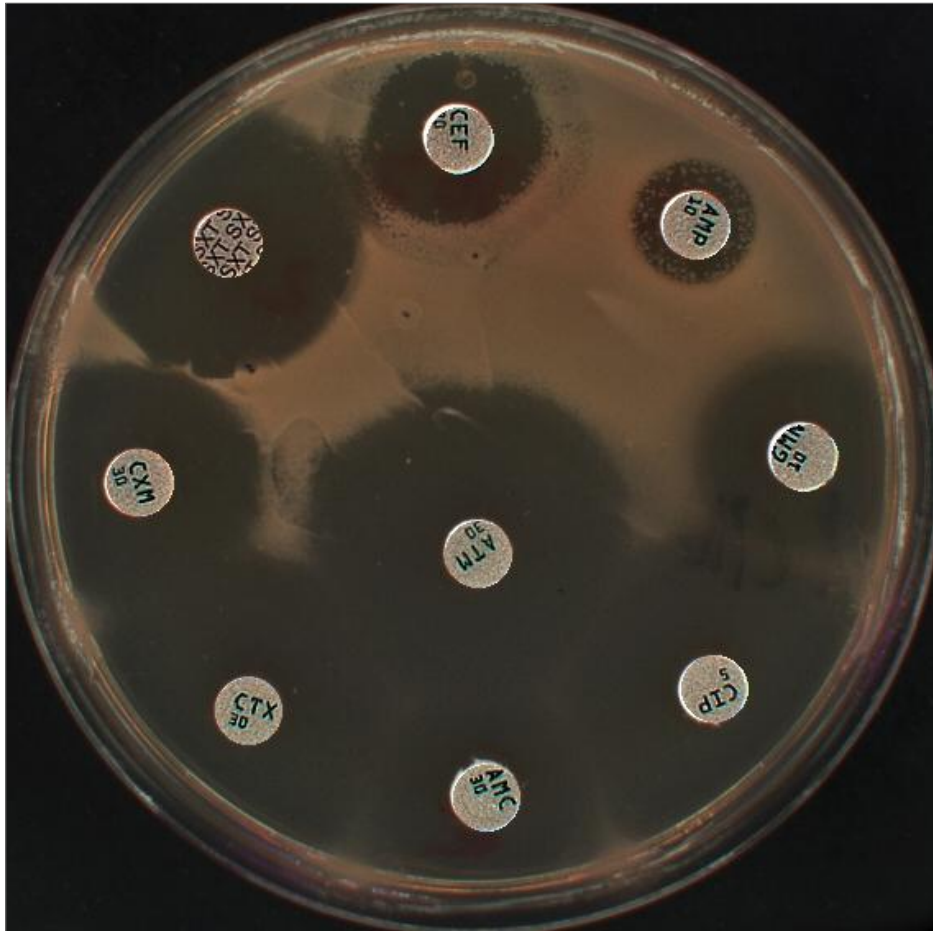
Staphylococcus aureus, fenotyp MRSA, rezistentní cefoxitin a oxacilin

Zdroj databáze ADAGIO,

oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.



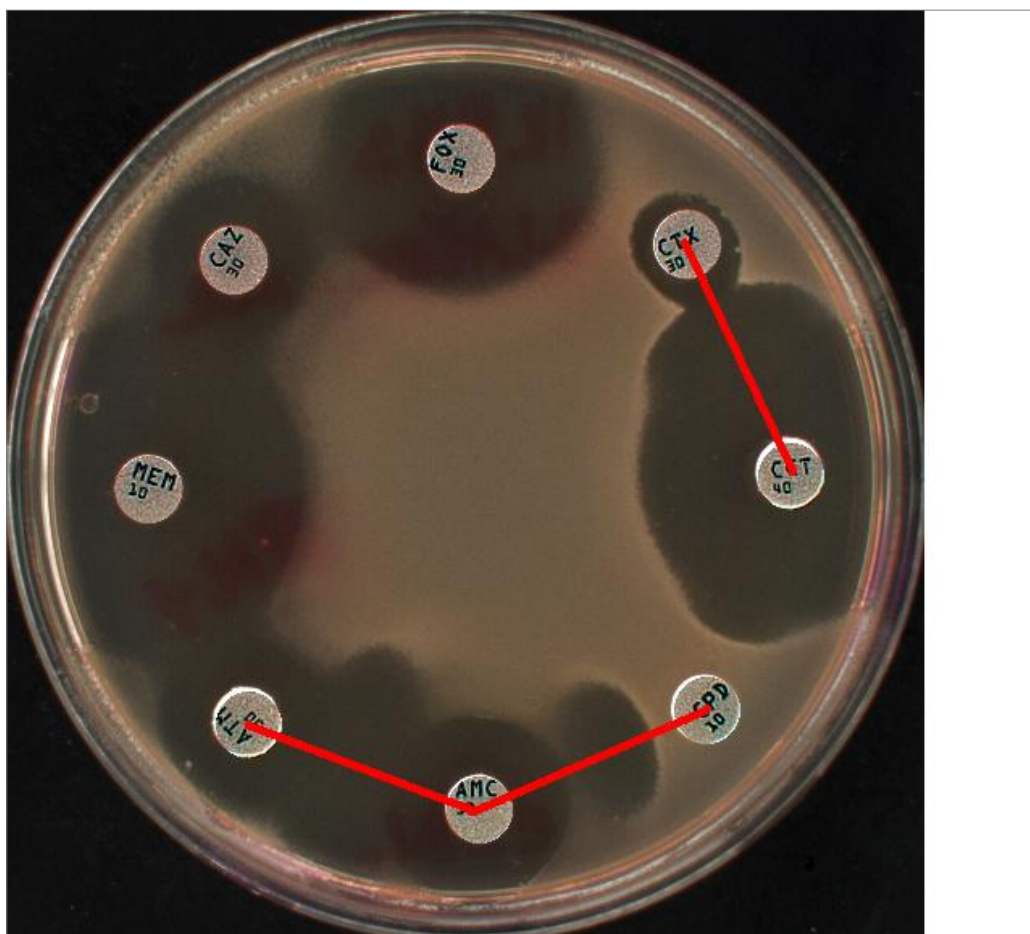
Staphylococcus aureus, fenotyp MRSA na screeningovém chromagaru MRSA-select (Bio-Rad)



Klebsiella pneumoniae, typický citlivý kmen s přirozenou rezistencí k ampicilinu

Zdroj databáze ADAGIO,

oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.



Klebsiella pneumoniae s produkcí ESBL, námi používaná sestava k detekci ESBL s použitím double disc synergy test + signifikantního rozdílu průměrů zón kolem cefotaximu a cefotaximu s kyselinou klavulanovou

Zdroj databáze ADAGIO,
oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.

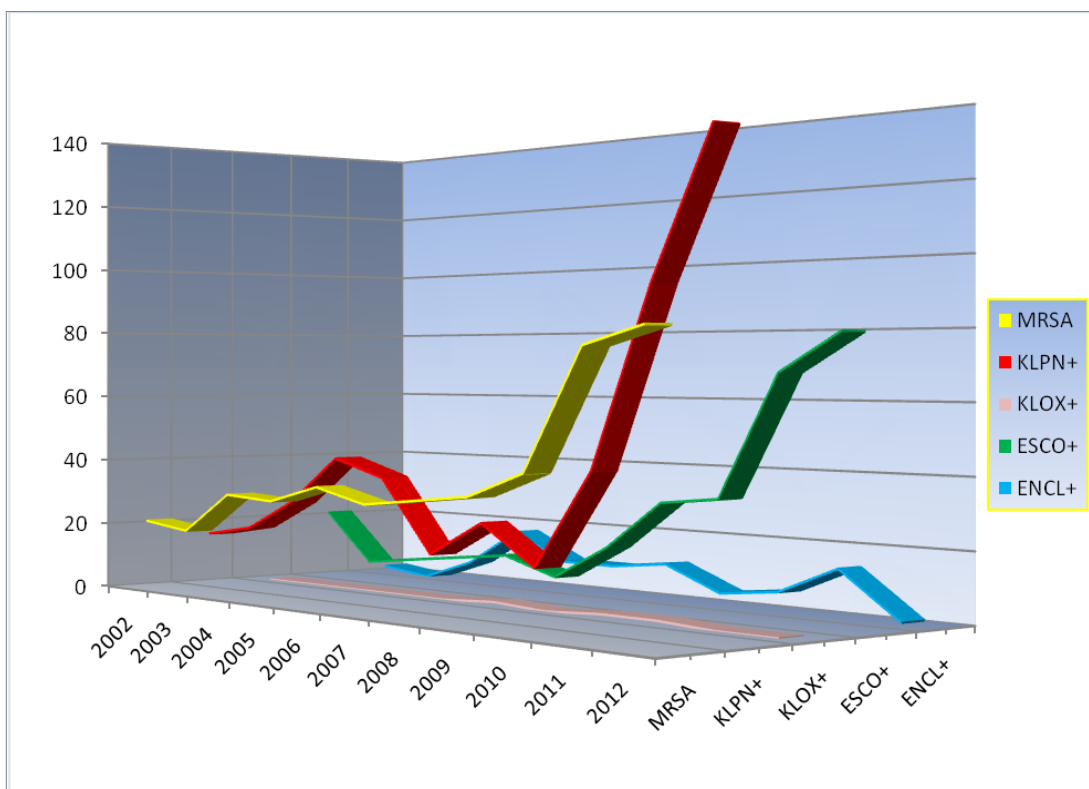
4 Výsledky

V předkládané bakalářské práci retrospektivně vyhodnocuji výskyt vybraných, tj. nejčastěji se vyskytujících multirezistentních bakterií v Nemocnici Jindřichův Hradec, a.s. za období uplynulých 11 let. Data byla získána výše uvedenými metodami.

U vybraných druhů invazivních bakterií porovnávám v diskuzi lokální data s dostupnými daty českými a evropskými (EARS-Net) a pokouším se hodnotit trendy ve výskytu těchto bakterií. Počty vybraných multirezistentních izolátů z jindřichohradecké nemocnice za sledované období jsou shrnuty v níže uvedené tabulce.

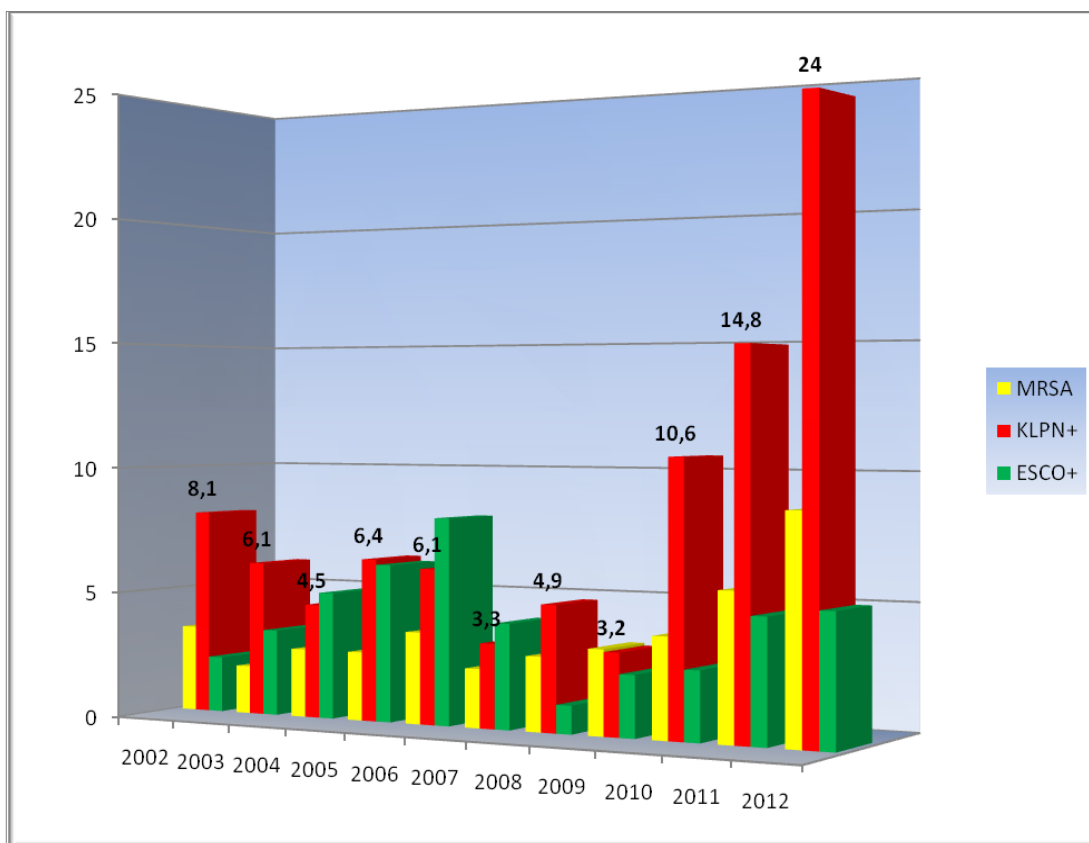
období	MRSA	KLPN+	KLOX+	ESCO+	ENCL+
2002	21	16	0	21	2
2003	19	19	0	6	0
2004	31	28	0	8	6
2005	30	42	0	10	17
2006	35	37	0	12	9
2007	31	16	1	7	9
2008	33	26	0	17	11
2009	35	15	1	31	4
2010	42	42	1	33	6
2011	75	91	0	68	14
2012	80	131	0	79	1
2002-2012	432	463	3	292	79

Počty sledovaných multirezistentních kmenů izolovaných v Nemocnici Jindřichův Hradec, a.s. V období let 2002-2012, výchozí tabulka



Počty sledovaných multirezistentních kmenů izolovaných v Nemocnici Jindřichův Hradec, a.s. V období let 2002-2012, grafické znázornění

Vzestupný trend počtu rezistentních kmenů bakterií a jejich rychlého šíření, v jindřichohradecké nemocnici skokově nejvíce v posledních dvou letech, je v našich podmínkách pravděpodobně způsoben zejména nevyhovujícím prostorovým uspořádáním některých oddělení nemocnice, zvláště pak oddělení umístěných ve staré budově interny (v současné době před totální rekonstrukcí). Příčinou je jistě, a to i přes všechnu snahu pracoviště nemocniční epidemiologie a hygieny (které je v naší nemocnici součástí oddělení lékařské mikrobiologie) i nemocničního týmu pro prevenci a kontrolu infekcí také ne vždy důsledné dodržování protiepidemických opatření, zejména pak hygieny rukou. Důležitou roli jistě hraje i někdy neuvážené empirické podání antibiotik. Trendy rezistence v Nemocnici Jindřichův Hradec, a.s. tak v posledních letech zdařile kopírují vývoj v republice i v EU, tedy rezistence významně narůstá.



Pro úplnost zařazují i grafické znázornění podílu (v procentech) ve sledovaném období nejčastěji se vyskytujících multirezistentních bakteriálních kmenů ze všech, v souvislosti s klinickým onemocněním, v Nemocnici Jindřichův Hradec, a.s. izolovaných kmenů stejného druhu. Opět byly z databáze vybírány jen první izoláty od pacienta.

Multirezistentní kmeny ale nebyly vždy izolovány v souvislosti s klinickým onemocněním pacienta, většina jich byla zachycena při vstupním screeningu a často se jednalo jen o osídlení pacienta bez souvislosti s klinickými projevy. Trend je i tak, bohužel, výmluvný.

5 Diskuse

Naše zkušenosti s problematikou multirezistentních bakterií i výsledky této retrospektivní práce jsou ve shodě s četnými studiemi z České republiky i ze zahraničí, které poukazují na rostoucí výskyt a na stoupající klinický význam multirezistentních bakterií v celé Evropě i ve světě.

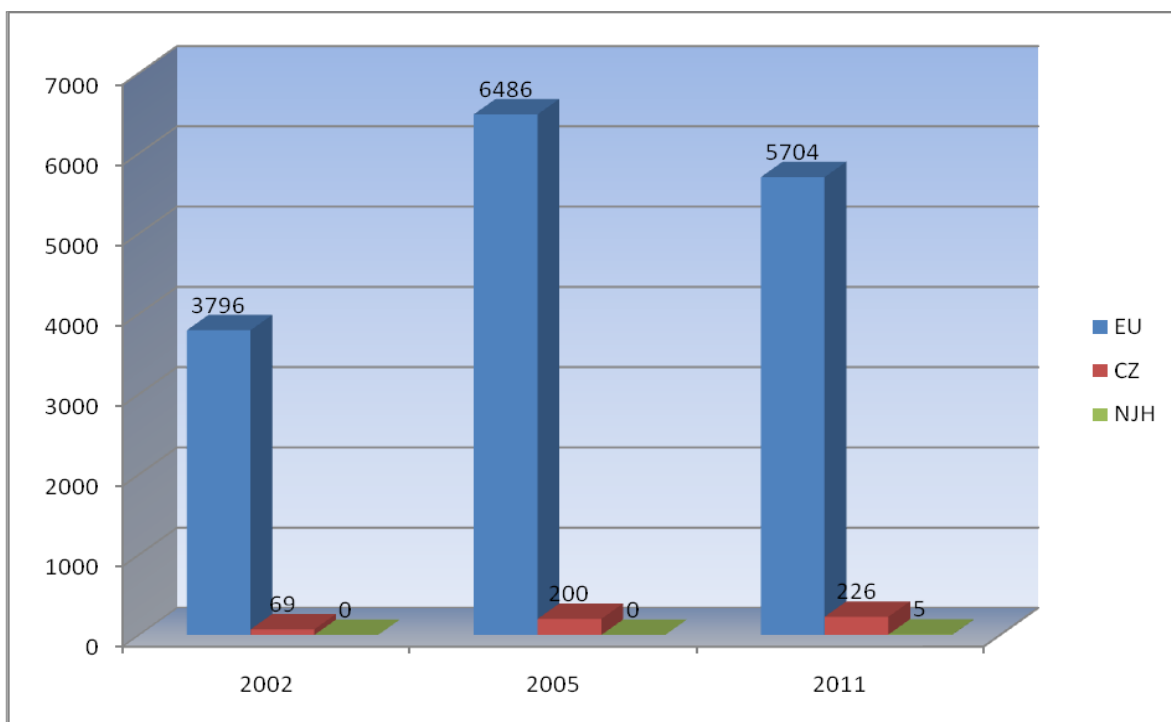
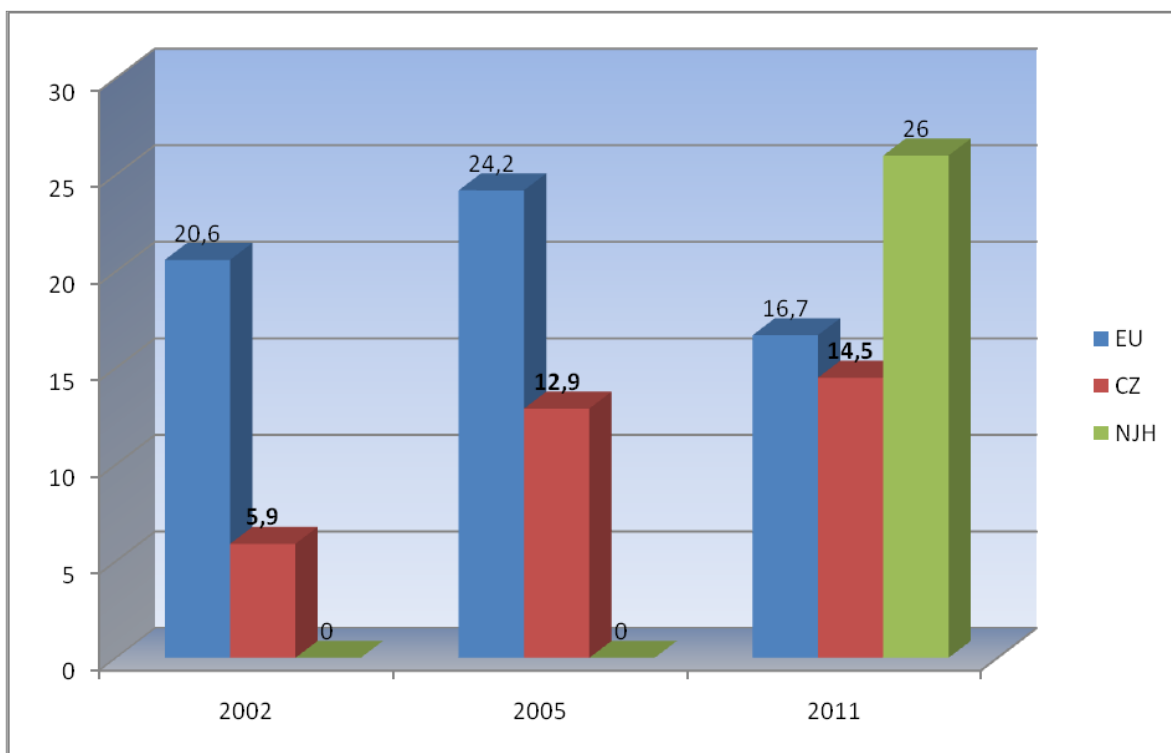
Projekt EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, dříve EARSS European Antimicrobial Resistance Surveillance Systém) shromažďuje a analyzuje údaje o vybraných původcích invazivních infekcí získané pomocí mezinárodní sítě národních systémů surveillance. Česká republika se těchto aktivit zúčastňuje od roku 2000, naše pracoviště se podílí na sběru dat od vstupu České republiky do systému. Využívám proto možnosti porovnat naše data z invazivních infekcí s českými a evropskými.

V našich níže uvedených grafech i na mapkách převzatých z EARS-net je vidět stoupající trend ve výskytu invazivních MRSA v Evropě, Česká republika se pohybuje v rozmezí od 6,9 % v roce 2002 (žlutá barva na mapkách) do 14,5 % v roce 2011 (okrová barva na mapkách), drží si tedy zatím poměrně dobrou pozici ve srovnání s ostatními zeměmi. Na mapkách je dobře patrný i tzv. severojižní gradient (zejména na mapě z roku 2005), tedy státy na severu Evropy jsou stále na velmi dobré úrovni rezistence, zatím co státy jižní si stojí významně hůře. Vysvětlení je v tradičně velmi důrazné antibiotické politice severovýchodních států, svoji roli asi hraje i odlišná mentalita, podnebí a ekonomická situace (nejhorší situace je v jižních evropských státech, které v poslední době mají i značné ekonomické problémy, Portugalsko, Itálie, Řecko a Rumunsko). Na mapě z roku 2011 je vidět zlepšení situace ve Francii, kde došlo k významným opatřením v antibiotické politice a omezení volného prodeje antibiotik.

Invazivní klebsiely byly zařazeny do EARS-net až v roce 2005. Obdobně jako u stafylokoků je na našich grafech i na mapkách převzatých z EARS-net opět vidět výrazný stoupající trend ve výskytu invazivních multirezistentních klebsiel v Evropě, Česká republika se pohybuje, na nelichotivé „červené“ úrovni 25-50 %, v rozmezí od

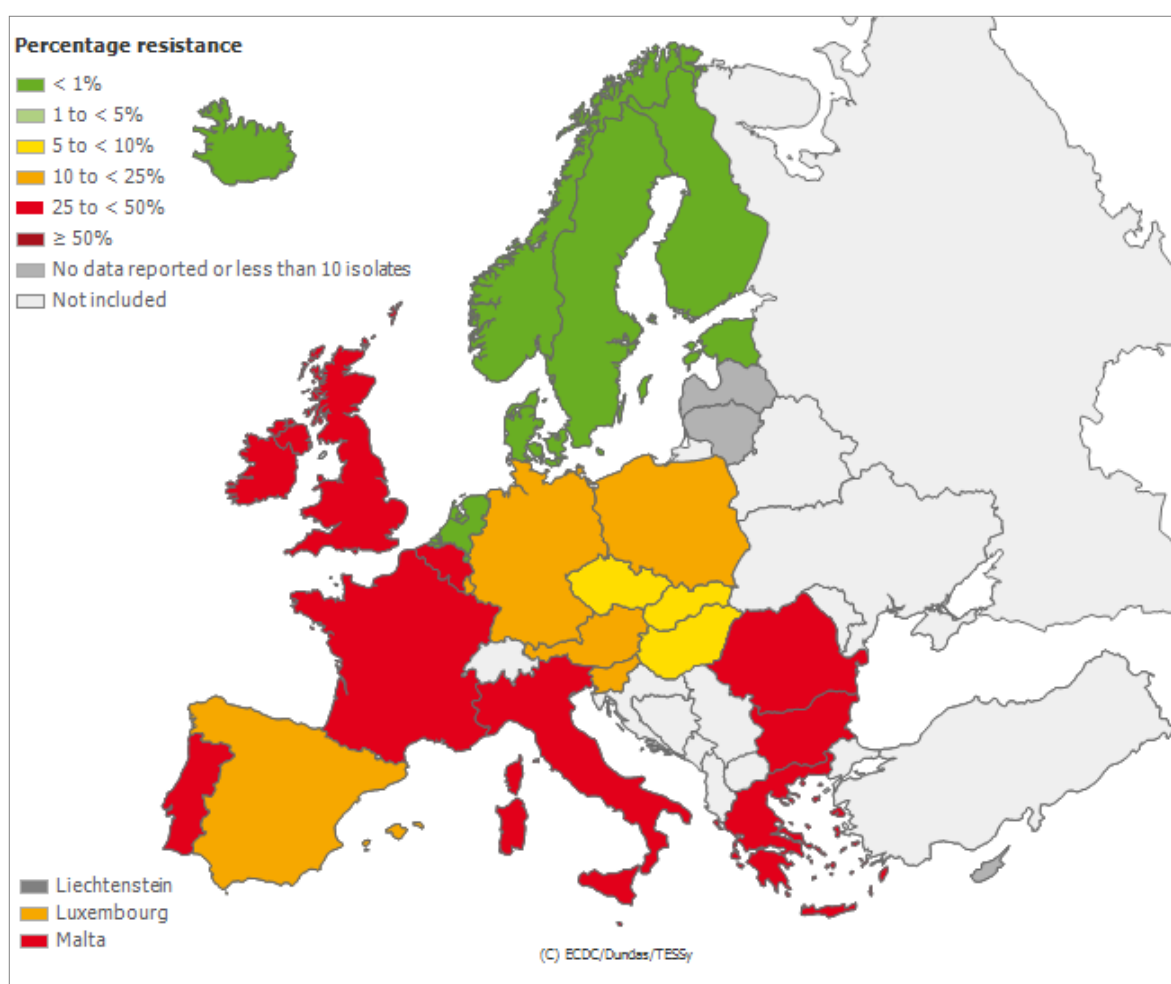
32,4 % v roce 2005 do 48,3 % v roce 2011, drží tedy krok s jižní Evropou, v roce 2005 ji dokonce předběhla.

Na grafech a mapkách je znatelný méně výrazný, ale vzestupný trend ve výskytu invazivních *Escherichia coli* s produkcí širokospektré betalaktamázy ESBL v Evropě, Česká republika se pohybuje, v rozmezí od 6,9 % v roce 2002 (žlutá barva na mapkách) do 14,5 % v roce 2011 (okrová barva na mapkách), drží si tedy zatím poměrně dobrou pozici ve srovnání s ostatními zeměmi.



Porovnání výskytu invazivních MRSA (horní graf v procentech, dolní v absolutních číslech) v letech 2002, 2005 a 2011;
Evropa vs. Česká republika vs. Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.

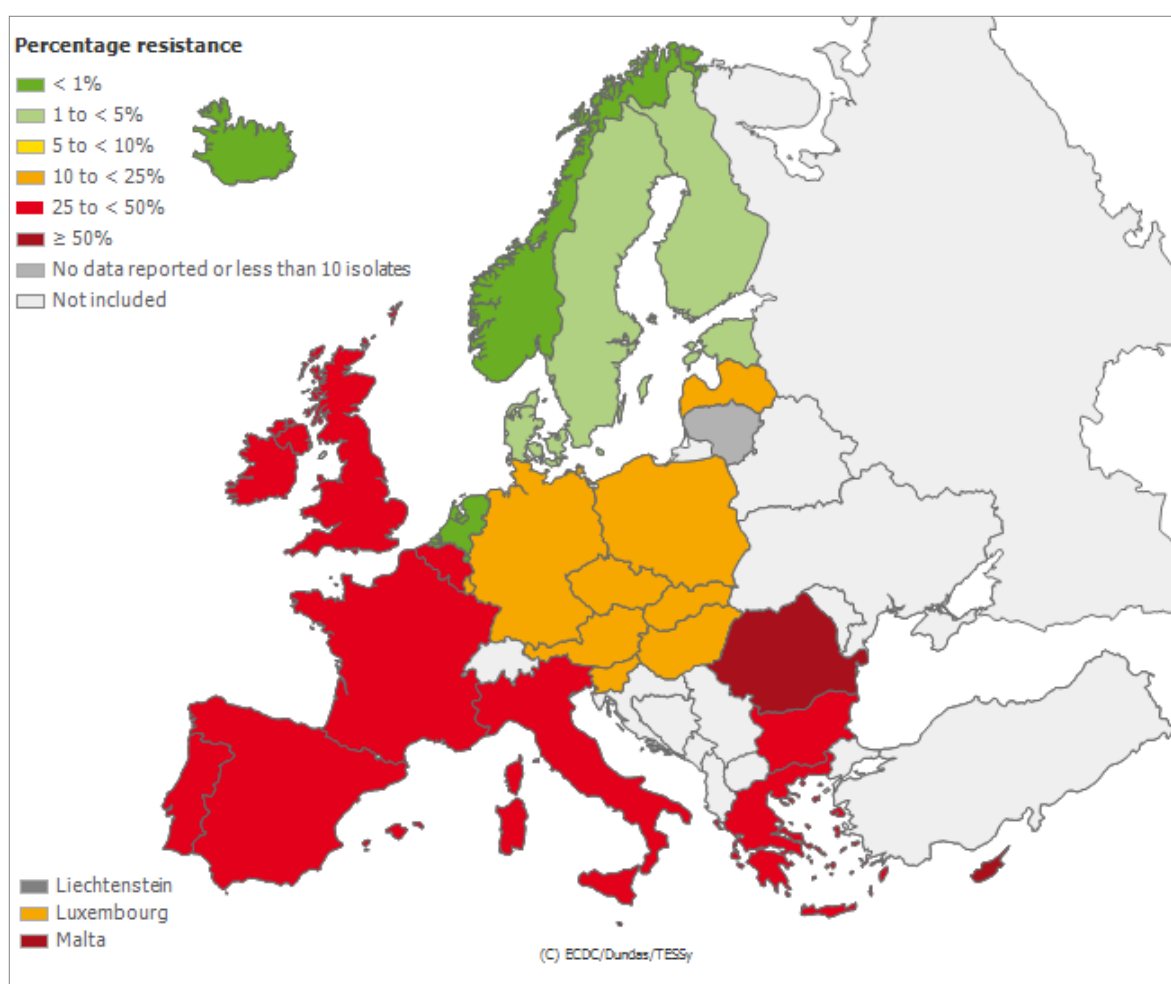
Proportion of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates in Participating Countries in 2002



Výskyt invazivních kmenů MRSA izolovaných v zemích zúčastněných v projektu EARS-net v roce 2002

Zdroj EUCAST www.eucast.org

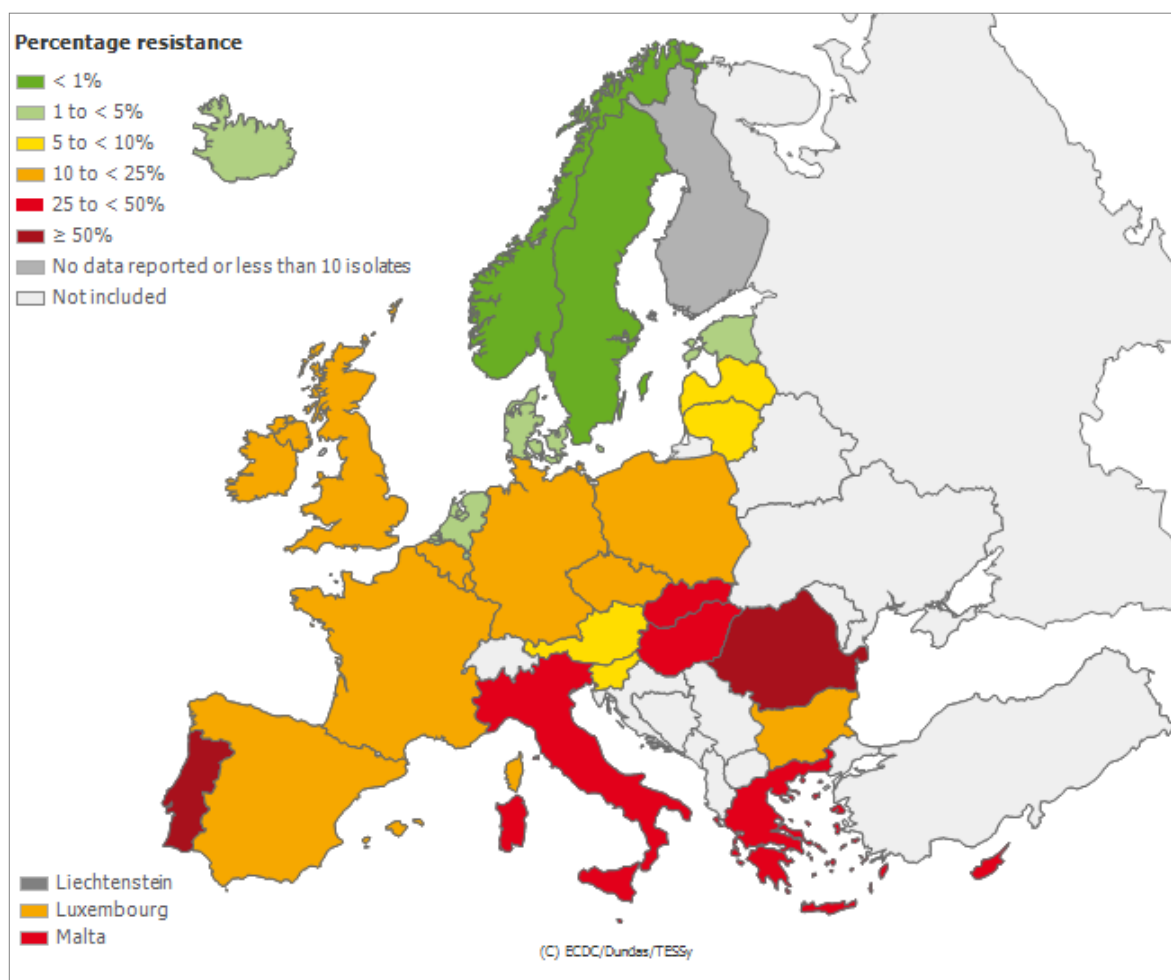
Proportion of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates in Participating Countries in 2005



Výskyt invazivních kmenů MRSA izolovaných v zemích zúčastněných v projektu EARS-net v roce 2005

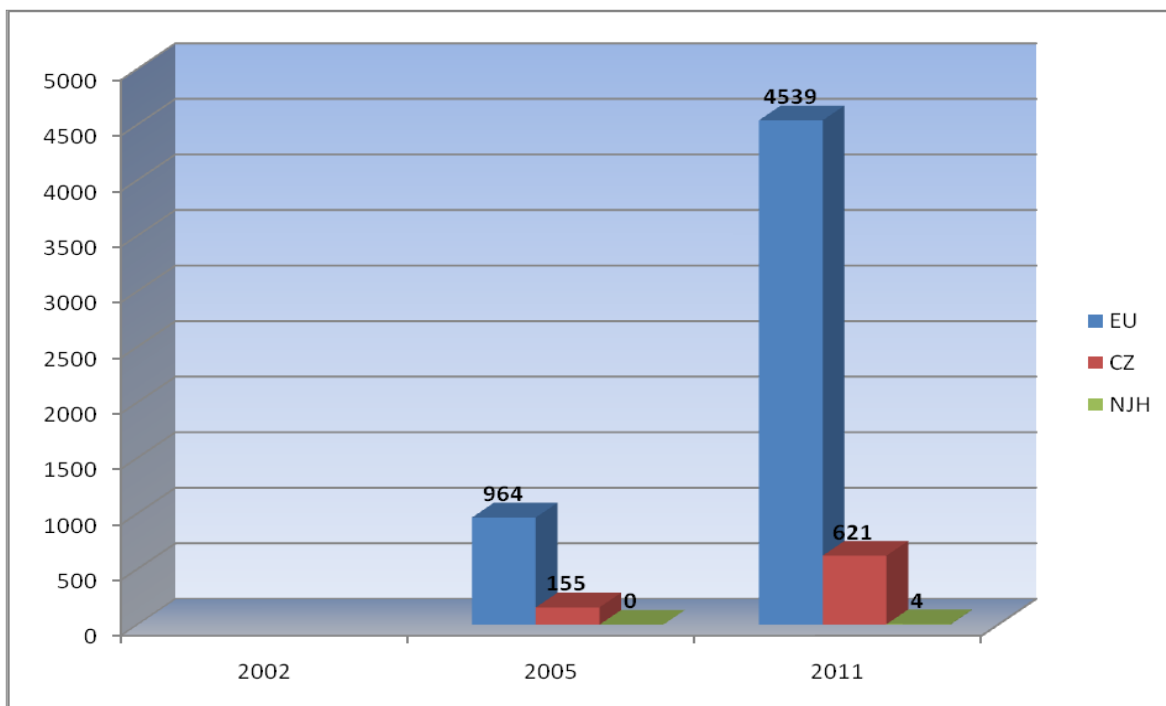
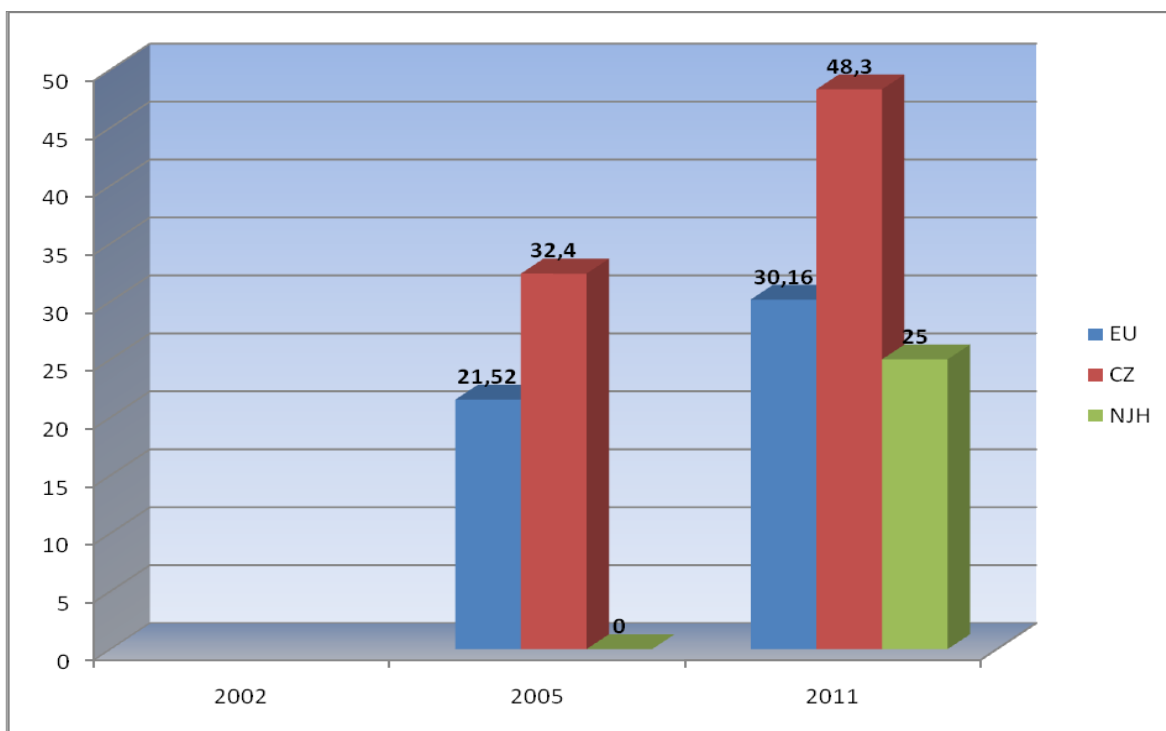
Zdroj EUCAST www.eucast.org

Proportion of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates in Participating Countries in 2011



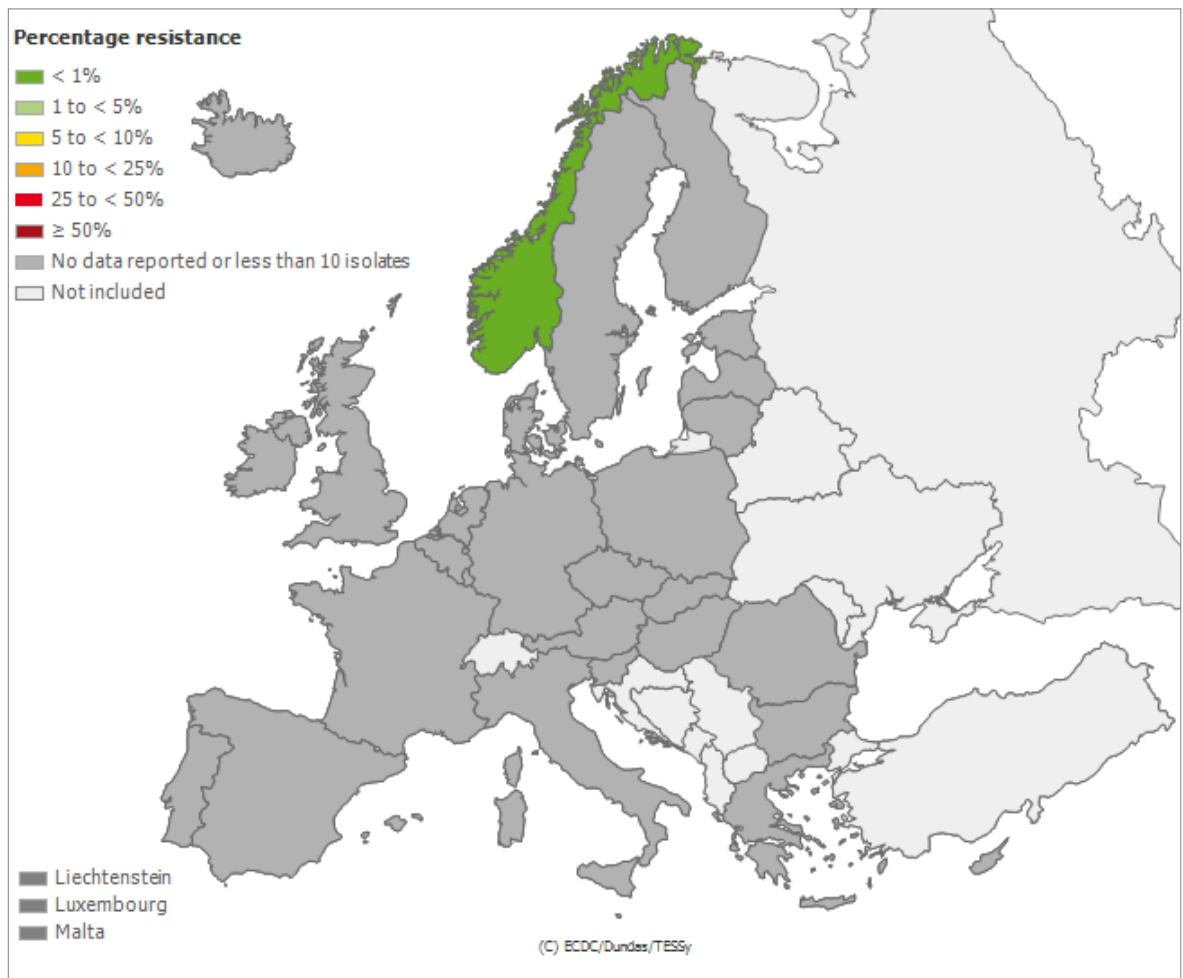
Výskyt invazivních kmenů MRSA izolovaných v zemích zúčastněných v projektu EARS-net v roce 2011

Zdroj EUCAST www.eucast.org



Porovnání výskytu invazivních kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL (horní graf v procentech, dolní v absolutních číslech) v letech 2002, 2005 a 2011; Evropa vs. Česká republika vs. Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.

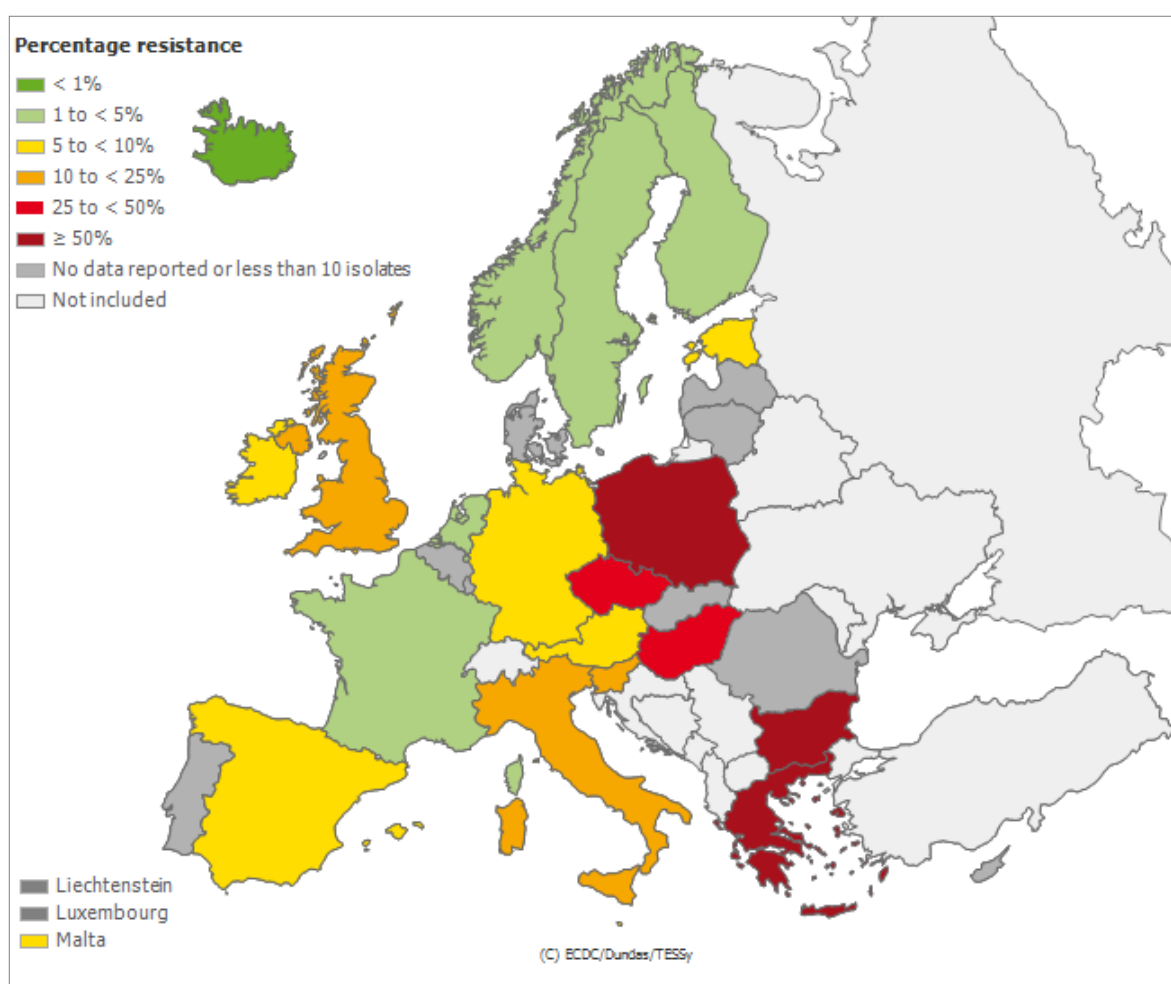
Proportion of 3rd gen. cephalosporins Resistant (R) *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Participating Countries in 2002



Výskyt invazivních kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL izolovaných v zemích zúčastněných v projektu EARS-net v roce 2002

Zdroj EUCAST www.eucast.org

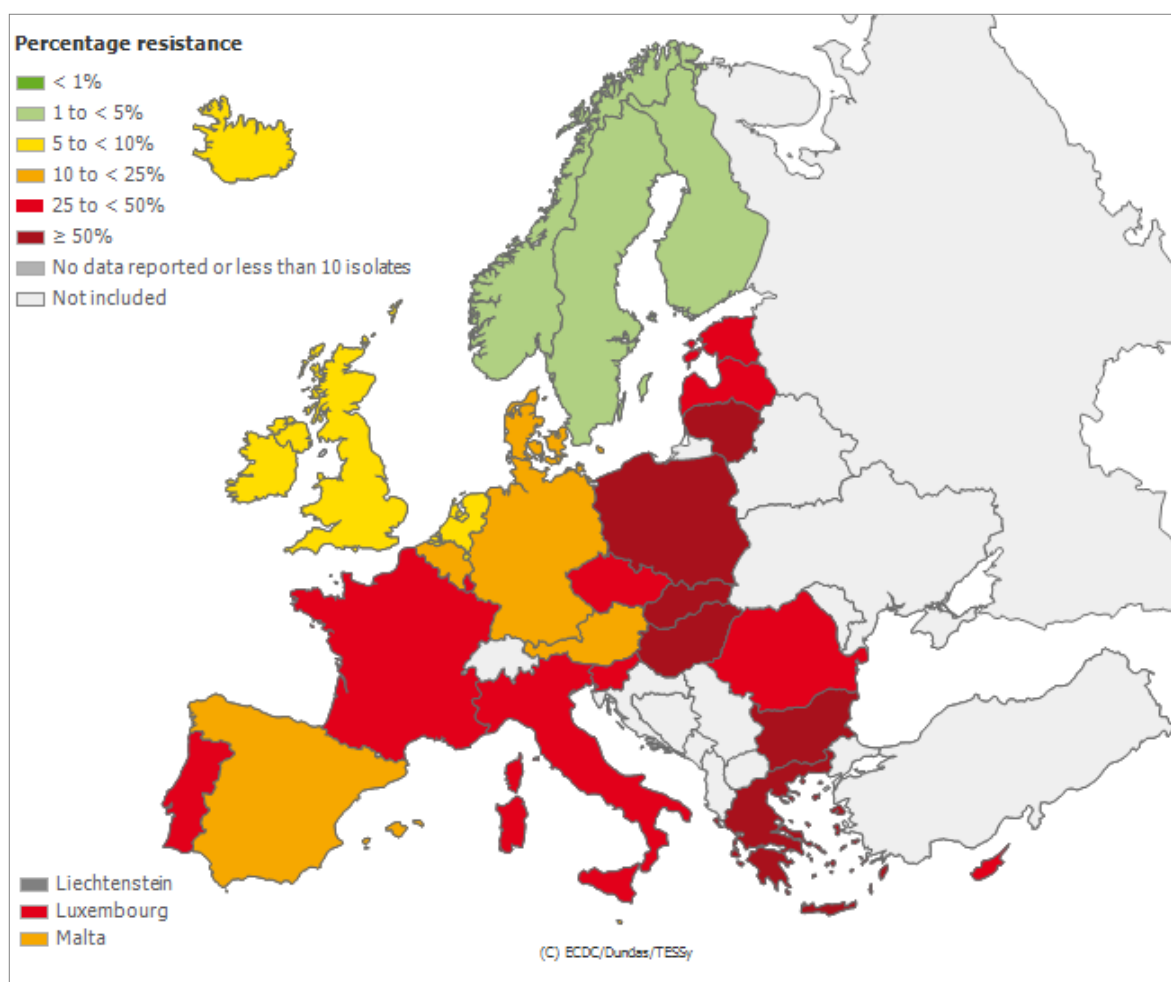
Proportion of 3rd gen. cephalosporins Resistant (R) *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Participating Countries in 2005



Výskyt invazivních kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL izolovaných v zemích zúčastněných v projektu EARS-net v roce 2005

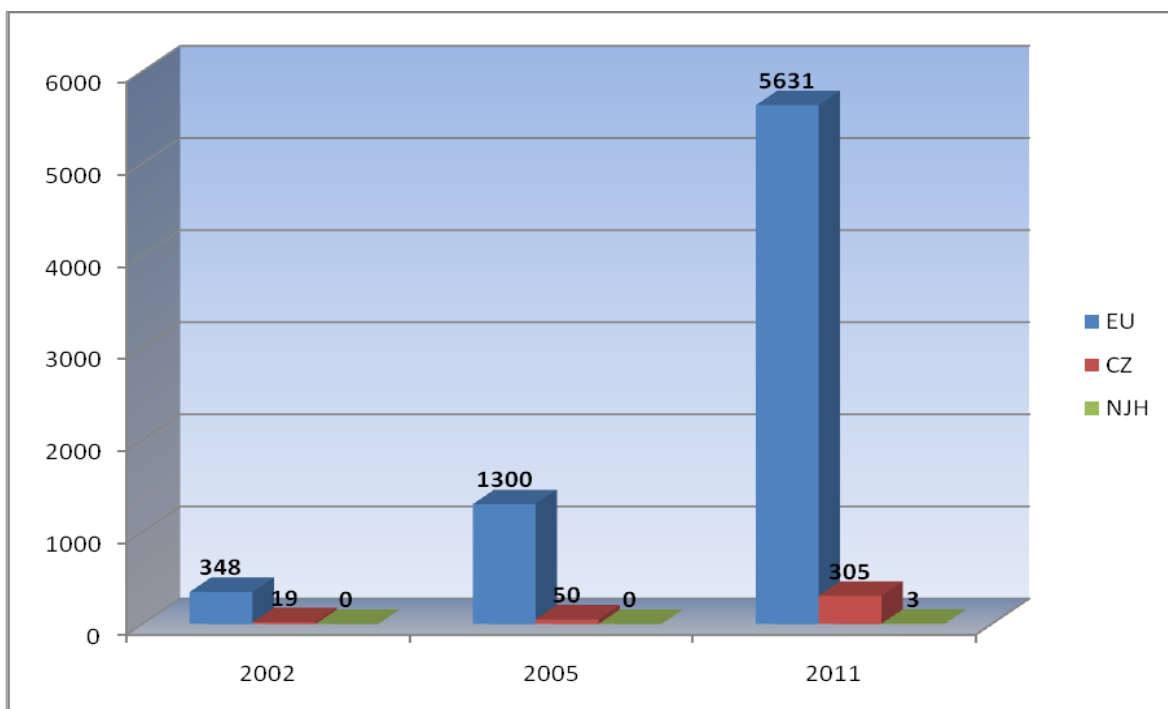
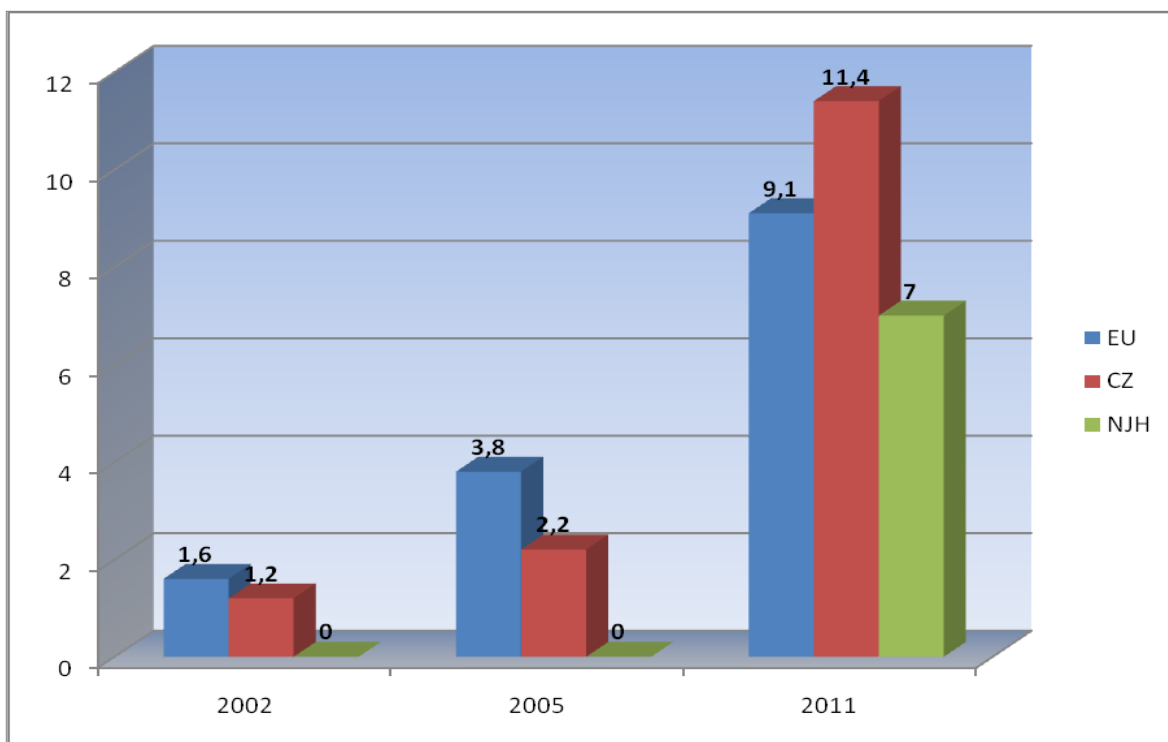
Zdroj EUCAST www.eucast.org

Proportion of 3rd gen. cephalosporins Resistant (R) *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Participating Countries in 2011



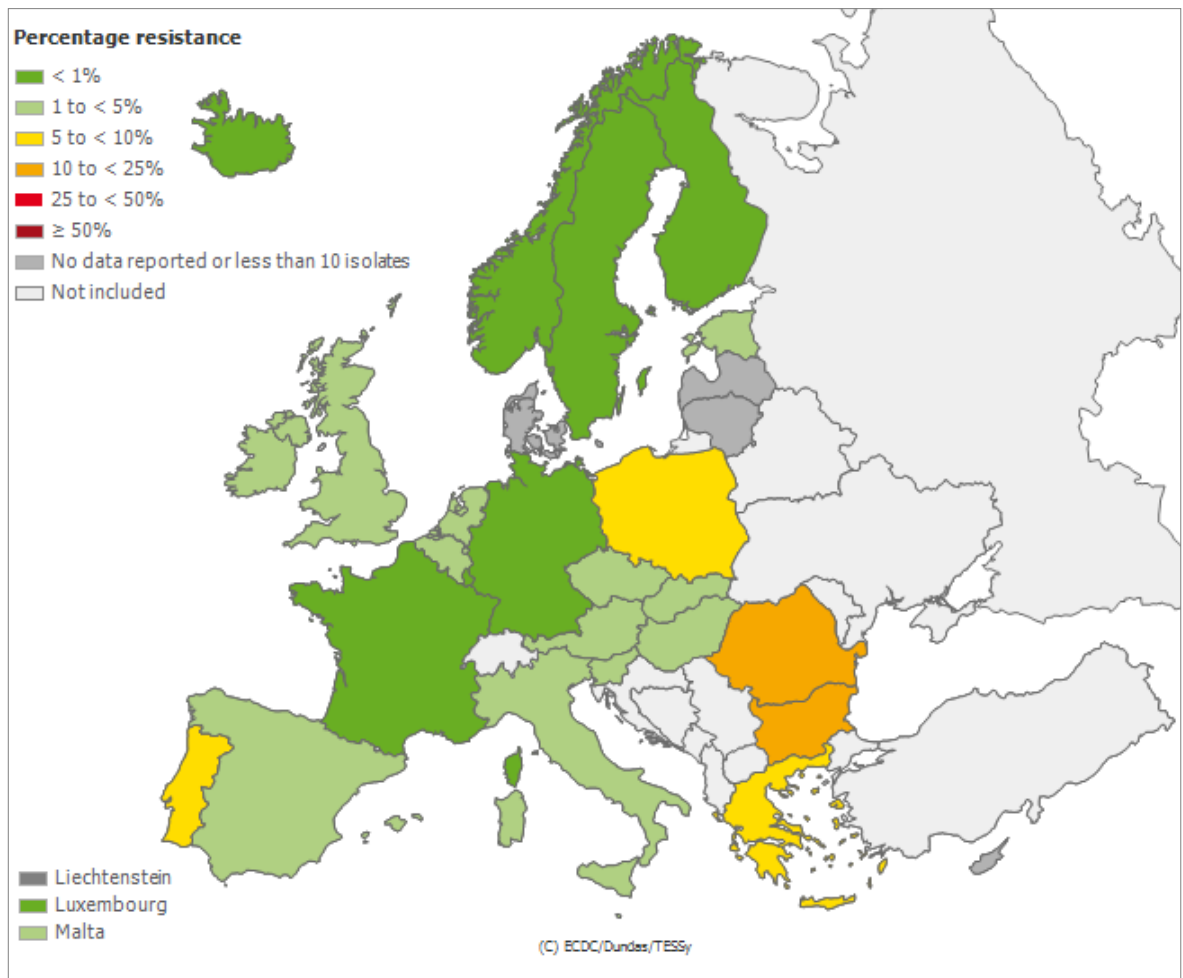
Výskyt invazivních kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL izolovaných v zemích zúčastněných v projektu EARS-net v roce 2011.

Zdroj EUCAST www.eucast.org



Porovnání výskytu invazivních kmenů *Escherichia coli* s produkcí ESBL (horní graf v procentech, dolní v absolutních číslech) v letech 2002, 2005 a 2011; Evropa vs. Česká republika vs. Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.

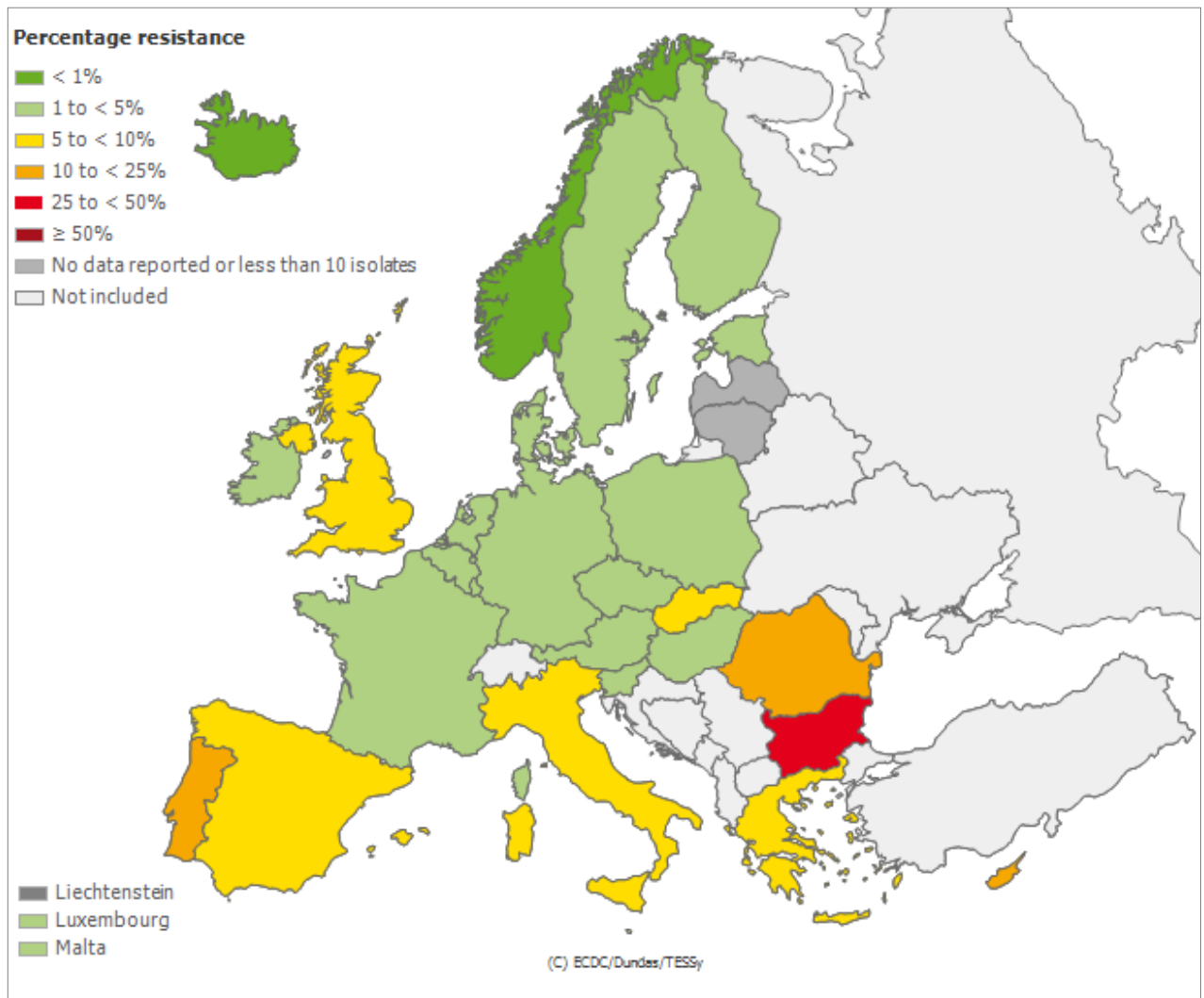
Proportion of 3rd gen. cephalosporins Resistant (R) *Escherichia coli* Isolates in Participating Countries in 2002



Výskyt invazivních kmenů *Escherichia coli* s produkcí ESBL izolovaných v zemích zúčastněných v projektu EARS-net v roce 2002

Zdroj EUCAST www.eucast.org

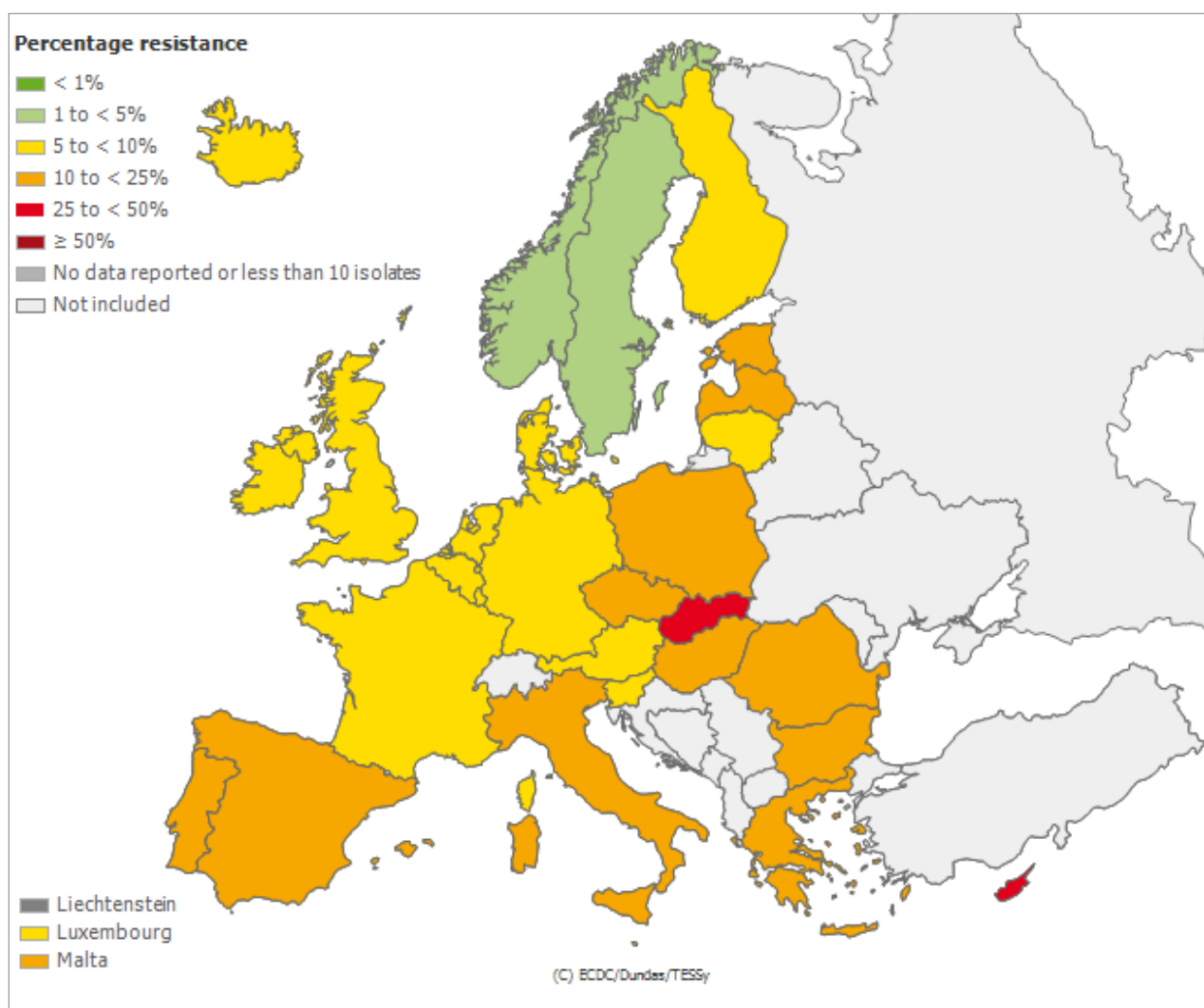
Proportion of 3rd gen. cephalosporins Resistant (R) *Escherichia coli* Isolates in Participating Countries in 2005



Výskyt invazivních kmenů *Escherichia coli* s produkcí ESBL izolovaných v zemích zúčastněných v projektu EARS-net v roce 2005

Zdroj EUCAST www.eucast.org

Proportion of 3rd gen. cephalosporins Resistant (R) *Escherichia coli* Isolates in Participating Countries in 2011



Výskyt invazivních kmenů *Escherichia coli* s produkcí ESBL izolovaných v zemích zúčastněných v projektu EARS-net v roce 2011

Zdroj EUCAST www.eucast.org

6 Závěr

Přestože jsme v posledních letech svědky výrazného medicínského pokroku, zůstávají nozokomiální infekce stále velkým problémem současné medicíny a jejich výskyt neustále roste. Komplexní poznání a uvědomění si patofyziologie jejich vzniku, šíření a možností prevence se zdá být cestou ke snížení jejich výskytu. Tento proces však vyžaduje širokou multidisciplinární spolupráci, počínaje od surveillance, přes důsledné uplatňování preventivních opatření až po přísnou antibiotickou politiku, jak dokazují četné odborné články a vědecké studie. V současné době je dostatek odborného materiálu s touto problematikou doporučovaný WHO a ECDC.

Také z našich dat je zřejmý v posledních letech významný nárůst výskytu multirezistentních kmenů, převážná většina z nich pak jsou kmeny nemocniční. Trendy rezistence v Nemocnici Jindřichův Hradec, a.s. V posledních letech zdařile kopírují vývoj v republice i v EU.

Nejvíce izolátů MRSA a enterobaktérií s produkcí ESBL se vyskytuje na interním oddělení. Důvodů je několik. V první řadě naprosto nevyhovující prostorové uspořádání ve staré již dosluhující budově, poměrně častá empirická antibiotická terapie a v neposlední řadě, a to i přes všechnu snahu pracoviště nemocniční hygieny a epidemiologie i celého nemocničního týmu pro prevenci a kontrolu infekcí, jsou to také ruce zdravotnického personálu.

Na oddělení intenzivní péče jsou rezistentní kmeny zavlékány nejvíce zvenčí z velkých nemocnic (ty jsou odhaleny obvykle brzy díky důsledně prováděným preventivním stěrům před přijetím pacienta na oddělení) a občas i s překladem pacienta ze standardního, nejčastěji opět z interního oddělení.

Tedy i z našich zkušeností vyplývá, že ruka zdravotnického personálu je nejčastějším přenašečem rezistentních nemocničních bakterií, i přes zdůrazňování hygienických návyků a důsledné uplatňování bariérového ošetrovacího režimu.

7 Seznam použité literatury

1. Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Phil Trans R Soc Lond Biol.* B289: 321-331, 1980
2. Bencko V. Odkaz I. F. Semmelweise dnešku, klíčové etapy vývoje a nejzávažnější současné problémy nemocniční hygieny. *Prakt Lék.* 87: 68-72, 2007
3. Bencko V, Schejbalová M. From Ignaz Semmelweis to the present: crucial problems of hospital hygiene. *Indoor Built. Environ.* 15: 3-8, 2006
4. Bennett PM. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 43: 1-4, 1999
5. Bennett PM, Livesey CT, Nathwani D, Reeves DS. An assessment of the risks associated with the use of antibiotic resistance genes in genetically modified plants: report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *J Antimicrob Chemother.* 53: 418-431, 2004
6. Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *B J Pharm.* 153: 207-209, 2008
7. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 14: 933-951, 2001
8. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 39: 1211-1233, 1995
9. Carattoli A, Bertini A, Villa L. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microb Meth.* 63: 219-228, 2005
10. Carattoli A. Plasmid mediated Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica*. *Curr Issues Mol Biol.* 5: 113-122, 2008
11. Černohorská L, Andrysík T. Detekce beta-laktamáz typu AmpC u gramnegativních bakterií izolovaných z moče. *Epid Mikrob Imunol.* 57: 141-146, 2008

12. D'Costa V, Wright GD. Biochemical logic of antibiotic inactivation and modification. In MAYERS, DL. Antimicrobial Drug Resistance, Volume 1 Mechanisms of Drug Resistance. New York: Humana Press. 81-95, 2009 ISBN 978-1-60327-592-7
13. DiPersioa JR, Deshpandeb LM, Biedenbachb DJ, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Evolution and dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and molecular report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2003). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 51: 1-7, 2005
14. Emmerson AM, Enstone JE, Griffin M. The Second National Prevalence Survey of Infection in Hospitals- overview of the results. *J Hosp Infect.* 32: 175-190, 1996
15. Endiamini A, Carias LL, Hujer AM, Bethel CR. Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing blaKPC in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 2680-2682, 2008
16. Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microb Infect Dis.* 10: 272-288, 2004
17. Garcillán-Barcia MP, Francia MV, de la Cruz F. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev.* 33: 657-687, 2009
18. Hanson ND. AmpC β -lactamases: what do we need to know for the future? *J Antimicrob Chemother.* 52: 2-4, 2003
19. Heyland DK, Cook DJ, Griffith L, Keenan SP, Brun Buisson, C. for the Canadian Critical Care Trials Group. The attributable morbidity and mortality of ventilator-associated pneumonia in the critically ill patient. *Am J Respir Crit Care Med.* 159:1249-1256, 1999
20. Hrabák J, Bergerová T, Žemličková H, Urbášková P. Detekce širokospektrých β -laktamáz (ESBL), β -laktamáz AmpC, metalo- β -laktamáz

- (MBL) a karbapenemáz u gramnegativních tyček. Zprávy CEM. 18(3): 100-106, 2009
21. Hrabák J, Chudáčková E. Rezistence enterobakterií ke karbapenemům. *Epid Mikrob Imunol.* 57: 125-136, 2008
 22. Hrabák J. Klinicky významné β -laktamázy gramnegativních bakterií: širokospektré β -laktamázy (ESBL). *Epid Mikrob Imunol.* 56: 103-111, 2007
 23. Hrabák J, Zemanová A, Chudáčková E. Mobilní genetické elementy v epidemiologii rezistence bakterií k antibiotikům. *Epid Mikrob Imunol.* 59: 55-66, 2010
 24. Chlebicki MP, Oh HM. Extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *E. coli* and *Klebsiella* spp. in a Singapore hospital: Clinical spektrum. *Ann Acad Med Singapore.* 33: 302-306, 2004
 25. Inan D, Saba R, Gunseren F, Ongut G, Turhan O, Yalcin AN, Mamikoglu L. Daily antibiotic cost of nosocomial infections in a Turkish university hospital. *BMC Infect Dis.* 5: 5, 2005
 26. Jacoby GA. History of drug-resistant microbes. In MAYERS, DL. *Antimicrobial Drug Resistance, Volume 1 Mechanisms of Drug Resistance.* New York: Humana Press. 3-7, 2009 ISBN 978-1-60327-592-7
 27. Jacoby GA, Walsh KE, Walker V. Identification of extended-spectrum, AmpC, and carbapenem-hydrolyzing β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by disk tests. *J Clin Microbiol.* 44: 1971-1976, 2003
 28. Khanfar HS, Bindayna KM, Senok AC, Botta GA. Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: trends in the hospital and community settings. *J Infect Dev Ctries.* 3: 295-299, 2009
 29. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* 11: 315-317, 1983

30. Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky L, Schwaber MJ. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 3026-3029, 2007
31. Mahillon J, Chanpodler M. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 725-774, 1998
32. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Rev Microbiol.* 4: 608-620, 2006
33. Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, Farr BM. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and enterococcus. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 24: 362-386, 2003
34. Novick RP. Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev.* 51: 381-395, 1987
35. Paterson D L, Bonomo R A. Extended-spectrum beta-lactamases. A clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 18: 657-686, 2005
36. Podstatová H. *Základy epidemiologie a hygieny.* 1. Vydání. Praha: Galén. 88-94, 2009 ISBN 978-80-7262-597-0
37. Poirel L, Lartigue MF, Decousser JW, Nordmann P. *ISEcp1B*-mediated transposition of blaCTX-M in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 447-550, 2005
38. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 56: 20-51, 2005
39. Rawlings DE, Tietze E. Comparative biology of IncQ and IncQ-like plasmids. *Microb Mol Biol Rev.* 65: 481-496, 2001
40. Roberts AP, Chanpodler M, Courvalin P, Guédon G. Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid.* 60: 167-173, 2008
41. Salyers AA, Shoemaker NB, Stevens AM, Li LY. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol Rev.* 59: 579-590, 1995
42. Serefhenaglu K, Turan H, Timurkaynak FE, Arslan H. Bloodstream infections caused by ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae*: risk factors for multidrug-resistance. *Braz J Infect Dis.* 13: 403-407, 2009

43. Shlaes DM, Gerding DN, John JF jr, Craig WA, Bornstein DL, Duncan RA, Eckman MR, Farrer WE, Greene WH, Lorian V, Levy S, McGowan JE Jr, Paul SM, Ruskin J, Tenover FC, Watanakunakorn C. Society for Healthcare epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on Prevention of Antimicrobial Resistance: Guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 18: 275-291, 1997
44. Schejbalová M, Bencko V. Historie, současné problémy a šance v prevenci nozokomiálních nákaz. *Prakt Lék.* 88: 293-295, 2008
45. Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D, Carmeli Y. High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriae. *Antimicrob Agents and Chemother.* 49: 2137-2139, 2005
46. Šrámová H a kol. Nozokomiální nákazy. 1. Vydání. Praha: Maxdorf-Jesenius. 10-13, 1995 ISBN 80-85912-00-7
47. Thomson KS. Controversies about Extended-Spectrum and AmpC beta-lactamases. *Emerg Inf Dis.* 7: 333-336, 2001
48. Villegasa MV, Correea A, Perez F, Miranda MC, Zuluaga T, Quinn JP; Colombian nosocomial Resistance Study Group (See). Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli isolates from Colombian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 49: 217-222, 2004
49. <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/guidelines.html>
50. <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx>
51. http://whqlibdoc.who.int/searo/2002/SEA_HLM_343.pdf
52. <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>