

Fakulta zdravotnických studií

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví (B5345)

Vendula Vlková

Studijní obor: Zdravotní laborant (5345R020)

Antibiotika a rezistence některých bakteriálních druhů

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Chudějová

Plzeň 2018

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 27. 3. 2018

.....

vlastnoruční podpis

ABSTRAKT

Příjmení a jméno: Vendula Vlková

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Antibiotika a rezistence některých bakteriálních druhů

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Chudějová

Počet stran: číslované: 58 nečíslované: 15

Počet příloh: 0

Počet titulů použité literatury: 24

Klíčová slova: Antibiotika, bakteriální rezistence, *Enterobacteriaceae*, karbapenemasy

Rezistence na antibiotika je poslední dobou velmi skloňovaný problém, který začíná být stále závažnější. Antibiotika se právem řadí k nejvýznamnějším medicínským objevům 20. století a jejich použití vedlo k vymizení řady chorob, či alespoň k výraznému snížení jejich výskytu a nebezpečnosti. Schopnost bakterií bránit se účinku antibiotik je z tohoto důvodu obávaným problémem. V posledních letech ustupují do pozadí klasické rezistence jako methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, nebo širokospektré β -laktamasy. Předmětem zájmu se naopak stávají rezistence k záložním antibiotikům, jako jsou karbapenemy a kolistin. Tato práce přehledně zpracovává problematiku antibiotik, jejich klasifikaci a použití. Dále se zabývá mechanismy rezistencí, jejich přenosem a popisuje nejvýznamnější rezistence posledních let. Praktická část je zaměřena na detekci produkce karbapenemas u enterobakterií na základě stanovení fenotypu za použití inhibitorů.

ABSTRACT

Surname and name: Vendula Vlková

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Antibiotics and resistance to some bacterial species

Consultant: Mgr. Kateřina Chudějová

Number of pages: numbered: 58 unnumbered: 15

Number of appendices: 0

Number of literature items used: 24

Key words: Antibiotics, bacterail resistance, *Enterobacteriaceae*, carbapenemases

Resistance to antibiotics has been a very discussed problem, which is becoming more serious in last years. Antibiotics are rightly ranked among the most important medical discoveries of the 20th century, and their use has led to the disappearance of many diseases, or at least to a significant reduction in their incidence and dangerousness. Therefore, the ability of bacteria to prevent antibiotics is a dreaded problem. In last years classical resistance, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or broad-spectrum β -lactamases, has moved backward. On the contrary, the subject of interest becomes resistance to „last-line“ antibiotics such as carbapenems and colistin. This thesis clearly deals problematic with antibiotics, their classification, and use. It also deals with resistance mechanisms, their transmission and describes the most significant resistance of recent years. The practical part is focused on the detection of the production of carbapenemases in enterobacteria based on the determination of the phenotype using inhibitors.

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji paní Mgr. Kateřině Chudějové za odborné a profesionální vedení mé kvalifikační práce, poskytování cenných rad a materiální podkladů. Také děkuji paní MVDr. Václavě Šmírové za poskytnutí materiálních podkladů.

Obsah

ÚVOD	10
TEORETICKÁ ČÁST	11
1 ANTIBIOTIKA.....	12
1.1 Typy účinku antimikrobiálních látek	13
1.2 Mechanismus účinku	13
1.2.1 Inhibice syntézy buněčné stěny.....	13
1.2.2 Poškození syntézy cytoplazmatické membrány	14
1.2.3 Inhibice proteosyntézy	15
1.2.4 Porucha syntézy nukleových kyselin	15
1.2.5 Antimetabolity	15
1.3 Spektrum účinku	16
1.3.1 Kombinace antibiotik.....	16
1.4 Zásady antimikrobiální terapie	17
1.5 Nežádoucí účinky antibiotik	18
2 KLASIFIKACE ANTIBIOTIK.....	20
2.1 β-laktamová antibiotika	20
2.1.1 Peniciliny	21
2.1.2 Cefalosporiny.....	23
2.1.3 Ostatní β-laktamová antibiotika	25
2.2 Tetracykliny	25
2.3 Aminoglykosidy	26
2.4 Makrolidy	27
2.5 Linkosamidy.....	28
2.6 Amfenikoly	29
2.7 Polypeptidová antibiotika	29
2.7.1 Polymyxiny	29
2.7.2 Glykopeptidová antibiotika.....	30
2.8 Ansamycinová antibiotika.....	30
2.9 Pyrimidiny a sulfonamidy	30
2.10 Nitroimidazoly a nitrofurany	31
2.11 Chinolony.....	32
2.12 Nově schválená antibiotika.....	32
3 REZISTENCE MIKROORGANISMŮ K ANTIBIOTICKÝM LÁTKÁM	34
3.1 Vznik a mechanismus rezistence	35
3.1.1 Modifikace molekuly antibiotika	36
3.1.2 Změna permeability bakteriální stěny	36
3.1.3 Změna vazebného místa	37
3.1.4 Úprava bakteriálního metabolismu	37

3.2	Přenos rezistence.....	37
3.2.1	Vertikální přenos.....	37
3.2.2	Horizontální přenos.....	38
3.3	Nejsledovanější rezistence současnosti.....	40
3.3.1	MRSA.....	40
3.3.2	VRE.....	41
3.3.3	Karbapenemasy.....	42
3.3.4	Rezistence ke kolistinu.....	46
3.3.5	Multirezistence.....	47
3.4	Faktory podílející se na vzniku rezistence.....	48
	PRAKTICKÁ ČÁST.....	49
4	CÍL PRÁCE.....	50
5	METODIKA VÝZKUMU.....	51
6	POUŽITÝ MATERIÁL.....	52
6.1	Bakteriální kmeny.....	52
6.2	Použité agary.....	52
6.3	Použité ATB disky a MIC.....	53
6.4	Roztoky.....	53
6.5	Další použité pomůcky.....	53
7	PROVEDENÍ VÝZKUMU.....	53
7.1	Stanovení MIC bakterií.....	54
7.2	Fenotypový test karbapenemas.....	55
8	VÝSLEDKY.....	56
8.1	Výsledky MIC.....	56
8.2	STANOVENÍ FENOTUPŮ IZOLÁTŮ.....	59
8.2.1	KPC (skupina A).....	59
8.2.2	Skupina B.....	60
8.2.3	OXA-48 (skupina D).....	63
9	DISKUZE.....	64
10	ZÁVĚR.....	66
11	POUŽITÁ LITERATURA.....	67
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	70
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	71
	SEZNAM TABULEK.....	72

ÚVOD

Antibiotika (ATB), jejich používání a vznik rezistence patří v současnosti k jedním nejdiskutovanějším tématům. Objev ATB patří k velkým mezníkům v lékařství. Pomáhala v léčbě infekcí, které byly do té doby smrtelné a lidé si tak zvykli používat je v každodenním životě. Ovšem nyní nastává doba, kdy se vyskytují bakteriální kmeny rezistentní k některým používaným ATB. Tento problém zapříčinilo nadměrné a zbytečné používání ATB nejen v medicíně ale hlavně v hospodářství. Zajímavé je že v roce 2009 bylo spotřebováno 3 miliony kilogramů ATB v humánní medicíně a v roce 2010 bylo použito 13 milionů kilogramů ATB u zvířat. Vznikají tedy pořád další a další bakteriální kmeny, rezistentní k různým ATB látkám. Může nás tak napadnout myšlenka, že tento problém by vyřešila syntéza nových ATB. Takový to proces je ale časově i finančně náročný, takže než vznikne nové ATB, uplyne několik let. (Součková, Ruzsíková 2016)

Průzkumy WHO (World health organisation) ukazují na znepokojivá fakta. Na infekční onemocnění způsobené rezistentnímu bakteriemi zemře v Evropě ročně 25 000 lidí a každým rokem se toto číslo zvyšuje. Léčba takových infekcí je velmi nákladná (až 1,5 miliardy EUR ročně) a až stonásobně vyšší než léčba infekcí způsobených citlivými kmeny. Ve velmi blízké době je tak lidstvo ohroženo nárůstem rezistence do takového stavu, že se dnes zcela běžně léčitelná onemocnění stanou obtížně léčitelná nebo v horším případě neléčitelná. Mělo by se tak zásadně změnit používání ATB v medicíně i hospodářství. Pokud by nebyly dostupné nové látky účinné na multirezistentní bakterie, nastane situace, kdy se infekční onemocnění stanou nejčastější příčinou smrti. (Nyč, 2017)

TEORETICKÁ ČÁST

1 ANTIBIOTIKA

Látky používané k profylaxi a k terapii infekčních onemocnění se nazývají antimikrobiální látky. Mezi nejznámější a nejčastější antimikrobiální látky řadíme antibiotika, která se používají pro léčbu infekcí bakteriálního původu. Mezi nejčastější producenty antibiotik patří plísně. I když jsou antibiotika chemicky modifikována, popřípadě syntetizována chemicky, pořád jsou nazývány látkami přírodními. (Votava a kol., 2010)

Koncem 19. století objevil francouzský medik Ernest Duchesne první systémově použitelné antibiotikum, penicilin. Avšak tento objev upadl v zapomnění. V roce 1928, když Alexander Fleming odcházel ze své laboratoře, zapomněl na stole otevřenou petriho misku s kultivací stafylokoků. Když se po delší době vrátil zpátky, našel kultivaci stafylokoků kontaminovanou plísní *Penicillium notatum*. Flemingovi se ale nepodařilo získat penicilin v dostatečně stabilní formě, která by se dala klinicky využít. Až začátkem druhé světové války se podařilo Floreyovi a Chainovi získat jeho stabilní formu a v roce 1945 za to společně s Flemingem získali Nobelovou cenu. V roce 1952 byla udělena další Nobelova cena Waksmanovi za izolaci streptomycinu. (Votava, 2001)

Aby se mohly antimikrobiální látky používat jako léčiva, musí zabíjet mikroby nebo alespoň potlačovat jejich aktivitu. Musí být však podávány v takových dávkách, které nepoškodí organismus. Jedná se o selektivní toxicitu, která se určí chemoterapeutickým indexem (to je poměr mezi dávkou toxickou pro hostitele a dávkou toxickou pro mikroorganismus). Čím vyšší chemoterapeutický index je, tím je antimikrobiální látka pro makroorganismus – člověka – bezpečnější. Takovou látku lze použít pro terapii místní (lokální) nebo i celkovou. Mezi nejméně toxické antibiotikum patří penicilin. Působí na syntézu bakteriální stěny, která se v buňkách hostitele nenachází. Proto je jeho chemoterapeutický index vysoký, více než 10^7 . (Votava, 2001)

1.1 Typy účinku antimikrobiálních látek

U antibiotik lze rozlišit účinek baktericidní či bakteriostatický. Jedná se o primární efekt mechanismu působení antibiotik na bakterie, při kterém je zasažen růst, množení bakterií a jejich života schopnost.

Baktericidní látky působí rychle, ireverzibilně a usmrcují bakteriální buňku. Jejich klinický účinek se projevuje docela rychle, obvykle to do 48 hodin. Baktericidní ATB se podávají při léčbě u závažných klinických stavů a u pacientů se sníženou obranyschopností. Mezi baktericidní antibiotika patří např. β -laktamy, aminoglykosidy, polypeptidy, glykopeptidy a ansamyciny.

Bakteriostatické látky potlačují metabolismus mikroorganismů, zastavují reverzibilně jejich růst a množení. Klinický účinek lze pozorovat až za 3–4 dny. Po vysazení bakteriostatických látek se mohou mikroby opět množit. Používají u pacientů s dobrou obranyschopností, nutné je však dodržet dávkování a délku léčby. Bakteriostatická antibiotika jsou např. tetracykliny, chloramfenikol, makrolidy a linkosamidy. (Votava, 2001; Jedličková, 2004; Lochmann, 1999)

1.2 Mechanismus účinku

Jedná se o sekundární efekt působení antibiotik a uplatňuje se až při vyšších koncentracích antibiotického přípravku a působí na více struktur najednou. Mezi mechanismy účinku patří: inhibice syntézy buněčné stěny, poškození syntézy cytoplazmatické membrány, inhibice proteosyntézy, porucha syntézy nukleových kyselin či produkce antimetabolitů. (Lochmann, 1999)

1.2.1 Inhibice syntézy buněčné stěny

Buněčná stěna vyskytující se u bakterií, je odlišná od buněčné stěny, která se nachází u buněk v lidské tkáni. Všechny látky, které buněčnou stěnu bakterií ničí, poškozují nebo zabraňují její tvorbě, mají vysoký stupeň selektivní toxicity. Proto je většina těchto antibiotik pro lidské tělo málo toxické. Významnou složkou bakteriální stěny je murein, který tvoří jedinou obrovskou makromolekulu. Murein se uvnitř

makromolekuly různě mnohočetně propojuje, následně dochází k jeho zesíťování, ztuhnutí a zpevnění. Tím určuje velikost a tvar celé buňky.

Preparáty inhibující syntézu buněčné stěny jsou: penciliny, bacitracin, cefalosporiny, vankomycin a cykloserin. Penicilin a cefalosporiny jsou antibiotika, které velmi účinně inhibují zapojování kyseliny glutamové v konečné fázi syntézy mureinu, v jeho zesíťování. Tyto antibiotika, ale nebrzdí tvorbu ostatních buněčných komponent. Působí jen na bakterie ve stadiu růstu. Čím rychleji bakterie rostou, tím lépe účinkují peniciliny a cefalosporiny na bakterie a naopak. Pokud se antibiotika podávají u bakterií, které téměř nerostou, účinek je nulový. Proto je nejlepší zahájit léčbu okamžitě, ještě když se infekce rozvíjí. Peniciliny a cefalosporiny mají ireverzibilní baktericidní účinek. Cykloserin působí v první fázi syntézy buněčné stěny, kdy je L-alanin enzymaticky měněn na D-alanin, poté se dvě molekuly D-alaninu spojují dohromady. Cykloserin kompetitivně inhibuje oba enzymy a je i strukturálním analogem D-alaninu. (Lochmann, 1999; Votava, 2001)

1.2.2 Poškození syntézy cytoplazmatické membrány

Cytoplazmatická membrána je osmotická bariéra buňky. Metabolity, ionty, minerály, nukleotidy a další potřebné látky pomocí cytoplazmatické membrány zůstávají uvnitř buňky. Začnou-li na buňku působit antimikrobní látky, které jsou povrchově aktivní, dojde k nekoordinovanému uvolňování metabolitů, iontů, minerálů a nukleotidů zpět do vnějšího prostředí. Jedná se o ireverzibilní baktericidní efekt.

Mezi preparáty takto působící na cytoplazmatickou membránu patří: cyklická polypeptidová ATB, polymyxiny. Polypeptidy se naváží na fosfolipidovou část cytoplazmatické membrány gram-negativních bakterií, čímž dojde k letálnímu zvýšení permeability. Tyto antibiotika působí na vytvořenou membránu, takže jsou účinné i na bakterie, které se již nemnoží. Bacitracin se váže na cytoplazmatickou membránu gram-pozitivních bakterií a nadměrně zvyšují únik látek z buňky. Polyenová antifugální antibiotika se naváží na steroly. Ty se vyskytují pouze u membrán mikroskopických hub a kvasinek. (Lochmann, 1999; Jedličková, 2004)

1.2.3 Inhibice proteosyntézy

Mezi antibiotika inhibující proteosyntézu lze zařadit např. aminoglykosidy, linkosamidy, tetracykliny, chloramfenikoly a makrolidy. Do skupiny aminoglykosidů patří streptomycin, neomycin, kanamycin, gentamycin. Aminoglykosidy pronikají do bakterie a naváží se na ribozomální podjednotku 30S. Přesunutím pouze jediné aminokyseliny tak vzniknou chybné bílkoviny. I když jsou bílkoviny odlišné jen nepatrně, stačí taková to drobná změna k tomu, aby bílkovina nemohla plnit strukturální nebo enzymatickou funkci. Aminoglykosidy mají pomalý efekt. Musí tedy dojít k většímu nahromadění pozměněných bílkovin, aby se zastavily buněčné funkce bakterií. Nahromadění změněných bílkovin v konečné fázi postihuje buněčnou respiraci i permeabilitu. Aminoglykosidová ATB jsou ireverzibilně baktericidní. Chloramfenikol se naváže na ribozomální podjednotku 50S, blokuje enzym přenášející rostoucí peptidový řetězec k další aminokyselině, která má být připojena. Tetracyklin se váže na ribozomální podjednotku 30S, tím blokuje přístup aminokyselin k ribozomům. Nedochází tak ke spojení ribozomů. Makrolidy a linkosamidy se váží na ribozomální podjednotku 50S. Dochází tak k blokaci proteosyntézy. Linkosamidy, makrolidy, tetracykliny a chloramfenikoly mají reverzibilní bakteriostatický efekt. (Lochmann, 1999)

1.2.4 Porucha syntézy nukleových kyselin

Některá antibiotika mohou poškodit syntézu nukleových kyselin v různé fázi jejich výstavby. Tato antibiotika však působí nejen na bakteriální buňky, ale i na buňky vyšších organismů, proto jsou pro lidský organismus toxická. Do této skupiny patří: rifampicin, trimetoprim, kyselina nalidixová, fluorchinolony. (Lochmann, 1999)

1.2.5 Antimetabolity

Antimetabolity působí zejména na úrovni syntézy kyseliny listové. Sulfonamid zpomaluje syntézu kyseliny listové na základě kompetitivní inhibice spolu s kyselinou *p*-aminobenzoovou. Dále trimetoprim, který také působí na kyselinu listovou, ovšem uplatňuje se v jiném místě metabolického řetězce. Zmíněné látky působí bakteriostaticky. Pokud se zkombinují, vznikne látka kotrimoxazol, která má baktericidní účinek. (Votava, 2001)

1.3 Spektrum účinku

Některá antibiotika působí jen na malou skupinu bakterií, mají tak úzké spektrum účinku. Patří sem např. antituberkulotika nebo spektinomycin, používaný k léčbě kapavky. Penicilin je běžný příklad antibiotik se středním spektrem účinku. Působí na všechny gram-pozitivní bakterie (kromě kmenů stafylokoků produkujících penicilinasu) a gram-negativní koky. Penicilin nepůsobí na většinu gram-negativních tyčinek. Ampicilin, derivát penicilinu, a cefalosporiny první generace mají spektrum účinku rozšířené o působení na gram-negativní bakterie. Na gram-pozitivní bakterie působí především glykopeptidy (vankomycin). Mezi antibiotika středního spektra účinku působící na gram-pozitivní bakterie spadá i linkosamidy a makrolidy. Naopak mezi antibiotika působící na gram-negativní bakterie patří aminoglykosidy, polypeptidy a cefalosporiny III. generace. Do skupiny širokospektrých antibiotik patří tetracykliny a chloramfenikol, rifampicin a kotrimoxazol, cefalosporiny a chinoliny vyšších generací. (Votava, 2001)

1.3.1 Kombinace antibiotik

Při léčbě infekčních onemocnění se upřednostňuje monoterapie, tedy léčba jedním druhem ATB. Pokud se u nemocného objeví infekce závažnější, použije se k terapii kombinace dvou nebo více ATB. Kombinace ATB mohou být někdy výhodné, často se však ATB kombinují zbytečně. (Jedličková, 2004)

Kombinace ATB se podává v případě smíšené infekce, čímž se rozšíří spektrum účinku. Jediný podávaný preparát nedokáže postihnout celé spektrum bakterií, které způsobují danou infekci. Takovéto infekce mohou být způsobené aerobními bakteriemi (gram-pozitivními a gram-negativními) i anaerobními. Smíšené infekce se vyskytují při masivních traumatech, u hnisavých infekcí dutiny ústní, břišní, hrudní dutiny a u gynekologických infekcí. (Votava, 2001; Jedličková, 2004)

Dále se ATB kombinují, aby se zabránilo vzniku bakteriální rezistence. Vytvoření β -laktamas může vyvolat aplikace kombinace dvou β -laktamových ATB. Je nutné se takovým kombinacím vyhnout a přísně dodržovat zásady terapie antibiotiky. (Jedličková, 2004)

Kombinací některých antibiotik vzniká synergismus. Jedná se o jev, kdy se preparáty ve svém účinku navzájem povzbuzují. Vzniká hlavně u kombinace baktericidních antibiotik (např. kombinace aminoglykosidů a β -laktamů). Kombinací baktericidních β -laktamových ATB s bakteriostatickými tetracykliny, lankosamidy, sulfoamidy nebo makrolidy může docházet k antagonismu. Je to stav, kdy je výsledný účinek nižší než aktivita účinnějšího antibiotika z kombinace. β -laktamy inhibují syntézu bakteriální stěny, kterou budují množící se bakterie, bakteriostatické látky pouze zastavují množení bakterií. Osvědčená kombinace ATB působící synergicky jsou běžně k dispozici a hromadně se vyrábí. Patří sem například baktericidní kotrimoxazol. (Votava, 2001)

Kombinace více antibiotik sebou nese určitá rizika. U nemocného může dojít ke kolonizaci multirezistentními mikroorganismy. Zvyšuje se také riziko přecitlivění na podávaná ATB, dále může dojít k toxické reakci. Podávaná antibiotika mohou mezi sebou interagovat. Kombinace látek může vyvolat i ekotoxickou reakci. U nemocného je nutné sledovat jaterní a ledvinové funkce z důvodu většího metabolického zatížení. A v neposlední řadě je nevýhodou vysoká cena léků. (Votava, 2001)

1.4 Zásady antimikrobiální terapie

Antibiotika jsou látky používané ve všech lékařských oborech. Jsou podávány velmi často, a proto je nutné dodržovat určité zásady.

Nejdůležitější je, podávat ATB pouze v případě bakteriální infekce, ne v případě infekce virové či jiné. Zde by ATB nezabrala, virová infekce by se dále šířila a nemocný by byl navíc zatěžován podávanými ATB. (Votava, 2001)

Nasazení léčby antibiotiky by se mělo provádět až po odběru biologického materiálu a samotném vyšetření v mikrobiologické laboratoři. Zde z materiálu zjistí původce případné infekce. Doba od odebrání biologického materiálu po získání výsledků je dlouhá, obvykle se jedná o 1–3 dny. Proto lze nemocného léčit jen na základě předchozích zkušeností se stejným onemocněním. Nasazuje se tzv. empirická léčba. Rozlišují se dva předpoklady pro empirickou léčbu ATB. Prvním předpokladem je, že určitý patogen vyvolává určité infekční onemocnění, proto je velmi pravděpodobné, že

tento patogen způsobil infekci i u léčeného pacienta a může se tedy nasadit empirická léčba, často s následným mikrobiologickým ověřením. (Votava, 2001)

Dále je nutné přesně dodržovat dávky a intervaly používaných ATB, protože jen tak se zajistí dostatečná koncentrace účinné látky v oblasti infekce. Velmi častou chybou tak bývá zkracování nebo prodlužování léčby. Důležité je také znát farmakokinetiku u vybraných ATB, protože různé účinné látky mohou pronikat do postiženého místa různými způsoby. Stejně tak se může lišit vazba na bílkovinný nosič, biologický poločas rozpadu účinné látky, její vstřebávání ale i vylučování. ATB pronikají mnohem hůř do poškozené tkáně než do zdravé a některá ATB se nevstřebávají ze střev. Důležitou roli při výběru vhodného ATB také hraje současný stav pacienta. Jsou to pacienti se sníženou imunitou (onkologičtí pacienti, po transplantaci nebo i novorozenci) jsou léčeni baktericidními ATB, které se aplikují parenterálně (aplikované mimo trávicí ústrojí). Dále u pacientů s poruchou ledvin nelze podat neurotoxické aminoglykosidy nebo ATB která se ledvinami vylučují. Podobně je to i poruch funkce jater, kdy je kontraindikovány injekčně podávaný tetracyklin a erytromycin. Některé ATB také mohou být kontraindikována v těhotenství nebo u dětí. (Votava, 2001; Lochmann, 1999)

1.5 Nežádoucí účinky antibiotik

Každý lék může mít řadu nežádoucích – vedlejších účinků. Bez výjimky jsou to i ATB. Mezi nežádoucí účinky ATB řadíme účinky toxické, alergické a biologické.

K **toxickým účinkům** dochází nejčastěji po předávkování, nebo když se neupraví dávkování u pacienta s postiženými ledvinami nebo játry. Neurotoxické účinky se mohou vyskytnout u aminoglykosidů, hepatotoxické u erytromycinu nebo tetracyklinů. Nefrotoxické účinky způsobují aminoglykosidy, polymyxiny a vankomycin. Hematotoxický může být např. chloramfenikol, který může vzácně vyvolat ireverzibilní aplastickou anemii nebo agranulocytózu. Vedlejší účinky působící na gastrointestinální trakt jsou způsobeny tetracyklinem, likomycinem, erytromycinem, furantoinem a dalšími. (Votava, 2001, Jedličková, 2004)

Alergické reakce jsou obvyklé po penicilínech, cefalosporínech nebo sulfonamídech. Kromě drobných kožních projevů jako je kopřivka se mohou rozvinout i závažnější kožní projevy. Velkým nebezpečím je anafylaktický šok po injekčním podání penicilínu. Kromě alergických reakcí se taky mohou objevit gastrointestinální potíže. (Votava, 2001, Jedličková, 2004)

Mezi nejzávažnější **biologické účinky** řadíme takové, které ovlivňují přirozenou mikroflóru. Antibiotika ji buď úplně zničí, nebo hodně zredukují. Hospitalizovaní pacienti s poškozenou mikroflórou mohou být kolonizováni kmeny nemocničních bakterií, které mohou být rezistentnější a více patogenní než původní mikroflóra. Také se mohou rozmnožit původní potencionální patogeny, které byly mikroflórou udržovány v neškodném množství. Například mohou vznikat pseudomembranózní kolitidy vyvolané *Clostridium difficile* po linkosamídech, dále kvasinkové vulvovaginitidy po užívání širokospektrých ATB nebo enterokokové či pseudomonádové sepse způsobené užíváním cefalosporinů první a druhé generace. (Votava, 2001, Jedličková, 2004)

2 KLASIFIKACE ANTIBIOTIK

2.1 β -laktamová antibiotika

Název je odvozen od β -laktamového kruhu, který obsahují. Jedná se o čtyřčlennou strukturu s dvěma atomy dusíku a čtyřmi atomy kyslíku. Rozlišují se různé druhy β -laktamů. Liší se zejména substituenty připojenými na β -laktamový kruh. Mezi β -laktamová antibiotika se řadí peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy (viz **Tabulka 1**)

V buňce bakterie se β -laktamy váží na enzymy, které se podílejí na tvorbě peptidoglykanu, základní složce buněčné stěny. Tyto enzymy ovlivňují tvorbu peptidových a glycinových můstků, které spojují řetězce střídajících se molekul kyseliny N-acetylmuramové a N-acetylglukosaminu. Označují se zkratkou PBP (z angl. penicilin binding protein, protein vázající penicilin). β -laktam se naváže na PBP a tím se zastaví tvorba peptidoglykanové vrstvy v rostoucích bakteriích. Zároveň dojde k uvolnění autolytických enzymů, které poškodí a rozpustí bakteriální stěnu. Následkem je rozpad bakteriální buňky. β -laktamy tedy mají baktericidní účinek. Účinnost β -laktamových ATB závisí na době udržování jejich hladiny nad minimální inhibiční koncentrací (MIC), tzn. čím déle je koncentrace ATB nad hodnotou MIC, tím více účinkují. (Votava, 2001, Lochmann 1999)

β -laktamy se poměrně rychle vylučují močí, takže se účinná hladina podávaného ATB udrží v těle nemocného jen krátce. Proto se jednotlivé dávky ATB musí podávat častěji (každých 6–8 hodin). Mezi výjimky patří ceftriaxon, který se podáván jen jednou denně. Toxicita β -laktamů je velmi nízká, přesto může vzniknout alergická reakce, která se může projevit jen lehkou kopřivkou, nebo může vzniknout těžká až život ohrožující alergická reakce – anafylaktický šok, který se může rozvinout po aplikaci penicilinu. (Votava, 2001)

Tabulka 1 Rozdělení β -laktamových antibiotik.

Rozdělení β -laktamových antibiotik	
Peniciliny	
Acidolabilní	benzylpenicilin (penicilin G)
Acidostabilní	fenoxymetylpenicilin (Penicilin V)
Odolné proti stafylokokové penicilinase	oxacilin
Aminopeniciliny	ampicilin, amoxicilin, co-ampicilin, co-amoxicilin
Ureidopeniciliny	piperacilin, co-piperacilin
Karboxypeniciliny	co-tikarcilin
Cefalosporiny	
I. generace	cefalotin, cefazolin <u>Perorální</u> : cefalexin, cefadroxil, cefaclor
II. generace	cefuroxim, cefamandol, cefamycin, cefoxitin <u>Perorální</u> : cefurosim axetil
III. generace	ceftizoxim, cefotaxim, ceftriaxon, ceftazidim <u>Perorální</u> : cefixim, cefpodoxim, ceftibuten
IV. generace	cefpirom, cefepim
Monobaktamy	aztreonam
Karbapenemy	imipenem, meropenem, ertapenem

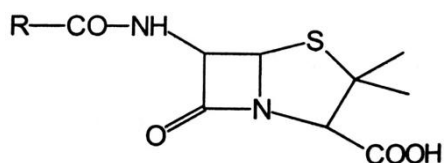
Zdroj: Votava, 2001

2.1.1 Peniciliny

Peniciliny jsou jedny z neúčinnějších ATB, která se navíc vyznačují minimální toxicitou. Tato antibiotická látka se izoluje z kultury plísně *Penicillium chrysogenum* a dalších plísní, které uvolňují 6-aminopenicilanovou kyselinu. V molekule této kyseliny je β -laktamový kruh spojen s pětičlenným kruhem thiazolidinu (

Obrázek 1). Tento meziprodukt se v laboratoři různě biochemicky nahrazuje a získávají se tak různé druhy penicilinu. Vzniklá ATB tak mají různé spektrum účinku, různou stabilitu proti nízkému pH a různé vlastnosti vůči β -laktamasam. Farmakologicky lze peniciliny rozdělit na základní (acidostabilní a acidolabilní), peniciliny odolné proti stafylokokovým penicilinasam, aminopeniciliny, ureidopeniciliny a karboxypeniciliny. (Votava, 2001, Lochman 1999)

Obrázek 1 **Obecný vzorec penicilinu.**



Zdroj: Votava, 2001

Acidolabilní peniciliny jsou nestálé při nízkém pH. Je nutné je podávat parenterálně. Spektrum účinku je velmi široké. Působí na gram-pozitivní koky a tyčinky, a některé gram-negativní koky a tyčinky. Do této skupiny penicilinů spadá benzylpenicilin (také penicilin G). Je podáván intravenózně při závažných infekcích streptokokových, klostridiových, meningokokových meningitidách, u gonokokových sepsí, záškrtu, pneumokokové pneumonie, antraxu, záškrtu, vrozené syfilis a neurosyfilis, dále u leptospirózy a u třetího stadia lymeské boreliózy. (Votava, 2001)

Acidostabilní peniciliny nepodléhají účinku žaludečních šťáv. Patří sem phenoxymethylpenicilin (také penicilin V), který je velmi často předepisovaným perorálním ATB. Spektrum účinku je stejné jako spektrum penicilinu G.

Peniciliny stabilní vůči β -laktamasám jsou ATB odolné proti působení β -laktamas, které jsou produkovány kmeny *Staphylococcus aureus*. Proto bývají první volbou lékařů u stafylokokové infekce. Dále se používají při léčbě smíšených stafylokokových a streptokokových infekcí. Do této skupiny patří oxacilin a methicilin, ale v posledních 10 letech se vyskytuje stále více kmenů s rezistencí k nim, nejznámějším příkladem je MRSA (methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*). (Lochmann, 1999; Votava, 2001)

Aminopeniciliny působí na větší spektrum bakterií. Nejvíce působí na řadu gram-negativních tyčinek (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, bordetelly, shigelly, hemofily, helikobaktery, salmonely atd. Zkrátka působí jen na takové bakterie, které neprodukují β -laktamasy. Také působí na některé gram-pozitivní bakterie, nejčastěji na

bakterie kmene *Enterococcus faecalis*. Aminopeniciliny se nemocnému podávají perorálně. Používají se u infekcí dolních i horních cest dýchacích, zánětů středního ucha, u akutní sinusitidy. Dále je lékaři předepisují u zánětů močových cest, k vymýcení *Helicobacter pylori*, a jako prevenci před endokarditidou při drobných chirurgických operací a invazivním zákrokem. Aminopeniciliny nelze podávat u infekcí způsobených shigellami, protože se absorbují v proximálním úseku zažívacího traktu. Pro zvýšení účinnosti se kombinují s inhibitory β -laktamas, jako je kyselina klavulanová, sulbaktam nebo tazobaktam. Mohou se proto poté použít i k léčbě infekcí způsobených kmeny produkující β -laktamasy. (Votava, 2001)

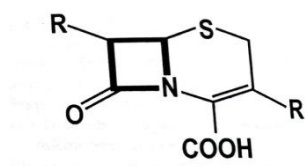
Ureidopeniciliny jsou protipseudomonádová antibiotika a patří mezi ně zejména piperacilin, který má větší účinek a lze ho použít i u leukemických pacientů se septickými stavy. Tento druh penicilinů se podává pouze parenterálně a mají široké spektrum účinku. Ureidopeniciliny mohou být rozkládané enzymy, β -laktamasou i cefalosporinasou. Proto také existuje kombinace piperacilinu s tazobaktamem (inhibitor β -laktamas) nesoucí název co-piperacilin. (Votava, 2010)

Karboxypeniciliny obsahují pouze jednu látku, ticarcilin. V lékárně je k dostání pouze v kombinaci s kyselinou klavulanovou. Tato kombinace se nazývá co-ticarcilin. Je účinná na větší množství rezistentních nemocničních kmenů. (Lochmann, 1999; Votava, 2001)

2.1.2 Cefalosporiny

Mezi základní kámen cefalosporinů patří kyselina 7-aminocefalosporanová, která byla separovaná z rodu plísně *Cephalosporium*. Molekula kyseliny 7-aminocefalosporanové obsahuje β -laktamový kruh, na který se navazuje šestičlenný dihydrothiazinový kruh (**Obrázek 2**). Cefalosporinová ATB mají mechanismus účinku stejný jako ostatní β -laktamy, také zpomalují syntézu buněčné stěny a působí baktericidně na množící se mikroby. Spektrum účinku u této skupiny ATB je velmi široké a toxicita je poměrně malá, i když je vyšší než u penicilinů. Cefalosporiny se velmi snadno kombinují s polypeptidickými ATB, aminoglykosidy, fluorochinolony anebo s nitroimidazoly. Což se využívá u léčby vzácných infekcí. Cefalosporinová ATB se rozdělují do čtyř generací. Třídí se dle spektra účinku, průniku skrz buněčnou stěnu a senzitivity proti β -laktamasám. (Votava, 2010)

Obrázek 2 Chemický vzorec cefalosporinu.



Zdroj: Votava, 2001

Cefalosporiny I. generace mají podobné spektrum účinku jako ampicilin. Bezpečně působí na gram-negativní bakterie (kmeny rodů *Escherichia*, *Klebsiella* a *Proteus*), účinkuje i na gram-pozitivní koky. Nejčastěji se cefalosporiny I. generace podávají perorálně. Používají se zde preparáty: cefalexin, cefadroxil i cefaclor. Ovšem u hospitalizovaných pacientů se středně těžkými infekcemi lze aplikovat cefalotin a cefazolin injekčně. (Votava, 2010, Lochmann, 1999)

Všeobecně jsou **cefalosporiny II. generace** odolnější vůči působení β -laktamas. Spektrum účinku této skupiny cefalosporinů je rozšířeno o další gram-negativní tyčinky. Tato ATB se podávají perorálně, ale i injekčně. Mezi perorální léčiva patří cefuroxim a injekčně se podává kromě cefuroximu také cefamandol a cefamycinové ATB, cefoxitin. To je velmi dobře účinné na anaeroby, ale zároveň silně podporuje tvorbu β -laktamas. (Votava, 2010, Lochmann, 1999)

Cefalosporiny III. generace mají velký účinek na gram-negativní bakterie. Tato ATB se opět podávají jak perorálně, tak injekčně. Mezi perorální látky patří např. cefixim, cefpodoxim a ceftibuten. Ovšem ani jeden z uvedených přípravků nepůsobí na pseudomonády a ani na stafylokoky. Pod injekčně podávané cefalosporiny III. generace spadá ceftizoxim (působí i na hemofily) a cefotaxim (podávaný v neonatologii). Dále sem patří ceftriaxon, který proniká přes hematoencefalickou bariéru. V porovnání s ostatními cefalosporiny má poměrně dlouhý poločas rozpadu, a proto lze podávat jednou denně. (Votava, 2010, Lochmann, 1999)

Cefalosporiny IV. generace jsou ATB, která lze podávat pouze parenterálně. Mohou prostoupit zevní membránou gram-negativních bakterií, jsou odolné proti působení β -laktamas a jsou vysoce přilnavé k PBP. Při porovnání IV. generace cefalosporinů s

nižšími generacemi, byl prokázán lepší účinek na gram-pozitivní bakterie. Podávají se při léčbě velmi závažných (až život ohrožujících) smíšených nebo gram-negativních infekcí. V takových to případech se podávají cefalosporiny IV. generace samostatně nebo se kombinují s chinolony nebo s aminoglykosidy. (Votava, 2010, Lochmann, 1999)

2.1.3 Ostatní β -laktamová antibiotika

Patří mezi ně dvě skupiny, **monobaktamy** a **karbapenemy**. Monobaktam aztreonam působí jen na gram-negativní bakterie. Jeho spektrum účinku je tak široké, že dokáže zastoupit aminoglykosidy, které mohou být toxické.

Karbapenemy meropenem, imipenem a ertapenem jsou širokospektré, obsáhnou jak gram-pozitivní, tak gram-negativní včetně pseudomonád a anaerobů. Jsou také rezistentní proti působení β -laktamů a jedná se o ATB poslední volby. Proto je lze použít u léčby infekcí způsobených nemocničními multirezistentními kmeny a také u těžkých aerobních i anaerobních infekcí. (Votava, 2001)

2.2 Tetracykliny

Název tetracykliny je odvozen od skladby molekuly, která obsahuje čtyři kondenzované šestičlenné cykly. Účinek tetracyklinů je založen na inhibici proteosyntézy. Zabraňují komplexu tRNA–aminoacyl navázat se na kompetentní místo na ribozomu. Tetracykliny by tak mohly zabraňovat syntéze i v lidských buňkách. Avšak mnohem snadněji pronikají do bakteriálních buněk, kde působí. Mají velmi rozsáhlé spektrum účinku, do kterého patří: gram-pozitivní i gram-negativní bakterie, mykoplasmata, chlamydie, spirochéty, rickettsie a protozoa. Když se začaly tetracykliny používat, měly nejširší spektrum účinku ze všech tehdy dostupných ATB. Postupem času se však začala vyvíjet rezistence a spektrum účinku se tak začalo zužovat. Dnes je řada bakterií na tetracykliny rezistentní. Tetracykliny působí hlavně bakteriostaticky. Snadno se vstřebávají ze střevního traktu, proto se podávají perorálně ale i parenterálně. Jsou málo toxické pro lidský organismus, mají však celou řadu negativních účinků. Nejčastěji se projevují gastrointestinální poruchy, dále mohou způsobit žluté zbarvení zubů a ovlivnit tvorbu kostí. Proto jsou kontraindikovány u dětí. Tetracykliny se rozdělují do třech skupin: I.-III. generace. (Votava, 2001; Lochmann, 1999)

Vstřebávání **tetracyklinů I. generace** probíhá v horním úseku zažívacího traktu. Aplikací ATB nalačno nebo se současným podáním kyseliny citronové se vstřebání zlepšuje. ATB podaná současně s mléčnými produkty, vytvoří komplexy s vápníkem, který se velmi špatně vstřebává. Průnik tetracyklinů do tkání je dobrý. Nejvíce se hromadí ve žluči. Zde může koncentrace dosáhnout až baktericidního účinku. Žluč s ATB se dále vlévá do střeva. Tady se mohou tetracykliny znovu vstřebávat. Nevstřebaňá ATB se vylučují stolicí. Většina vstřebaňé látky se vyloučí močí. Hlavním zástupcem je tetracyklin. (Lochmann, 1999)

Tetracykliny II. generace mají mnohem širší účinek než tetracykliny klasické. Podávají se v miligramových množstvích (klasické tetracykliny se podávají v dávkách gramových). Lze je aplikovat jednou až dvakrát za 24 hodin, protože mají prodloužený poločas rozpadu. Tyto tetracykliny se dobře vstřebávají, strava je ovlivňuje nepatrně, a proto se mohou podávat perorálně. Močí se vylučuje zhruba jen 45 % vstřebaňých ATB. Zbytek je organismem metabolizován. Hlavním zástupcem je doxycyklin. (Lochmann, 1999)

Tetracyklinem III. generace je tigecyklin používaný od roku 2005. Podává se pouze parenterálně a je účinný na většinu gramozitivů i gramnegativů, včetně MDR bakterií. Může se jevit slabě nefrotoxicky nebo hepatotoxicky, proto by se neměl podávat pacientům s poškozením jater či ledvin. (Lochmann, 1999)

2.3 Aminoglykosidy

Aminoglykosidy jsou složeny z trisacharidů, které mají ve své molekule aminocukry. V molekule ATB se nachází aminocyklitolový kruh, na který se pomocí glykosidické vazby váží dva aminocukry. Aminoglykosidy se uplatňují v ribozomech, kde působí na vznik bakteriální proteosyntézy, kde se kříží s vazbou formylmethionyl – transferové RNA na ribozom. Tímto způsobem zabraňují vzniku iniciaňních kodonů, které jsou důležité pro vznik bílkovin. (Votava, 2001)

Spektrum účinku aminoglykosidových ATB je velmi široké. Působí na gram-ozitivní i gram-negativní bakterie. Mají baktericidní účinek. Protože se neabsorbují z gastrointestinálního traktu, musí se podávat parenterálně. Hůře pronikají do tkání, a do

mozkomíšního moku nepronikají. Nevýhodou bývá jejich toxicita, která působí i na makroorganismus. Aminoglykosidy lze rozdělit: klasické (neomycin, kanamycin, streptomycin), novodobé – mají silnější účinek (gentamycin, netilmicin, amikacin a tobramycin) a bakteriostatické (spektomicin). (Votava, 2001)

Streptomycin působí baktericidně, podává se injekčně a působí nejvíce na *Mycobacterium tuberculosis* a také na některé gram-negativní mikroby. Vyskytují se zde také rezistence. Nejvíce rezistentní jsou sporulující mikroorganismy, menší rezistenci pak vykazují streptokoky a pneumokoky. (Votava, 2010)

Neomycin a kanamycin mají velmi podobné vlastnosti. Neomycin lze pro jeho toxicitu podávat pouze lokálně. Jeho kombinace s bacitracinem a polymyxinem se hojně využívá u léčby povrchových infekcí sliznic a kůže. Neomycin se aplikuje ve formě spreje, mastí, zásypů, krémů, gelů a kapek. Kanamycin se podává parenterálně. Využívá se při léčbě akutních infekcí způsobených senzitivními gram-negativními bakteriemi rodu *Proteus* a *Escherichia coli*. Obě zmíněné látky mají baktericidní účinek a působí na všechny gram-negativní tyčinky. (Votava, 2010)

2.4 Makrolidy

Makrolidy se skládají z makrocyclického laktonu. Laktonová molekula obsahuje velký, 14–16členný kruh, na který jsou navázány až dva další cukry. Makrolidy se přichytí na rRNA (ribosomální) a zastavují proteosyntézu. Po vzniku peptidické vazby zabraňují uvolnění tRNA. (Votava, 2001)

Jejich spektrum účinku je úzké. Nejvíce působí na gram-pozitivní bakterie a na kmeny, které jsou odolné vůči penicilinu. Také velmi efektivně působí na bordetely, neisserie, leptospiry, treponemata, chlamydie, mykoplasmata a legionelly. Makrolidy na bakterie působí bakteriostaticky. Všechny látky patřící do makrolidů se velmi dobře resorbují v gastrointestinálním traktu, mohou se tak podávat perorálně, ale také parenterálně. Makrolidy jsou prakticky netoxické. Pouze při podávání vysokých dávek mohou působit hepatotoxicky. (Votava, 2010)

Nejpoužívanější látkou je erytromycin. Jeho spektrum účinku odpovídá spektru účinku penicilinu. Působí tak na stejné mikroorganismy, jako jsou: gram-pozitivní bakterie, gram-negativní koky a spirochéty. Velmi účinný je u stafylokokových infekcí, ale v souvislosti s jeho běžnou aplikací vznikají velmi odolné bakteriální kmeny. Erytromycin lze podávat u pacientů, kteří citliví nebo alergičtí na penicilin. Aplikuje se perorálně, ale také injekčně. Po perorálním podání se v gastrointestinálním traktu absorbuje velmi dobře. Proniká do buněk, kde může být jeho koncentrace vyšší než v plazmě. Špatně proniká do mozkomíšni tekutiny a do kloubního prostoru. (Lochmann, 1999)

2.5 Linkosamidy

Účinná látka linkomycin se získala z kmene *Streptomyces lincolnensis*, podle kterého získala svoje jméno. Struktura je odvozena od aminokyseliny prolinu, která má nahrazené některé části amidy a aminocukrem thiolinkosamidy. Účinek toho ATB je bakteriostatický. Působením linkosamidů nevzniká peptidická vazba a prodlužuje se molekula vznikajících proteinů. Účinně inhibuje růst gram-pozitivních bakterií. Velké plus je, že působí i na penicilin-rezistentní stafylokoky. Do spektra účinku ještě patří anaerobní mikroorganismy. Aplikují se perorálně i parenterálně a velmi dobře se absorbují z gastrointestinálního traktu. Velmi dobře pronikají do polymorfonukleárů, makrofágů a kostní tkáň, což je velmi výhodné při léčbě stafylokokové osteomyelitidy. Naopak vůbec nepronikají do mozkomíšního moku. Linkosamidy mají velmi nízkou toxicitu. Tato skupina ATB má dva zástupce: linkomycin a klindamycin. (Votava, 2010, Lochmann 1999)

Linkomycin se aplikuje perorálně i parenterálně. Svým účinkem se velmi podobá erytromycinu (makrolidy), avšak má jiné chemické složení. V praxi se používá hlavně u infekcí způsobených stafylokoky. Také lze podat namísto benzylpenicilinu, zejména v případech, kdy je benzylpenicilin kontraindikován. Linkomycin lze také podat u anaerobních infekcí a velmi dobře účinkují kombinace s aminoglykosidy. (Lochmann 1999)

Klindamycin má oproti linkomycinu větší antibakteriální účinek, ale spektrum působení je stejné. Také je výhodnější po farmakokinetické stránce, kdy se mnohem lépe absorbuje, ale je více toxický. (Lochmann 1999)

2.6 Amfenikoly

Nejznámější a nejdostupnější ATB z této skupiny se nazývá chloramfenikol. Nejprve byl izolován z kmene *Streptomyces venezuelae*, nyní se připravuje synteticky. Chloramfenikol zabraňuje vzniku peptidické vazby, protože působí na peptidyltransferasu. Působí na proteosyntézu probíhající pouze v buňkách bakterií, protože má mnohem větší afinitu k podjednotce 50S bakteriálního ribozomu. Chloramfenikol má velmi široké spektrum účinku. Podává se při infekcích vyvolané aerobními i anaerobními gram-negativními i gram-pozitivními bakteriemi, ale má pouze bakteriostatický účinek. Dokáže působit na intracelulárně uložené mikroby a velmi dobře proniká i do likvoru a tkání. Chloramfenikol může působit velmi toxicky. Způsobuje šedý syndrom u novorozenců, hlavně u nedonošených. Dále může jeho podání způsobit poruchy kostní dřeně (dojde k útlumu krvetvorby nebo způsobí vznik aplastické anémie). Z těchto důvodů se chloramfenikol podává jako ATB druhé volby. Aplikuje se u závažných infekcí, kde nelze použít ATB jiná. (Votava, 2010, Lochmann 1999)

2.7 Polypeptidová antibiotika

2.7.1 Polymyxiny

Jedná se o ATB s relativně velkou molekulární hmotností, okolo 1750 Da, proto v těle hůře pronikají do tkání. Molekuly mají celkový pozitivní náboj, proto se velmi dobře váží na negativní náboj povrchu gram-negativních bakterií, konkrétně na lipopolysacharidy (LPS). Polymyxiny působí baktericidně. Po navázání ATB na LPS gram-negativních bakterií dochází k vychytávání Mg^{2+} a Ca^{2+} iontů, čímž dojde k destabilizaci buněčné membrány bakterií, úniku komponent a buněčné smrti. (Bialvaei, a kol., 2015)

Klinicky se u nás používá pouze kolistin. Lze ho použít k léčbě infekcí močových cest, u takových to případů se podává injekčně, protože se z větší části jeho molekula objeví v moči ve zcela nezměněném stavu. V poslední době se často jedná o antibiotikum poslední volby využívané pro léčbu infekcí způsobenými MDR bakteriemi, zejména z čeledi *Enterobacteriaceae* a nefermentujících tyčinek. (Votava, 2010)

2.7.2 Glykopeptidová antibiotika

Glykopeptidová ATB působí na úrovni syntézy bakteriální stěny. Zabraňují vznikajícímu peptidoglykanu zesíťování, tak že se váží na konec peptidového řetězce. Mají baktericidní účinek na mikroorganismy. Mezi nejznámější glykopeptidová ATB patří vankomycin. Spektrum účinku je poměrně úzké. Působí na spirochéty a gram-pozitivní bakterie. Velkou výhodou vankomycinu je, že působí na rezistentní kmeny. Příkladem jsou: *Staphylococcus aureus* (zejména léčba infekcí způsobených kmeny MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium jeikeium* a *Enterococcus faecalis*. Ale také se vyskytují kmeny bakterií, které jsou na vankomycin primárně rezistentní. Takové to bakterie mají na konci peptidového řetězce laktát nebo serin, protože vankomycin se váže na D-alanyl-D-alanin, a u těchto bakterií se nemá kam navázat. (Votava, 2010)

2.8 Ansamycinová antibiotika

Ansamyciny jsou složeny ze systému benzenových jader. První ansamycinovým ATB je rifamycin izolován z kmene *Streptomyces mediterranei*. Dnes se klinicky používají synteticky získané deriváty rifampicin a rifabutin. Ansamyciny se váží na RNA polymerasu v bakterii. Díky tomuto kontaktu nevniká mRNA a neprobíhá proteosyntéza. Na bakterie působí baktericidně. Spektrum účinku je široké. Lze podat u infekcí způsobených např. stafylokoky, enterokoky, neisseriemi, legionellou, hemofilem, ale i mykoplazmaty. Rifampicin je lék, který se podává orálně. Výborně proniká do tkání a vylučuje se žlučí. Žluté zbarvení moči a slin je známkou správného užívání ATB. Používá se u léčby umělohmotných chlopní nebo jiných implantátů, které jsou napadeny stafylokokovou infekcí. Podává se pouze v kombinaci s jiným ATB pro rychle vznikající rezistenci. (Votava 2001, Lochmann 1999)

2.9 Pyrimidiny a sulfonamidy

Sulfonamidy inhibují syntézu kyseliny tetrahydrolistové, která je důležitá pro vznik pirimidinů a purinů tím pádem se nevytváří nukleonové kyseliny. Sulfonamidy jsou svou stavbou podobné kyselině *p*-aminobenzoové – PABA. S tou to kyselinou soutěží o vazebné místo na enzymu, který katalyzuje reakci vzniku tetrahydrolistové kyseliny. Po aplikaci sulfonamidů se kyselina tetrahydrolistová nesyntetizuje. Je to klasický případ kompetitivní

inhibice. Sulfonamidy působí jen na buňky bakteriální, protože buňky lidského organismu, nevyrábí kyseliny listovou, pouze ji přijímají z potravy. (Votava, 2010)

Sulfonamidy mají bakteriostatický účinek. Z gram-pozitivních bakterií působí na stafylokoky, streptokoky, nokardie a klostridia. Z gram-negativních jsou nejvíce účinné na chlamydie a legionelly, méně pak působí na hemofily, protey, escherichie a klebsielly. V dnešní medicíně se sulfonamidy podávají jen výjimečně např. u močových infekcí. Také je lze aplikovat místně. (Votava, 2010)

Do skupiny sulfonamidů také patří antimetabolit trimethoprim. Stejně jako sulfonamid působí na úrovni syntézy kyseliny listové, ovšem působí na jiný enzym. Spektrum účinku je poněkud širší. Samostatně lze trimethoprim použít u častých a opakujících se infekcí močových cest. Nejčastěji se však kombinuje se sulfonamidem sulfamethoxazolem. Výsledná látka se nazývá kotrimoxazol. Je velmi malá pravděpodobnost vzniku rezistence u této kombinace ATB, ale objevuje se zde i synergický účinek. Spektrum účinku nejvíce zahrnuje gram-negativní bakterie. Z gram-pozitivních mikroorganismů účinkuje nejvíce na streptokoky a stafylokoky. Nejčastější vedlejší účinky se mohou objevovat v podobě nausey, zvracení a vyskytují se kožní problémy. (Votava, 2010)

2.10 Nitroimidazoly a nitrofurany

Do skupiny **nitroimidazolů** patří zejména metronidazol. Poté co ATB pronikne přes membránu do buňky, redukuje se na metabolity, které pak ničí DNA mikrobu. Aby se metronidazol změnil na metabolit, musí mít intracelulární prostředí dostatečně redoxní potenciál. Takovéto prostředí se vyskytuje u anaerobních mikrobů. Metronidazol se tedy nejvíce používá u anaerobních infekcí. K léčbě smíšených aerobních a anaerobních infekcí měkkých tkání a břicha se používají v kombinaci s β -laktamy. Samotné je lze využít k vyhubení *Helicobacter pylori* nebo se podávají z důvodu předcházení infekcí u rizikových chirurgických operací. (Votava, 2001)

Nitrofurany působí na úrovni syntézy bílkovin bakterií. Jejich účinek je bakteriostatický a spektrum účinku široké. Působí např. na streptokoky, stafylokoky, enterokoky, klebsielly a escherichie. Z důvodu špatného průniku do tkání se nitrofurany

používají pouze i infekcí močových cest. Ovšem velkou výhodou je velmi malá pravděpodobnost vzniku rezistence. Nejvýznamnějším zástupcem je nitrofurantoin. (Lochmann, 1999, Votava 2001)

2.11 Chinolony

Chinolony působí na buňku baktericidně a účinkují na úrovni metabolismu DNA. Spektrum účinku zahrnuje gram-negativní, gram-pozitivní bakterie a také anaeroby. Lze je rozdělit do čtyř generací – I-IV. Obecně se chinolony I. generace špatně vstřebávají z gastrointestinálního traktu ovšem chinolony II. až IV. generace se velmi dobře vstřebávají, snadno pronikají skrz membrány do buněk a tkání, metabolizují se v játrech a vylučují se močí. (Votava 2010, Lochmann 1999)

Do **I. generace** patří nefluorované chinolony, působí hlavně na gram-negativní bakterie a hlavním zástupce je kyselina oxolinová. Tato ATB se používají především k terapii infekcí dolních cest močových. (Votava 2010)

Do II. až IV. generace spadají fluorované chinolony. **II. generace** fluorovaných chinolinů působí na širší spektrum gram-negativních bakterií a používají se k léčbě střevních, zažívacích i močových infekcí. Spektrum účinku **III. generace** chinolových ATB je rozšířeno o streptokoky a pneumokoky a slouží jako zásobní ATB pro respirační infekce. **IV. generace** působí kromě všech již zmíněných bakterií i na anaeroby. Podávají se v případě smíšených infekcí. (Votava 2010)

2.12 Nově schválená antibiotika

V dnešní době narůstá rezistence bakteriálních kmenů, které byly doposud citlivé k ATB, mnohem rychleji, než jsou udělovány registrace a zavádění nových ATB na trh, které by byli účinné proti rezistentním bakteriím. Výzkum nových antibiotických molekul je velmi obtížné. Mnoho větších farmaceutických firem odešlo z prostředí výzkumu, protože je zde velké riziko nenávratnosti investic. V 90. letech minulého století se výzkumem nových ATB látek zabývalo 18 velkých farmaceutických firem. Dnes do této oblasti investují pouze 4 firmy. (Součková, Ruzsíková 2016)

Od roku 2000 bylo zaznamenáno 30 nových molekul antibiotických látek. Ovšem velká část těchto ATB mají odvozenou chemickou strukturu od známé a používané ATB látky. Ve vývoji a výzkumu nových ATB látek je ale potřeba zaměřit se na nové ATB třídy s takovým mechanismem účinku, na který si bakterie nestačili vytvořit rezistenci. V posledních letech se situace mírně zlepšila. Byly registrovány látky, vhodné pro léčbu infekcí způsobených gram-pozitivními bakteriemi, zahrnující i methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* – MRSA. U infekcí způsobených gram-negativními bakteriemi (včetně sepsí, nozokomiálních infekcí atd.) dochází k případům, kdy jsou izolovány multirezistentní (MDR) bakterie, k jejichž terapii nejsou k dispozici žádné účinné ATB látky. (Součková, Ruzsíková 2016)

Stále častěji se vyskytují infekce způsobené bakteriemi produkujícími širokospektré β -laktamasy – ESBL a karbapenemasy (to jsou bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*), nebo multirezistentní nefermentující gram-negativní bakterie (*Pseudomonas aeruginosa*). U takových to infekcí je nutné použít rezervní ATB. (Součková, Ruzsíková 2016)

Od roku 2000 bylo odhaleno jen 5 nových tříd ATB. Jedná se o oxazolidinonovou třídu (schválena v roce 2000, účinnou látkou je linezolid, používá se systémově), třída lipopeptidová (schválena v roce 2003, látka má název daptomycin a lze použít systémově), pleuromutilinová třída (účinná látka se nazývá retapamulin a lze použít pouze lokálně, schválena v roce 2007), tiacumicinová třída (účinnou látkou je fidaximycin a používá se u infekcí způsobených *Clostridium difficile*, schválena 2010), třída diarylquinolinová (schválena 2012, používá se látka bedaquilin k systémové terapii). (Součková, Ruzsíková, 2016)

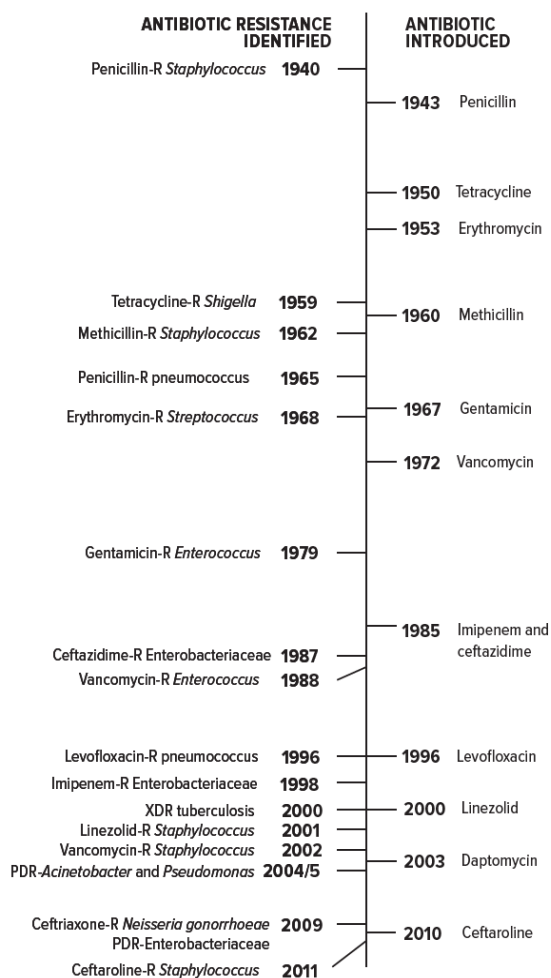
3 REZISTENCE MIKROORGANISMŮ K ANTIBIOTICKÝM LÁTKÁM

Rezistence je odolnost organismu či mikroorganismu na škodlivé působení nějaké látky nebo mikroorganismu. Rezistence na antibiotika tedy znamená stav, kdy bakterie získaly vůči antibiotikům imunitu, díky níž jim antibiotika nemohou nijak uškodit. V dnešní době je bakteriální rezistence velkým celosvětovým problémem. (Jedličková, 2004)

Některé bakteriální rody jsou **přírozně rezistentní** proti některým ATB. Bakterie tak přírozně neobsahují cílové místo pro dané ATB, přírozně produkují inaktivující enzymy nebo například nemají prostupnou buněčnou stěnu pro dané ATB. Mezi primárně rezistentní kmeny bakterií např. patří gram-negativní střevní tyčinky, které jsou odolné proti působení penicilinů, makrolidů a linkosamidů. K léčbě streptokokových infekcí nelze použít aminoglykosidy a onemocnění vyvolané listeriemi nebo enterokoky nelze léčit podáním cefalosporinů. Primární rezistence je pro laboratoř i přínosná. Využívá se při přípravě selektivních půd pro růst bakterií např. k izolaci streptokoků se do půdy přidává kolistin a kyselina oxolinová, přidáním bacitracinu do kultivačního média dojde k separaci hemofilů atd. (Votava, 2010, Lochmann 1999)

Větším problémem pro lidstvo ovšem představuje **získaná bakteriální rezistence**. Kmeny bakterií, které byly dříve citlivé na určitá ATB, se stala postupem času rezistentní. Vhodným příkladem je penicilin. V době, kdy se penicilin začal hojně užívat, působil především na infekce způsobené rodem *Staphylococcus aureus*. Bohužel, v dnešní době je více než 90 % bakterií toho kmene na penicilin rezistentní. Rezistence se postupně vyvinula u všech významných antibiotických skupin, často krátce po jejich zavedení do klinické praxe (**Obrázek 3**). Nejvíce stoupá rezistence u lékařsky významných klinických kmenů. Nárůst rezistence je nejvyšší zejména v nemocnicích, kde se tyto kmeny podílejí na významném nárůstu závažných nozokomiálních onemocnění. (Votava 2010, Lochmann 1999)

Obrázek 3 Časová osa vývoje antibiotické rezistence.



Zdroj: Ventola, 2015

3.1 Vznik a mechanismus rezistence

Aby vznikla bakteriální rezistence, je potřeba aby v bakterii působily dva hlavní faktory. Musí být přítomen mikrobiální gen pro vznik rezistence a musí na bakterii působit selekční tlak antibiotických látek. Rezistence velmi rychle narůstá, protože bakteriální gen prochází rychlou evolucí a díky nadměrnému používání a kombinací různých ATB se zvyšuje selekční tlak prostředí a dochází tak k adaptaci na nepříznivé podmínky. U bakterií se proto vyvinula řada mechanismů, které jim pomáhají se jejich účinku bránit. (Jedličková, 2004)

3.1.1 Modifikace molekuly antibiotika

Jedná se o jeden z neúčinnějších ochranných mechanismů bakterií. Bakterie buď tvoří enzymy, které inaktivují antibiotikum přidáním nových chemických skupin do molekuly ATB, nebo ty, které ATB aktivně destrukují.

Příkladem rezistence způsobené **modifikací molekuly ATB**, je produkce enzymů modifikujících aminoglykosidy (aminoglycoside modifying enzymes, AMEs), které na ATB kovalentně navazují amino- nebo hydroxyskupinu, čímž znemožní jeho vazbu na cílové místo bakterie. Jedná se o hlavní mechanismus rezistence u aminoglykosidových antibiotik lokalizovaný na chromozomu. (Munita, a kol., 2015)

Nejvýznamnějším příkladem enzymů, které **rozkládají molekulu antibiotika**, aby se nemohlo navázat a účinkovat, jsou β -laktamasy – které v různé míře hydrolyzují všechny zástupce β -laktamových antibiotik – penicilinů (peniciliny), cefalosporinů (cefalosporiny), či karbapenemů a monobaktamů (karbapenemy). Ve velké míře jsou také tvořeny širokospektré β -laktamasy, tzv. ESBL (z angl. extended-spectrum β -laktamases), které mohou hydrolyzovat všechny β -laktamy, kromě karbapenemů. (Jedličková, 2004)

3.1.2 Změna permeability bakteriální stěny

Bakterie dokáže změnit polopropustnou membránu tak, že zamezí průniku ATB do nitra bakteriální buňky. Takže se ATB nedostane tam, kde má působit. Je to způsobeno poškozením permeability bakteriální membrány, zevní cytoplazmatické membrány nebo se sníží průnik ATB poriny. Tyto mechanismy se nejčastěji projevují u hydrofilních ATB, jako jsou β -laktamy, tetracykliny a některé fluorochinolony. (Jedličková, 2004)

Opačným mechanismem je aktivní efluxový systém, který umožňuje vyloučení toxických složek včetně antibiotik ven z bakteriální buňky. Tyto systémy mohou být buď substrátově specifické, např. u tetracyklinů nebo makrolidů. Ale mohou mít širokou substrátovou specifitu, což se nejčastěji vyskytuje u MDR bakterií. Geny kódující efluxové pumpy se často nacházejí na mobilních elementech, jako jsou plasmidy, proto se mohou horizontálně šířit. (Munita, a kol., 2015)

3.1.3 Změna vazebného místa

Jedná se o společnou strategii mnoha bakterií, jak se vyhnout účinku antibiotik. Geny bývají často lokalizované na plasmidech, nebo jiných mobilních elementech.

Základním mechanismem je ochrana, „zaštítění“, vazebného místa, nejčastěji se vyskytuje u tetracyklínů a fluorochinolonů. Dalším příkladem je modifikace vazebného místa, buď jeho bodovou mutací (rifampicin), enzymatickou změnou (makrolidy), nebo přesunem/bypassem cílového místa (MRSA, VRE). (Spížek 1999)

3.1.4 Úprava bakteriálního metabolismu

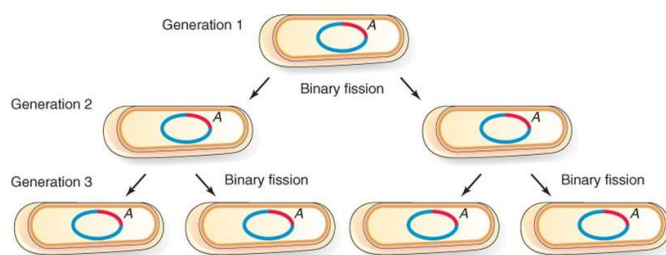
Příkladem vzniku této rezistence jsou sulfonamidy a trimethoprim. Tato ATB blokuje metabolismus kyseliny listové. Rezistentní bakterie se však vyvinuly tak, že využívají jiné metabolické dráhy. Tím se vyhnou zablokované části metabolismu a ATB se tak stávají neúčinná. (Jedličková, 2004)

3.2 Přenos rezistence

3.2.1 Vertikální přenos

Vertikálním přenosem se kopíruje genetická informace na přímé potomstvo. Z jedné bakteriální buňky tak vzniká několik generací dceřiných buněk, které nesou stejnou genetickou informaci jako mateřská buňka. (**Obrázek 4**). Tímto typem přenosu se obvykle šíří pouze chromozomálně lokalizované rezistence – většinou typické pro druh. Ale také rezistence získané, které byly do bakteriálního chromozomu přeneseny a vymezeny pomocí mobilního elementu – jde zejména o transpozony a genové kazety.

Obrázek 4 **Vertikální přenos rezistence.**



Dostupné z: <http://player.slideplayer.com/23/6644219/data/images/img10.jpg>

3.2.2 Horizontální přenos

Horizontální přenos genetické informace je proces, při němž jeden organismus přijímá genetický materiál (DNA) jiného jedince, ačkoliv není jeho potomkem. Tím může získávat nové vlastnosti. Nejčastěji pomocí mobilních genetických elementů (MGE) jako jsou plazmidy, transpozony a genové kazety. Těmito mechanismy si bakterie mohou předávat geny pro rezistenci v rámci jednoho druhu, ale i mezidruhově.

Plazmid je kruhová molekula kyseliny deoxyribonukleové, která se replikuje a přenáší nezávisle na chromozomu, a může nést rezistenci k jednomu nebo více ATB. Přenos plazmidu je realizován nejčastěji konjugací pomocí F-pilů, méně často transformací nebo transdukcí pomocí bakteriofágu. Každá bakteriální buňka může obsahovat i několik (i tisíc) kopií jednoho plazmidu. Mají velmi úzké spektrum hostitelů, např. plazmidy gram-negativních bakterií nemohou přenášet rezistenci gram-pozitivních bakterií. (Spížek, 1999)

Transpozony jsou zvláštní sekvence DNA, které se mohou pohybovat z jedné replikační jednotky na druhou, proto se jim také říká „přeskakující geny“. Mohou kódovat rezistenci vůči širokému spektru ATB. (Spížek, 1999)

Genové kazety přenáší pouze jeden gen, který kóduje rezistenci proti určitému ATB. Také přenáší skupinu receptorových prvků a integronů, které poskytují místa pro splynutí kazety, ale také kódují enzym pro pohyb genu. Zanoření a vytržení genové kazety z integronu je zprostředkováno specifickou rekombinací. Integrony se sami o sobě mohou

přemísťovat, což je velmi podstatné pro přemísťování rezistentních genů mezi různými druhy bakterií. Tento pohyb umožňuje integronům a rezistenčním genům připojit se na plazmidy se širokým spektrem hostitelů. Genové kazety se mohou zanořit do integronů, nebo se z nich odtrhnout, nebo dochází k zanoření na jiném místě chromozomu. Tímto způsobem vznikne sekvence několika rezistentních genů. (Spížek, 1999)

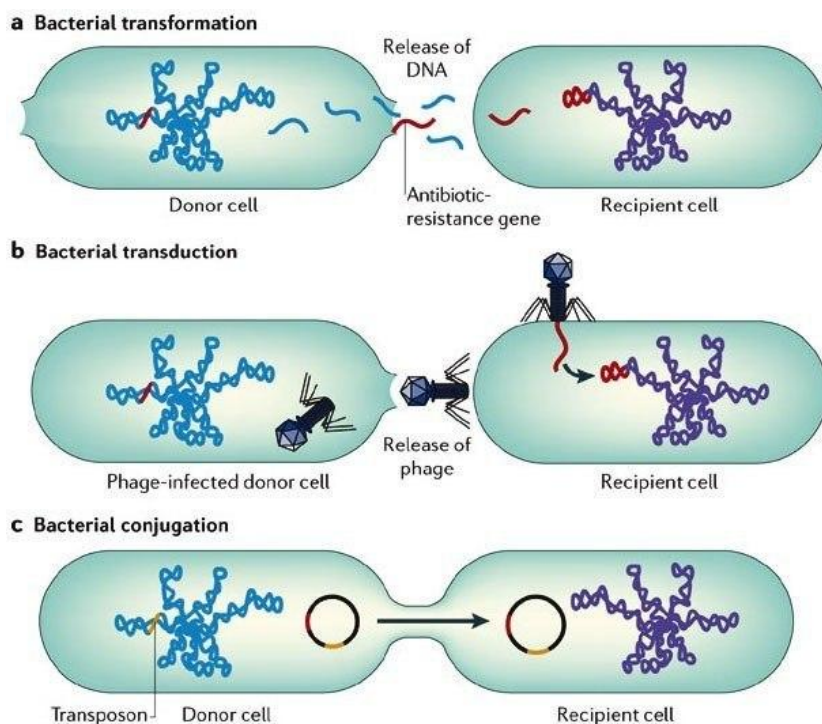
Rozlišují se tři základní mechanismy horizontálního přenosu genetické informace: bakteriální konjugace, transformace, transdukce.

Bakteriální konjugace je výměna DNA mezi dvěma bakteriemi, které se na krátkou dobu spojí. Bakteriální buňka poskytující svou DNA se nazývá donor, ovšem sama žádnou genetickou informaci nepřijme. Naopak buňka, která genetickou informaci přijímá se nazývá recipient. K výměně DNA je nutné, aby se bakteriální buňky přiblížily a navzájem propojily pomocí pilů. DNA se přenáší přes pily ve formě plasmidů nebo transpozomů (**Obrázek 5**). Bakterie lze rozdělit na samčí a samičí pomocí fertilního faktoru (F-pili), pokud se v bakterii nachází, jde o samčí bakteriální buňky a označí se jako F+. Samičí bakterie se tedy označuje F-. Fertilní faktor se v bakterii nachází buď na chromosomu nebo je uložený volně v buňce. (Desbyshire a kol., 2014)

Bakteriální transformace je příjem DNA bez vzájemného kontaktu mezi donorem a recipientem. Recipient tak genetickou informaci přijme z volného prostředí např. od usmrcené bakterie. DNA se přichytí na buněčnou stěnu recipienta, pronikne do cytoplazmy a pomocí crossing-overu se integruje do chromosomu bakterie (**Obrázek 5**). (Chen, a kol., 2004; Johnsborg, a kol., 2007)

Bakteriální transdukce je přenos DNA pomocí bakteriofágů, které integrují svou genetickou informaci do chromosomu bakterie. Takto zabudovaná DNA může chromosom opustit a virus se tak uvolní z buňky (**Obrázek 5**). (Derbyshire, a kol., 2014)

Obrázek 5 Znárodnění jednotlivých typů horizontálního přenosu rezistence.



Dostupné z: <https://microbeonline.com/wp-content/uploads/2013/09/Horizontal-gene-transfer-mechanism.jpg>

3.3 Nejsledovanější rezistence současnosti

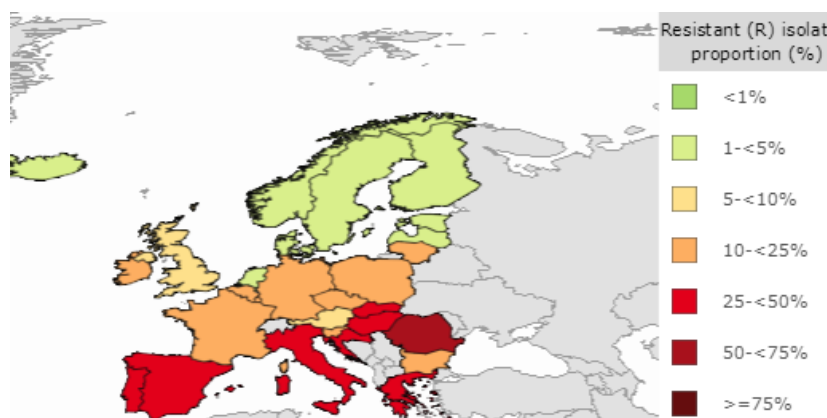
3.3.1 MRSA

MRSA (z angl. methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*) je kmen z rodu *Staphylococcus aureus*, který je rezistentní vůči působení methicilinu. V dnešní době se vyskytuje 90 % kmenů *Staphylococcus aureus* rezistentních na penicilin. Z tohoto důvodu byly vyvinuty semisyntetické peniciliny např. methicilin, u nás oxacilin, které jsou odolné proti působení penicilinas. Nově syntetizovaná ATB se ihned zavedla do praxe, ale velmi krátce poté byly identifikovány rezistentní kmeny k methicilinu a začaly se označovat názvem MRSA. Jedná se o kmeny, které produkují pozměněnou transpeptidasu, neboli PBP2a, při syntéze je kódována genem *mecA*. Takto rezistentní kmeny se rozšiřují velmi rychle a mohou být rezistentní i k dalším ATB. Největší problém představují

v nemocnicích, protože mohou způsobit vážné komplikace různých onemocnění. (Votava, 2010, Jedličková, a kol., 2012)

K prokázání MRSA se používá půda s oxacilinem. Pokud je u bakterie diagnostikována rezistence k oxacilinu, je pravděpodobné, že bakterie je rezistentní i k methicilinu. Samotná rezistence k oxacilinu může být způsobena nadbytečnou produkcí peniciliny. Z tohoto důvodu je doporučeno testovat u takového kmene i citlivost k cefoxitinu, protože v takovém případě může být bakterie také rezistentní. Stanovení citlivosti lze ještě doplnit o vyšetření genu *mecA* pomocí PCR nebo latexové aglutinace, kterou lze prokázat transpeptidasa PBP2a. (Votava, 2010)

Obrázek 6 Procentuální zastoupení MRSA v jednotlivých zemích Evropy za rok 2016.



Dostupné z: <https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>

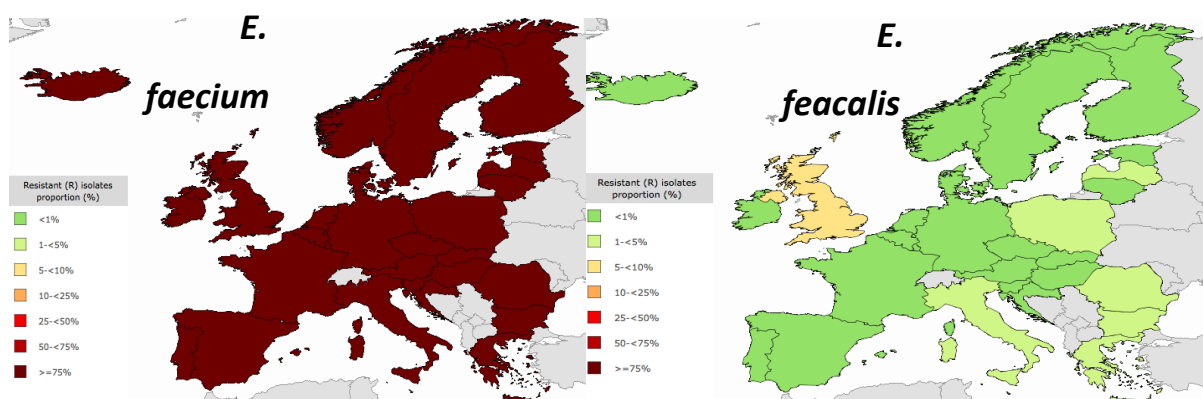
3.3.2 VRE

VRE (z angl. vancomycin-resistant *Enterococcus*) je kmen z rodu *Enterococcus* který se stal rezistentní na vankomycin. Rezistence k vankomycinu je založena na získání genů (*van*), které umožňují biochemickou změnu vazebního místa vankomycinu na peptidoglykanu. Konkrétně jde o záměnu aminokyseliny na terminálním konci peptidu, alanin za laktát (vysoký stupeň rezistence), nebo za serin (nízký stupeň rezistence). Do dnešní doby bylo identifikováno několik fenotypů rezistentních k vankomycinu, a to *vanA – vanE*, *vanG*, *vanL – vanN*, které se od sebe liší stupněm rezistence a mechanismem

přenosu. VRE představují stejný problém jako MRSA, je pouze velmi omezené množství léčiv, která lze použít k jejich terapii. (Votava, 2010)

Dle posledních epidemiologických šetření ECDC v rámci Evropy je většina kmenů (více jak 95%) *Enterococcus faecium* rezistentní k vankomycinu. Naopak *Enterococcus faecalis* zůstává zatím citlivý (Obrázek 7).

Obrázek 7 Srovnání rezistence k vankomycinu u kmenů *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis*, za rok 2016.



Dostupné z: <https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>

3.3.3 Karbapenemasy

Mezi velmi významné rezistence k ATB u gram-negativních bakterií patří rezistence na karbapenemy. Mezi nejdůležitější mechanismy vzniku rezistence patří produkce enzymů, která degradují karbapenemy – karbapenemasy. Karbapenemasy mohou být produkovány enterobakteriemi, které bývají rezistentní ke všem dostupným ATB ze skupiny β -laktamů. Jsou to enzymy produkované gram-negativními bakteriemi, které štěpí amidovou vazbu β -laktamového kruhu. Šíří se horizontálním přenosem genetické informace, nejčastěji pomocí konjugativních plazmidů. Celosvětově se vyskytuje spíše klonální přenos. Odhalení karbapenemas je důležitou podmínkou pro zavádění preventivních efektivních opatření, aby se zabránilo šíření této rezistence. Karbapenemasy jsou členěny, stejně jako ostatní β -laktamasy, dle klasifikace navržené K. Bush a

spolupracovníky, případně dle Amblera. V těchto klasifikačních systémech, jenž se vzájemně překrývají, jsou nalézány ve třech základních skupinách (**Tabulka 2**). (Hrabák, a kol., 2012)

Tabulka 2 **Klasifikace klinicky významných karbapenemas**

Skupina karbapenemas (dle Amblera)	Označení karbapenemas	Bakteriální druhy, u nichž byly tyto enzymy nalezeny
Skupina A	KPC GES, SME, IMI, NMC	<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia marcescens</i>) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>
Skupina B metalo-β-laktamasy	VIM, IMP, GIM, SIM, NDM, SPM, AIM, KMH, DIM, TMB	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>
Skupina D	OXA-48 Skupiny OXA-23,-58,-40	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>

Dostupné z: https://www.sneh.cz/_soubory/_clanky/12.pdf

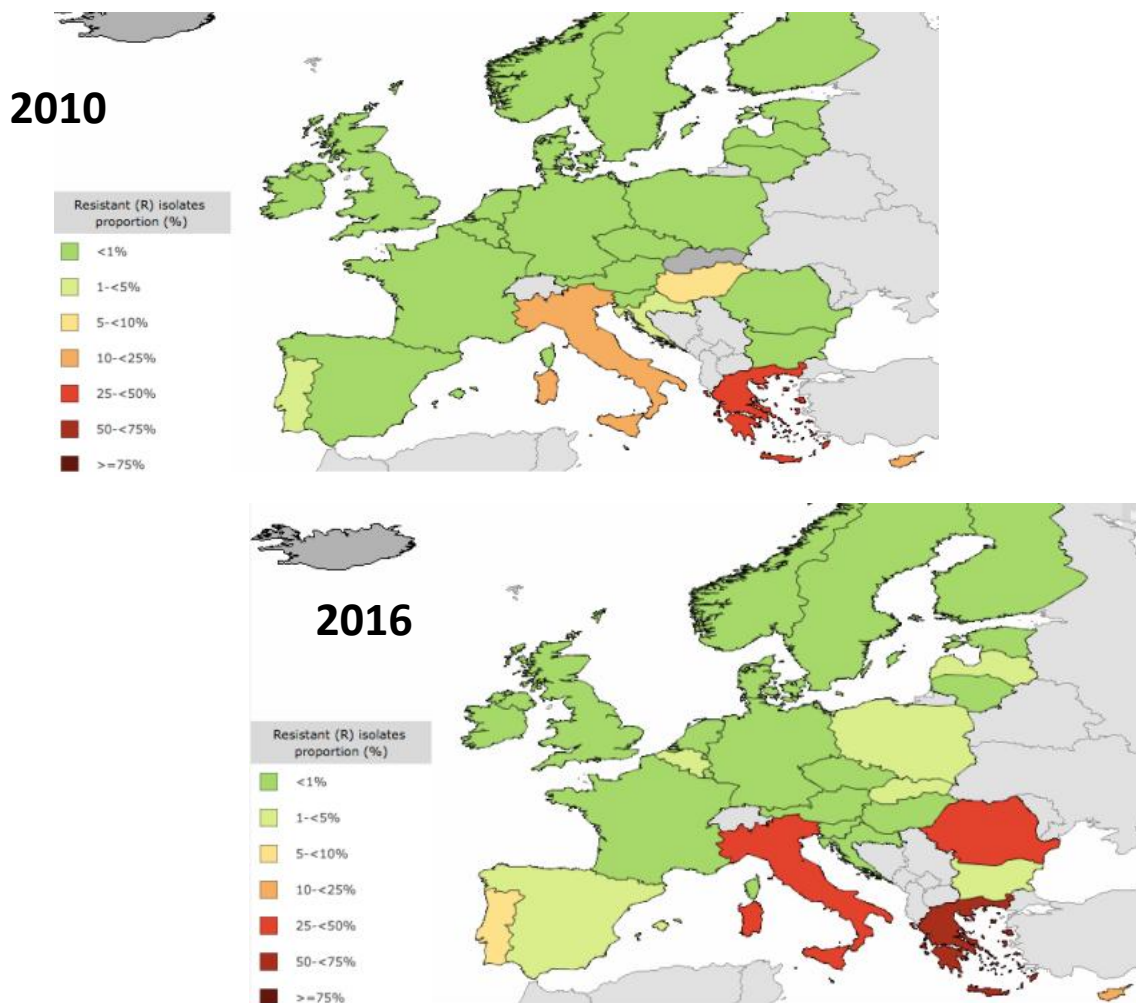
Karbapenemasy skupiny A hydrolyzují všechny β-laktamové ATB (peniciliny, cefalosporiny I. – IV. generace, karbapenemy i aztreonam), jsou jen slabě inhibovány inhibitory β-laktamas (klavulanová kyselina, sulbaktam, tazobaktam). Hlavním zástupcem je **KPC** (z angl. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), která byla poprvé objevena v Americe v roce 1996. KPC produkují zejména gramnegativní bakterie, nejčastěji *Klebsiella pneumoniae*. Možnosti léčby bakteriálních infekcí, která jsou způsobena KPC produkujícími kmeny je značně omezená. Bakteriální kmeny jsou obvykle citlivé k polymyxinům a aminoglykosidům. Ovšem byly popsány kmeny, které jsou rezistentní ke všem ATB. (Hrabák, a kol., 2010)

Karbapenemasy skupiny B se mohou označovat jako **metalo- β -laktamasy** (M β L). A rozdělují se na několik hlavních podtypů: **NDM**, **VIM** a **IMP**. Jsou substrátově specifické ke karbapenemům, cefalosporinům všech generací a penicilinům, nehydrolyzují aztreonam a nejsou inhibovány inhibitory β -laktamas. Při hydrolyze amidové vazby v β -laktamu je dárce molekuly vody iont – zinek (Zn^{2+}), který se váže v aktivním místě enzymu. Typ NDM (z angl. New Delhi metallo- β -laktamase) byl poprvé popsán v roce 2007 ve Švédsku u pacienta, který byl hospitalizován v Novém Dillí v Indii. Typ VIM (z angl. Verona integron-encoded metallo- β -lactamase) byl popsán v roce 1999 v italské Veroně a typ IMP (imipenem hydrolyzující) v 90. letech v Japonsku. M β L typu VIM a IMP se vyskytují nejčastěji u pseudomonád, naopak NDM u enterobakterií. (Hrabák, a kol., 2012)

Nejvýznamnější **karbapenemasou skupiny D** je typ **OXA-48**. Tento typ karbapenemas představuje velké riziko pro rozšiřování rezistence ke karbapenemům. Některé kmeny mají velmi nízkou MIC ke karbapenemům, jeví se tedy citlivě, a proto je jejich záchyt velmi náročný. Enzymy OXA mají různorodou substrátovou specifitu, hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny jen I. a II. generace, aztreonam a částečně karbapenemy. Doposud nebyla objevena spolehlivá fenotypová metoda, která by přesně určila tento enzym. Jedinou možností tak zůstávají molekulárně-genetické metody. (Hrabák, a kol., 2012)

Enterobakterie produkující karbapenemasy (CPE) jsou důležitou a rostoucí hrozbou pro celosvětové zdraví. Jak klonální šíření, tak plazmidem zprostředkovaný přenos, přispívají k pokračujícímu nárůstu výskytu těchto bakterií. Jejich výskyt je spojen s vysokou morbiditou a mortalitou, ale jsou i ekonomickou zátěží – dle CDC je za rok vynaloženo okolo 20 bilionů dolarů na léčbu infekcí způsobených MDR bakteriemi. V evropském měřítku je největší výskyt CPE v jižní a jihovýchodní Evropě – zejména Řecko, Itálie, Turecko a Rumunsko (**Obrázek 8**). (Van Duin, a kol., 2017)

Obrázek 8 Srovnání procentuálního výskytu invazivních izolátů *K. pneumoniae* produkujících KPC karbapenemasu za rok 2010 a 2016.



Dostupné z: <https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>

Dle směrnic EUCAST jsou izoláty enterobakterií považovány za rezistentní ke karbapenemům pokud MIC meropenemu stoupne nad 2 mg/ml, nebo je velikost inhibiční zóny menší než 22 mm. Více informací o break-pointech u meropenemu a ostatních karbapenemů udává **Tabulka 3**.

Tabulka 3 **Klinické break-pointy pro *Enterobacteriaceae*.**

	EUCAST v8.0			
	MIC [mg/ml]		Inhibiční zóny [mm]	
	C ≤	R >	C ≥	R <
Imipenem	2	8	22	16
Meropenem	2	8	22	16
Ertapenem	0,5	1	25	22
Doripenem	1	2	24	21

Zdroj: EUCAST break-points v8.0

3.3.4 Rezistence ke kolistinu

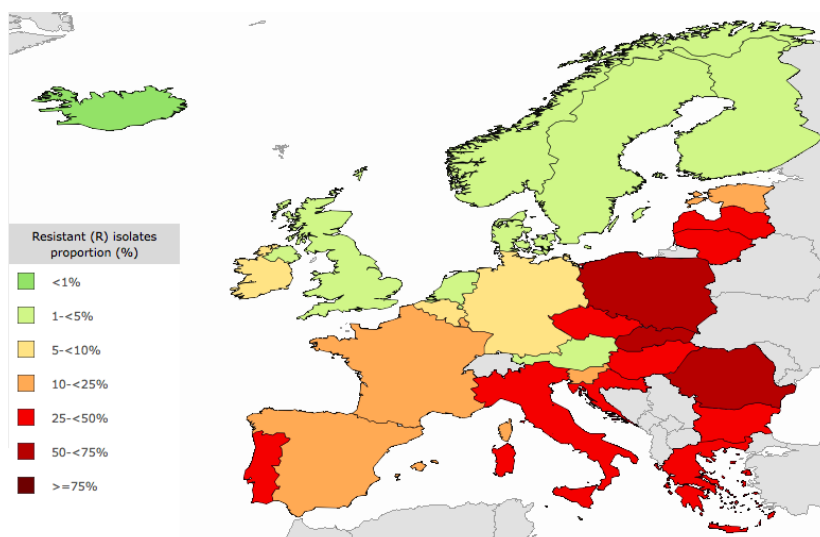
Kolistin se dnes využívá jako „last-line“ antibiotikum pro léčbu MDR gram-negativních bakterií, které jsou rezistentní k ostatním dostupným preparátům. Jeho cílovým místem účinku jsou lipopolysacharidy (LPS) buněčné stěny gram-negativních bakterií, které mají negativní náboj. Zde kolistin vychytává Mg^{2+} a Ca^{2+} ionty, které LPS stabilizují. Tím dochází k destabilizaci buněčné stěny, úniku buněčných komponent do prostředí a buněčné smrti.

Rezistence ke kolistinu bývá nejčastěji způsobená modifikací lipidu A (součást LPS) a to jeho substitucí, buď fosfoetanolaminem, nebo 4-amino-4-deoxy-L-arabinosou. To vede ke zvýšení náboje lipidu A a tím celého LPS, proto se na něj kolistin už nemůže navázat a bakterie se tak stává rezistentní. Na rezistenci ke kolistinu se mohou také podílet poriny, nebo efluxní pumpy. V roce 2015 byl objeven plazmid nesoucí gen *mcr-1*, který umožňuje šířit tuto rezistenci horizontálním přenosem, do té doby byly popisovány pouze přenosy chromozomální. Tato skutečnost může v budoucnosti představovat vážný epidemiologický problém. (Olaitan, a kol., 2014)

3.3.5 Multirezistence

Rozlišují se 3 skupiny multirezistence. Multirezistence neboli MDR (multi-drug resistant) je rezistence bakterie k jedné látce ve třech různých skupinách ATB. Extenzivní rezistenci XDR (extensive-drug resistant) vykazují bakterie, které jsou rezistentní alespoň k jedné látce u všech skupin ATB. Panrezistentní (PDR) bakterie jsou rezistentní ke všem skupinám ATB. O multirezistenci se mluví nejčastěji ve spojení s nozokomiálními infekcemi. Jedná se zejména o infekce způsobené kmeny MRSA, VRE a gramnegativní bakterie zejména ty které produkují širokospektré β -laktamasy. Aby se zabránilo vzniku a šíření takových to infekcí, je nutné zavést určitá preventivní opatření, jako jsou např. přesná mikrobiologická diagnostika, adekvátní ATB léčba, bariérový ošetrovací postup a izolace infekčně nemocného pacienta. Důležité také je sledovat výskyt rezistentních bakteriálních kmenů v rámci nemocnice a monitorovat používání a vztah ATB léčbou a vznikem rezistence. Je tedy nutná spolupráce mezi mikrobiologickým oddělením, ATB střediskem a oddělením hygieny a epidemiologie. (Sas, 2010)

Obrázek 9 Procentuální zastoupení rezistentní *Klebsiella pneumoniae* v Evropě s kombinovanou rezistencí k cefalosporinům III. generace, fluorochinolonům a aminoglykosidům v roce 2016



Dostupné z: <https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>

3.4 Faktory podílející se na vzniku rezistence

Když se zavedla ATB do klinické praxe, rezistentní kmeny prakticky neexistovaly, většinu lékařů tehdy ani nenapadlo, že by se rezistence mohla stát takovým problémem. Rezistence se objevila v důsledku celosvětového používání ATB. Pokud se na trh zavedla nová ATB látka, dříve nebo později se objevil bakteriální kmen k této látce rezistentní. Z určité části mohou za rychlý rozvoj rezistence sami bakterie. Jsou totiž neuvěřitelně geneticky proměnlivé a rychle si zvykají na nové prostředí. Dalším faktorem je nadměrné předepisování ATB v klinické praxi. Lékaři je mnohdy dávají pacientům, i když nejsou úplně nutná. K takovým to případům nejčastěji dochází u onemocnění respiračního traktu. Mohlo by se zdát, že za nárůst bakteriální rezistence může přehnané používání ATB ve zdravotnictví. Nelze ale opomenout používání ATB v zemědělství. Přidávají se např. do krmných směsí dobytku, nejen rychle nabyl na váze, ale hospodáři touto cestou předchází infekčním onemocněním zvířat. Takovéto používání ATB se podepisuje na nárůstu rezistence. Dalším problémem je vývoj nových antibiotických látek. Rezistence narůstá velmi rychle, takže výzkumné ústavy nestačí syntetizovat nové ATB látky. Pokud se bude bakteriální rezistence neustále rozšiřovat, objeví se kmeny stafylokoků a enterokoků odolné proti všem dostupným a používaným ATB. Lidská společnost by se pak ocitla tam, kde byla před objevením ATB látek. (Spížek, 1999)

Praktická část

4 CÍL PRÁCE

V bakalářské práci byly stanoveny 3 cíle:

C1: Seznámit se s problematikou karbapenemas a jejich šířením.

C2: Seznámit se s diagnostikou karbapenemas.

C3: Zpracování vybraných kmenů na základě jejich fenotypu.

5 METODIKA VÝZKUMU

V České republice se nacházejí dvě laboratoře, které analyzují tvorbu karbapenemas u podezřelých kmenů, a to Národní Referenční Laboratoř v Praze a Ústav mikrobiologie v Plzni. Kmeny jsou zde zasílány na základě rezistentních nebo hraničních MIC ke karbapenemům.

Základní metodou pro detekci tvorby karbapenemas je metoda hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátořem (MALDI-TOF MS), která umožňuje detekovat hydrolytickou aktivitu těchto enzymů vůči meropenemu. Pozitivní izoláty jsou poté podrobeny fenotypovému vyšetření s využitím inhibitorů, které bylo předmětem i této práce. Fenotypové testy jsou založeny na schopnosti některých látek inhibovat aktivitu karbapenemas. Petriho miska obsahující Mueller-Hinton agar (MH agar) se naočkuje vyšetřovaným bakteriálním kmenem a pokladou se disky: karbapenemy (meropenem) s/bez inhibitorů, temocilin, ceftazidim (cefalosporin III. generace) a prázdný disk.

Pro rutinní detekci karbapenemas typu A (zejména KPC) se využívá disk obsahující meropenem a kyselinu fenylboritou, která inhibuje jejich aktivitu. Pro detekci skupiny B - metalo- β -laktamas se používají disky, na které se přidá chelatační činidlo (EDTA, kyselina dipikolinová), které vychytává Zn^{2+} ionty, které jsou kofaktorem pro správnou aktivitu M β L. Pro ověření karbapenemas skupiny D lze použít disk s temocilinem. Po inkubaci se změří průměr inhibičních zón (IZ) u disků s i bez inhibitorů, jejich rozměry se srovnají. Na základě typického fenotypového obrazu je karbapenemasa zařazena do příslušné skupiny (A, B nebo C). (Hrabák, a kol., 2012)

Pro zjištění konkrétního typu enzymu v rámci skupiny je poté možné využít identifikaci s využitím molekulárně-genetických metod – zejména PCR.

6 POUŽITÝ MATERIÁL

6.1 Bakteriální kmeny

- *Escherichia coli* (42 994)
- *Citrobacter freundii* (I 435)
- *Enterobacter cloacae* (41 529)
- *Klebsiella pneumoniae* (42 901)
- *Klebsiella pneumoniae* (1947)

Tabulka 4 Informace o použitých bakteriálních kmenech.

Číslo vzorku	Bakteriální kmen	Datum odběru	Materiál	Diagnóza	Nemocnice
42 994	<i>Escherichia coli</i>	31. 1. 2018	Sputum	Cystická fibróza	FN Hradec Králové
I 435/1	<i>Citrobacter freundii</i>	21. 2. 2018	Rektální výtěr	Sepse	FN Plzeň
41 529	<i>Enterobacter cloacae</i>	25. 10. 2017	Krev	Otevřená rána bérce	FN Královské Vinohrady
42 901	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21. 1. 2018	Krev	Sepse	FN Motol
1947	<i>Klebsiella pneumoiaae</i>	9/2013	----	----	EQC The United Kingdom

Zdroj: Vlastní

Legenda: EQC – external quality kontrol

6.2 Použité agary

- Krevní agar (Oxoid, CZ)
- Mueller–Hinton agar (Oxoid, CZ)

6.3 Použité ATB disky a MIC

- disk napuštěný 10 mg ceftazidimu – CAZ (Oxoid, CZ)
- disk s 10 mg meropenemu – MER (Oxoid, CZ)
- disk obsahující 30 mg temocilinu – TEM (Oxoid, CZ)
- disk neobsahující žádné ATB (Oxoid, CZ)
- Microlatest MIC G- I a G- II (Erba Lachema s. r. o., CZ)

6.4 Roztoky

- 0,2 M EDTA, pH 7,8
- roztok kyseliny borité o koncentraci 60 mg/ml dimetylsulfoxidu (DMSO)
- roztok kloxacilinu o koncentraci 75 mg/ml vody
- MLT suspenzní médium MIC 200 (Erba Lachema, s. r. o. CZ)

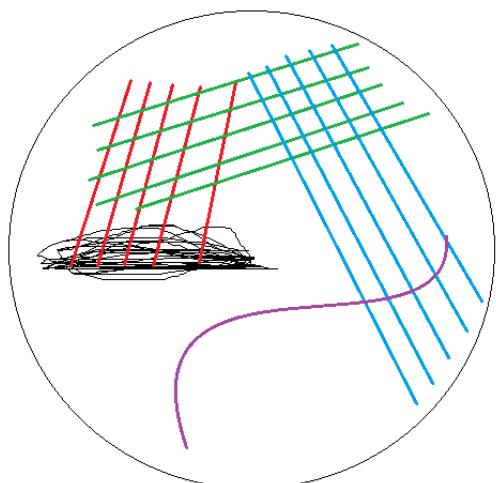
6.5 Další použité pomůcky

Bakteriologické kličky, lihový kahan, zkumavky s 5 a 10 ml fyziologického roztoku, sterilní vatová špejle, sterilní jehla, automatická pipeta o objemu 10 μ l, jednorázové špičky na pipetu, nádoba na ostrý odpad, termostat, automatická plnička ErbaFill (Erba Mannheim, Německo).

7 PROVEDENÍ VÝZKUMU

Nejprve byly připraveny kultury kmenů bakterií (viz **6.1**), u kterých byly známy jednotlivé typy karbapenemas. Tyto kmeny se naočkovaly na krevní agar klasickým způsobem (**Obrázek 10**) a nechaly se inkubovat 18-24 hodin při 37 °C v termostatu. Tento krok zajistil získání izolovaných kolonií.

Obrázek 10 **Očkovací schéma.**



Zdroj: Vlastní

Poté byly pro každý izolát stanoveny minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro běžně stanovovaná antibiotika, včetně karbapenemů. Jelikož všechny použité izoláty byly rezistentní ke karbapenemům a při MALDI-TOF MS analýze vykazovaly hydrolýzu meropenemu, bylo provedeno stanovení fenotypu karbapenemas.

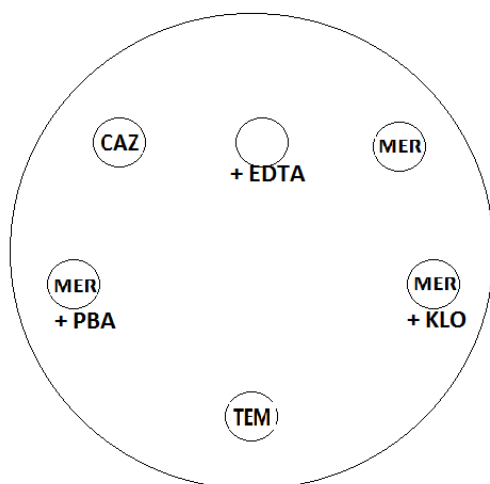
7.1 Stanovení MIC bakterií

Ke stanovení MIC byly použity komerční mikrotitrační destičky Microlatest MIC. Každý sloupec v destičce obsahoval 8 jamek s jedním typem ATB nařazeným geometrickou řadou. Na každý testovaný kmen byly použity dvě mikrotitrační destičky Microlatest MIC G- I a G- II. MIC destičky se pomocí automatické plničky ErbaFill naplnily suspenzním médiem MLT suspenzní médium MIC 200, tak že každá jamka po naplnění obsahovala 100 μ l média. Jednotlivé kmeny byly resuspendovány v 10 ml fyziologické roztoku, tak aby vznikl roztok o zákalu 0,5 McFarlanda. Pomocí sterilního inokulačního hřebene se jednotlivé suspenze naočkovaly do připravených destiček. Takto připravené destičky se nechaly inkubovat 18-24 hodin při 37 °C v termostatu a následující den se odečetly. Jako hodnota MIC se vždy považovala první koncentrace antibiotika bez viditelného nárůstu bakterií.

7.2 Fenotypový test karbapenemas

Jednotlivé izoláty byly resuspendovány v 5ml fyziologického roztoku, tak aby vznikl roztok o zákalu 0,5 McFarlanda. Poté se roztok pomocí nové vatové tyčinky inokuloval po celé ploše MH agaru. Tento postup se zvláště opakoval u každého kmene bakterií. Na plotny s rozetřeným inokulem se poté nakladly jednotlivé ATB disky a přikáply roztoky obsahující jednotlivé inhibitory. Celkem bylo na jednu plotnu použito 5 ATB disků, z toho byly 3 disky obsahující meropenem (MER), 1 disk s ceftazidimem (CAZ), 1 disk s temocolinem (TEM) a 1 disk bez obsahu ATB. Disky byly aplikovány s velkou pečlivostí a opatrností sterilní jehlou, aby se zamezilo případné kontaminaci. Na prázdný disk se poté pipetou přidalo 10 μ l roztoku 0,2 M EDTA, pH 7,8. Na jeden disk obsahující meropenem bylo přidáno 10 μ l kyseliny fenyloborité o koncentraci 60 mg/ml^{DMSO} a na druhý disk s meropenemem byl přidán 10 μ l kloxacilin o koncentraci 75 mg/ml^{H₂O} (**Obrázek 11**). Takto připravené plotny se nechali inkubovat 18-24 hodin při 37°C v termostatu a následující den byly odečteny jednotlivé inhibiční zóny.

Obrázek 11 Rozmístění disků s ATB na naočkovanou půdu.



Zdroj: Vlastní

8 Výsledky

Výsledky popisují zkoumané kmeny produkující jednotlivé typy karbapenemas včetně jejich profilu hodnot MIC. Dále obsahují fotografie jednotlivých ploten po inkubaci, kde jsou vidět vytvořené inhibiční zóny kolem nanesených ATB disků v kombinaci s inhibičními látkami. Velikosti jednotlivých inhibičních zón a hodnot MIC byly hodnoceny dle směrnic EUCAST v8.0.

8.1 Výsledky MIC

MIC je nejnižší koncentrace ATB, která je ještě schopna inhibovat růst testovaného kmene. Odečtená hodnota se poté srovnává s hraniční kontrolou (tzv. break point), ta je pro každé ATB pevně stanovena. Tyto hodnoty každoročně udává a aktualizuje společnost EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

Tabulka 5 a **Tabulka 6** ukazují, že všech 5 testovaných kmenů je rezistentní k většině použitých ATB. Jedná se tedy o izoláty s extenzivním typem rezistence (XDR).

Vzorek **42 994** *E. coli* je rezistentní ke všem β -laktamovým antibiotikům včetně cefalosporinů III. a IV. generace a karbapenemů. Tento fenotyp je typický pro karbapenemasy ze skupiny A (KPC). K části zbylých ATB je citlivost zachována. Kmen je citlivý ke kolistinu, tetracyklínům, kotrimoxazolu, chinolonům a gentamycinu.

Vzorek **41 529** *Enterobacter cloacae* je rezistentní k většině β -laktamových antibiotik, i karbapenemům. Zachovány pouze cefalosporiny IV. generace. Z aminoglykosidů zůstaly proti kmenu aktivní pouze netilmicin a amikacin. Kmen je také citlivý k tigecyklinu a kolistinu.

Vzorek **I 435** *Citrobacter freundii* je rezistentní ke všem β -laktamovým antibiotikům včetně cefalosporinů III. a IV. generace a karbapenemů. Kmen zůstal citlivý pouze k amikacinu a kolistinu.

Vzorek **1947** *Klebsiella pneumoniae* je rezistentní k většině β -laktamových antibiotik, i karbapenemům. Zachovány pouze protipseudomonádové peniciliny (piperacilin, piperacilin/tazobaktam), a aztreonam. Ze zbylých antibiotik zůstal aktivní pouze kolistin.

Vzorek **42 901** *Klebsiella pneumoniae* je rezistentní ke všem β -laktamovým antibiotikům včetně cefalosporinů III. a IV. generace. Meropenem vykazuje hraniční hodnoty MIC, což je typické pro OXA-48. Ze zbylých antibiotik jsou účinné pouze tetracykliny, amikacin a kolistin.

Tabulka 5 **MIC GN1**. Koncentrace ATB jsou uvedeny v mg/ml.

	AMP	AMS	CFZ	CXM	AZT	GEN	AMK	COL	COT	CIP	CMP	TET
Break point	8	8	2	8	1	2	8	2	2	0,5	8	4
42 994	>128	>128	>16	>64	16	1	16	1	0,5	0,125	8	1
41 529	>128	>128	>16	>64	1	2	4	1	>4	2	16	4
I 435	>128	>128	>16	>64	>16	32	4	1	>4	>8	8	>32
1947	128	128	>16	>64	<0,125	16	16	1	4	2	32	8
42 901	>128	64	>16	>64	>16	8	4	1	>4	4	8	1

Legenda:

Oranžová barva označuje hodnoty MIC stejné jako je break point

Červeně jsou označeny odečtené hodnoty MIC, které jsou vyšší, než je hodnota break point. To znamená že bakteriální kmen je k takové ATB koncentraci rezistentní.

Zelená barva označuje hodnoty MIC nižší, než je break point. Znamená to, že bakteriální kmen je k takové koncentraci ATB citlivý.

AMP – ampicilin, AMS – ampicilin/sulbactam, CFZ – cefazolin, CXM – cefuroxim, AZT – aztreonam, GEN – gentamycin, AMK - amikacin - COL – kolistin, COT - kotrimoxazol, CIP – ciprofloxacín, CMP - chloramfenikol, TET – tetracyklin

Tabulka 6 MIC GN 2. Koncentrace ATB jsou uvedeny v mg/ml.

	PIP	PPT	CTX	CAZ	CPZ	CPS	CEP	MER	ERT	TCG	NET	TOB
Break point	8	8	1	1			1	2	0,5	1	2	2
42 994	32	64	8	16	8	8	1	2	>2	0,5	16	8
41 529	16	16	8	16	16	16	0,5	2	2	0,5	1	2
I 435	>128	>128	>8	>16	>64	64	8	4	>2	1	2	8
1947	4	4	>8	>16	32	32	4	2	2	1	2	>8
42 901	128	128	>8	>16	64	8	4	<0,125	2	0,5	2	8

Legenda:

Oranžová barva označuje hodnoty stejné jako je break point

Červeně jsou označeny odečtené hodnoty, které jsou vyšší, než je hodnota break point

Zelená barva označuje hodnoty nižší, než je break point.

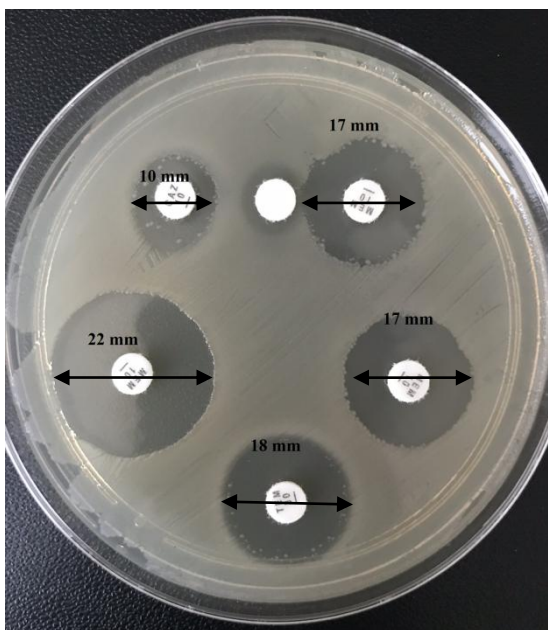
PIP – piperacilin, PPT – piperacilin/tazobactam, CTX - cefotaxim, CAZ – ceftazidim, CPZ - cefoperazon, CPS – cefoperazom/sulbaktam, CEP – cefepim, MER – meropenem, ERT – ertapenem, TGC – tigecyklin, NET – netilmicin, TOB – tobramycin

8.2 STANOVENÍ FENOTUPŮ IZOLÁTŮ

8.2.1 KPC (skupina A)

Karbapenemasy typu A včetně KPC hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny I.–IV. generace, karbapenemy a aztreonam. Nejvíce jsou inhibovány kyselinou boritou, ta ale inhibuje i AmpC. Proto je na největší inhibiční zóna kolem ATB disku obsahující meropenem na který byla přidána kyselina boritá (PBA) – 22 mm. Za projev inhibice se dá považovat zóna, která je minimálně o 5 mm větší, než zóny okolo čistého MER (17 mm), a MER s kloxacinem (17 mm). Dále lze pozorovat, že kmen je rezistentní k ceftazidimu (10 mm), citlivý k temocilinu a není inhibován roztokem EDTA (**Obrázek 12**).

Obrázek 12 Fenotyp KPC.



Zdroj: vlastní

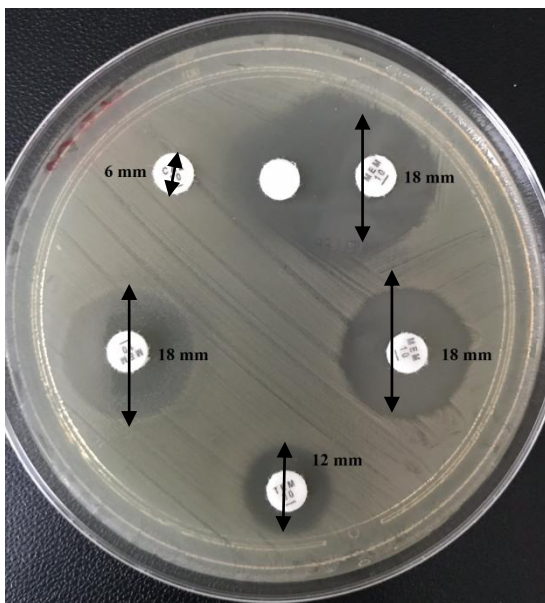
8.2.2 Skupina B

Metalo- β -laktamasy hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny I.–IV. generace a karbapenemy. Nehydrolyzují aztreonam. Nejvíce jsou inhibovány chelatačními činidly, jako je EDTA a kyselina dipikolinová.

NDM

Na **Obrázek 13** je nejvíce patrná deformovaná inhibiční zóna mezi diskem s EDTA a meropenemem, která ukazuje na zástupce skupiny B. Dále lze pozorovat, že všechny inhibiční zóny kolem disků s meropenemem mají stejnou velikost (18 mm) – nedošlo tedy k inhibici.

Obrázek 13 Fenotyp NDM.



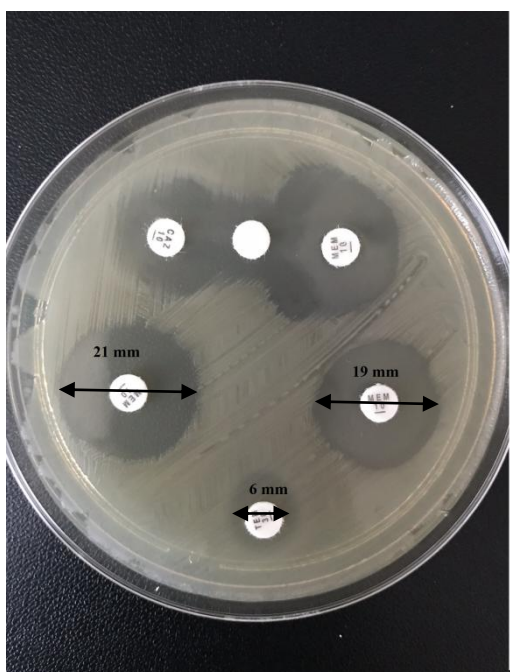
Zdroj: Vlastní

VIM

Stejně jako karbapenemasy typu NDM pozorujeme deformovanou inhibiční zónu mezi diskem s EDTA a meropenemem. Navíc je ještě patrná deformace směre k ceftazidimu. Dále lze pozorovat stejně velké inhibiční zóny vytvořené kolem disku s meropenemem a kyselinou boritou a disku s meropenemem a kloxacilinem. Temocilin je rezistentní (

Obrázek 14).

Obrázek 14 **Fenotyp VIM.**



Zdroj: Vlastní

IMP

Obdobně jako u předchozího zástupce metalo- β -laktamas je viditelná deformace inhibiční zóny okolo disku s EDTA, jak na stranu s meropenemem, tak k ceftazidimu. Inhibiční zóny okolo meropenemů s kyselinou fenyloboritou, nebo kloxacilinem jsou přibližně stejné. Temocilin je rezistentní (Obrázek 15).

Obrázek 15 Fenotyp IMP

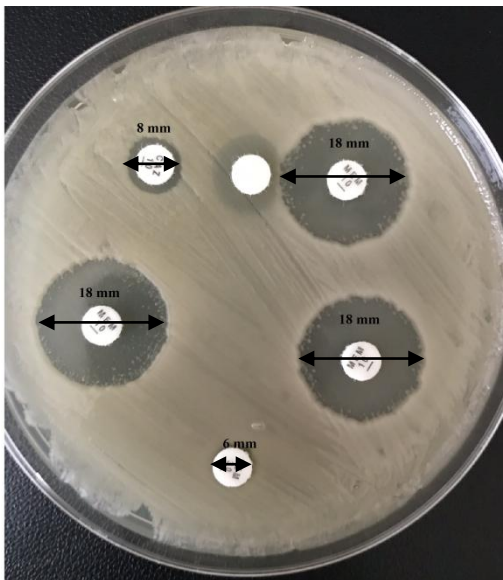


Zdroj: Vlastní

8.2.3 OXA-48 (skupina D)

Karbapenemasy skupiny D hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny I.–II. generace, aztreonam a karbapenemy. Dle **Obrázek 16** je patrné, že rozměry inhibičních zón okolo všech meropenemů jsou stejné (18 mm), nejedná se tedy o karbapenemasu ze skupiny A. U disku s EDTA není patrná deformace, proto se nejedná ani metalo- β -laktamasu. Pro skupinu D je typický rezistentní temocilin (6 mm). Ale není to naprosto jednoznačné, proto je nutné všechny karbapenemasy ze skupiny D ověřovat molekulárně-genetickými metodami.

Obrázek 16 Fenotyp OXA-48.



Zdroj: Vlastní

9 DISKUZE

V současnosti dochází v mnoha zemích k významnému šíření multirezistentních gramnegativních bakterií, především druhů *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* a zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*. Z epidemiologického hlediska nejvýznamnějším typem rezistence je produkce karbapenemas, které hydrolyzují většinu β -laktamových antibiotik, včetně karbapenemů a cefalosporinů IV. generace. Mezi nejvíce rozšířené typy karbapenemas patří enzymy KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) u enterobakterií, a metalo- β -laktamasy (např. VIM, NDM a IMP) u enterobakterií a pseudomonád. Léčba infekcí způsobených těmito bakteriálními izoláty je výrazně omezena a často finančně náročná. Nejsou výjimkou ani kmeny rezistentní ke všem dostupným antibiotikům, včetně těch rezervních (např. kolistin).

Prvním izolátem tohoto druhu v České republice byl kmen produkující KPC-2 v roce 2009 od pacienta dříve hospitalizovaného v Řecku. (Hrabák, a kol., 2011) Druhý izolát byl získán o dva roky později, v roce 2011, od pacienta s předchozí hospitalizací v Itálii. Jednalo se opět o producenta KPC, ale podtyp 3. (Hrabák, a kol., 2013) Tento typ rezistence se velmi snadno šíří pomocí mobilních genetických elementů, ale mohou se rozšiřovat i klonálně. Z těchto důvodů je nezbytně nutné se k takovým kmenům chovat stejně jako k jiným multirezistentním mikrobům, jako jsou například MRSA, VRE, nebo kmeny produkující širokospektré β -laktamasy. To zejména znamená dodržování správných hygienických návyků, dezinfekce rukou, izolace zasažených pacientů od ostatních, a v neposlední řadě správná antibiotická terapie.

Vyšetření citlivosti původců bakteriálních infekcí k antibiotikům je základním zdrojem informace pro cílenou a účinnou volbu antibiotika k cílené léčbě daného pacienta. V současné době existuje řada metod pro detekci karbapenemas. Existuje tzv. Hodge test, který detekuje aktivitu karbapenemasy přímou metodou, ale v Evropě se nepovažuje za vhodnou diagnostickou metodu. Za referenční metodu je považováno spektrofotometrické stanovení hydrolytické aktivity karbapenemas v bakteriálním extraktu. Tato metoda však není spolehlivá pro detekci karbapenemas u *Acinetobacter baumannii*. Obecně se jedná o technicky náročnou metodu, nevhodnou pro rutinní použití. Proto je využívána pouze referenčními laboratořemi. (Cornaglia, a kol., 2007)

V roce 2011 byla týmem doc. Hrabáka vyvinuta metoda na detekci karbapenemas pomocí MALDI-TOF MS, založená na detekci degradačních produktů meropenemu. Metoda je navrhnutá tak, aby byla jednoduchá a šla použít v rutinní diagnostice. Tato metoda detekuje molekuly karbapenemu a jeho různých variant, poskytuje tak reálné informace o produkci karbapenemas. Výsledkem jsou spektra, která jsou dále analyzována. Pokud se touto metodou stanoví kmen produkující karbapenemasy, ve výsledném spektru se objeví peaky, které prezentují degradační produkty meropenemu ovšem meropenem ani jeho sodné soli nejsou přítomny. Pokud testovaný kmen neprodukuje karbapenemasy, ve spektru je zastoupen meropenem a sodné soli. Nenalezneme zde žádné degradační produkty. Kmen se označí jako producent karbapenemas poté, co se ve výsledném spektru objeví aspoň jeden degradační produkt meropenemu. (Hrabák, a kol., 2011) Touto metodou je možné detekovat i karbapenemasy typu OXA-48 po přidání bikarbonátu amonného. (Študentová a kol., 2015) Tato metoda nám umožní získat validní výsledek během 3 hodin.

Dále lze použít molekulárně-genetické techniky, které detekují konkrétní geny karbapenemas. Proto jsou používány pro konečnou identifikaci typu karbapenemasy. Patří sem metoda PCR nebo stanovení na mikročipu. Metoda PCR je založena na end-point PCR s detekcí PCR produktu na gelu, která je časově a prakticky náročná. Ale je možné využít i real time PCR, která zkrátí dobu provedení přibližně na 2 hodiny. DNA mikročipy lze využít pro detekci různých sekvencí. Pro vlastní stanovení ale nelze použít DNA izolovanou z klinického materiálu a je tak nutné DNA izolovat z bakteriální kultury. Kvalita provedení izolace DNA velmi významně ovlivňuje výsledky

Pro náš výzkum jsme použili metodu fenotypových inhibičních testů. Tato metoda není těžká na zpracování, ale je časově náročná. V praxi se používá pro zjištění skupiny, do které daná karbapenemasa náleží. V rámci nácviku bylo zpracováno pět MALDI-TOF pozitivních enterobakterií se známým fenotypem karbapenemas (A, B a D). Cílem práce bylo naučit se bezpečně rozpoznat jednotlivé skupiny karbapenemas a jejich fenotypový projev v přítomnosti inhibujících látek. Pro bližší dourčení by bylo potřeba využít PCR identifikaci.

10 ZÁVĚR

Bakteriální rezistence patří k největším problémům současné medicíny. Bakterie doposud citlivé se pomalu stávají rezistentními a u již rezistentních bakterií rezistence stále narůstá. Na interaktivních mapkách dostupných na [ECDC – EARS-Net](#) je vidět jak se jednotlivé bakteriální kmeny v průběhu posledních 10 let mění z citlivých na rezistentní k příslušným ATB. Současnou situaci by mohla změnit nově syntetizovaná ATB, ale jen vývin jedné léčivé látky je záležitostí na několik let. Nezbyvá tak nic jiného než ATB aplikovat jen v případě nutnosti a zacházet s nimi zodpovědně.

11 Použitá literatura

BIALVAEI, Abed Zahedi, SAMADI KAFIL, Hossein. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Current medical research and opinion* [online]. 2015, 31(4), 707-721 [cit. 2018-02-27]. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com>

CORNAGLIA, Giuseppe, et al. Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *International journal of antimicrobial Agents* [online]. 2007, 29(4) 380-388 [cit. 2018-03-05]. ISSN 09248579. Dostupné z: <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/79840/1/cornaglia.pdf>

DERBYSHIRE, Keith M.; GRAY, Todd A. Distributive conjugal transfer: new insights into horizontal gene transfer and genetic exchange in mycobacteria. *Microbiology spektrum* [online]. 2014, 2(1), [cit. 2018-03-03]. ISSN 2165-0497. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4259119/>

HRABÁK, Jaroslav, et al. Komentář k polskému doporučení postupu při výskytu kmenů Enterobacteriaceae produkujících karbapenemázy typu KPC ve zdravotnických zařízeních. *Zprávy EM* [online]. 2010, 19.6-7: 196-198 [cit. 2018-03-09]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/>

HRABÁK, Jaroslav, et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Czech patient previously hospitalized in Greece and in vivo selection of colistin resistance. *Folia microbiologica* [online]. 2011, 56(361), [cit. 2018-03-05]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12223-011-0057-6>

HRABÁK, Jaroslav, et al. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*. [online]. 2011, 49(9), 3222-3227, [cit. 2018-03-05]. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/49/9/3222.full>

HRABÁK, Jaroslav, et al. Detekce karbapenemáz u enterobakterií pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (MS), fenotypových inhibičních testů a molekulárně-mikrobiologickými technikami. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* [online]. 2012, 21(4), 148-156, [cit. 2018-03-06]. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/49/9/3222.full>

HRABÁK, Jaroslav, et al. Czech Participants of European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. 2013. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Czech Republic in 2011. *Euro Surveill*, 18: 45.

CHEN, Inês; DUBNAU, David. DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2004, 2(3), 241, [cit. 2018-02-26]. Dostupné z: <http://faculty.fmcc.edu/freeman/webpages/micro/readings/DNA%20UPTAKE%20DURING%20BACTERIAL.pdf>

JEDLIČKOVÁ, Anna. (2003) *Mikrobiální terapie v každodenní praxi*. Praha: Maxdorf. ISBN 80-85912-63-5.

JOHNSBORG, Ola; ELDHOLM, Vegard; HÅVARSTEIN, Leiv Sigve. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Research in microbiology*. [online] 2007, 158(10), 767-778, [cit. 2018-02-26]. Dostupné z: <https://docs.ufpr.br/~microgeral/arquivos/pdf/pdf/Transformacao2007.pdf>

LOCHMANN, Otto. (1999) *Základy antimikrobiální terapie*. Praha: Triton. ISBN 80-72254-005-X.

MUNITA, Jose M.; ARIAS, Cesar A. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology spektrum* [online]. 2016, 4(2), [cit. 2018-03-10]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4888801/>

NYČ, Otakar. Novinky a trendy v antibiotické léčbě. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2017, 19(3), 142-144 [cit. 2018-02-20]. Dostupné z: <https://internimedicina.cz/>

OLAITAN, Abiola O.; MORAND, Serge; ROLAIN, Jean-Marc. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology*, 2014, 5(643), [cit. 2018-03-07]. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00643/full>

PAZDERKOVÁ, Jana, KREJČÍ, Jan, DLOUHÝ, Petr. 50 let s MRSA. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2012, 18(5), 132-141. ISSN 1211-264X.

SAS, Igor. Nozokomiální infekce a infekce multirezistentními organismy v podmínkách intenzivní péče. *Postgraduální medicína* [online]. 2010, 9: 1079-1092, [cit.

2018-03-10]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/nozokomialni-infekce-a-infekce-multirezistentnimi-organismy-v-podminkach-intenzivni-pece-455567>

SPÍŽEK, J. Rezistence na antibiotika: Je třeba hledat nové látky a nové postupy. *Přírodovědecký časopis Vesmír* [online]. 1999, [cit. 2018-01-20]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1999/cislo-1/rezistence-antibiotika.html>

STUDENTOVA, Vendula, et al. Detection of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in diagnostic laboratories can be enhanced by addition of bicarbonates to cultivation media or reaction buffers. *Folia microbiologica* [online]. 2015, 60(2), 119-129 [cit. 2018-03-08]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12223-014-0349-8>

VAN DUIN, David; DOI, Yohei. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence* [online]. 2017, 8(4), 460-69. [cit. 2018-02-26]. ISSN 2150-5594. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2016.1222343>

VENTOLA, C. Lee. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics* [online]. 2015, 40(4), 277-283. [cit. 2018-03-07]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/>

VOTAVA, Miroslav. (2001) *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun. ISBN 80-902896-2-2.

VOTAVA, Miroslav, et al. (2010) *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno: Neptun. ISBN 978-80-86850-04-8.

SOUČKOVÁ, Lenka, RUZSÍKOVÁ, Adriana. Nová antibiotika v klinické praxi a výzkumu. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2016, 30(3), 23-28, [cit. 2017-11-20] Dostupné z: <http://klinickafarmakologie.cz/>

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATB antibiotika

WHO World Health Organization

PBP Pencilin binding protein

MIC Minimální inhibiční koncentrace

Atd A tak dále

MDR Multri-drug resistant

LPS Lipopolysacharidy

MRSA Meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

PABA Kyselina *p*-aminobenzoová

ESBL Extended-spectrum β -laktamases

VRE Vankomycin rezistentní enterokoky

MGE Mobilní genetické elementy

KPC *Klebsiella pneumoniae* carbapenemas

NDM New Delhi metalo- β -laktamases

VIM Verona integron-encoded metallo- β -laktamases

IMP Imipenem hydrolyzující

CPE Enterobakterie produkující karbapenemasy

XDR Extensiv-drug resitant

IZ Inhibiční zóna

SEZNAM OBRÁZKŮ

OBRÁZEK 1 OBECNÝ VZOREC PENICILINU.	22
OBRÁZEK 2 CHEMICKÝ VZOREC CEFALOSPORINU.	24
OBRÁZEK 3 ČASOVÁ OSA VÝVOJE ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE.	35
OBRÁZEK 4 VERTIKÁLNÍ PŘENOS REZISTENCE.	38
OBRÁZEK 5 ZNÁZORNĚNÍ JEDNOTLIVÝCH TYPŮ HORIZONTÁLNÍHO PŘENOSU REZISTENCE.	40
OBRÁZEK 6 PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ MRSA V JEDNOTLIVÝCH ZEMÍCH EVROPY ZA ROK 2016.	41
OBRÁZEK 7 SROVNÁNÍ REZISTENCE K VANKOMYCINU U KMENŮ <i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i> A <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> , ZA ROK 2016.	42
OBRÁZEK 8 SROVNÁNÍ PROCENTUÁLNÍHO VÝSKYTU INVAZIVNÍCH ISOLÁTŮ <i>K. PNEUMONIAE</i> PRODUKUJÍCÍCH KPC KARBAPENEMASU ZA ROK 2010 A 2016.	45
OBRÁZEK 9 PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ REZISTENTNÍ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIE</i> V EVROPĚ S KOMBINOVANOU REZISTENCÍ K CEFALOSPORINŮM III. GENERACE, FLUROCHINOLONŮM A AMINOGLYKOSIDŮM V ROCE 2016.	47
OBRÁZEK 10 OČKOVACÍ SCHÉMA.	54
OBRÁZEK 11 ROZMÍSTĚNÝ DISKŮ S ATB NA NAOČKOVANOU PŮDU.	55
OBRÁZEK 12 FENOTYP KPC.	59
OBRÁZEK 13 FENOTYP NDM.	60
OBRÁZEK 14 FENOTYP VIM.	61
OBRÁZEK 15 FENOTYP IMP.	62
OBRÁZEK 16 FENOTYP OXA-48.	63

SEZNAM TABULEK

TABULKA 1 ROZDĚLENÍ B–LAKTAMOVÝCH ANTIBIOTIK.	21
TABULKA 2 KLASIFIKACE KLINICKY VÝZNAMNÝCH KARBAPENEMAS.	43
TABULKA 3 KLINICKÉ BREAK-POINTY PRO <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>	46
TABULKA 4 INFORMACE O POUŽITÝCH BAKTERIÁLNÍCH KMENECH.	52
TABULKA 5 MIC GN1. KONCENTRACE ATB JSOU UVEDENY V MG/ML.	57
TABULKA 6 MIC GN 2. KONCENTRACE ATB JSOU UVEDENY V MG/ML.	58