

# Multirezistentní bakterie animální provenience

**Autor:** Hruška M., Ostárek T., **Školitel:** Kolář M., prof. MUDr. Ph.D. Ústav mikrobiologie, LF UP v Olomouci

## Úvod

Zprávy o multirezistentních bakteriích se objevují stále častěji v mnoha různých zemích po celém světě. Kvůli rezistenci těchto bakterií skoro ke všem antibiotikům jsou léčebné postupy skutečně značně omezeny. K terapii infekcí vyvolaných těmito multirezistentními kmeny lze použít jen tzv. záložní antibiotika, mezi něž patří např. karbapenemy. Proto jsme se v naší studii zabývali právě výskytem gramnegativních bakterií rezistentních ke karbapenemům v animální oblasti, který může mít v budoucnu závažný dopad na lidskou populaci.

Rezistentní bakterie jsou takové, které přežijí vystavení účinku příslušného antibiotika. V případě multirezistentních bakterií mluvíme o odolnosti vůči působení 3 a více druhů antibiotik, v mnoha případech může být účinné pouze jedno či dvě antibiotika, výjimkou nejsou ani panrezistentní kmeny bakterií, odolné vůči všem testovaným antibiotikům.

Antibiotika jsou látky schopné usmrtit nebo aspoň inhibovat růst a množení mikroorganismů v dávkách, které zároveň nepoškozují makroorganismus (Votava, 2005). Antibiotika jsou vyráběna jako semi-syntetické či syntetické látky odvozené od původních produktů mikroorganismů nebo hub. Chemické látky vyráběné čistě chemickou cestou bez přírodního původu jsou nazývány *chemoterapeutika*. Antimikrobiální látky se dále dělí podle typu účinku na *baktericidní* a *bakteriostatické*. Baktericidní antimikrobní látky usmrcují mikroorganismy, fungují rychle a jejich působení je irreverzibilní. Baktericidní látky se proto používají při závažných klinických stavech a snížené obranyschopnosti pacienta. Bakteriostatické látky ovlivňují mikroorganismy reverzibilní inhibicí růstu a množení (Votava, 2005).

U bakterií rozlišujeme dva základní typy rezistence (Votava, 2005). Prvním typem je rezistence primární neboli přirozená. Jedná se o geneticky podmíněnou necitlivost nebo sníženou citlivost druhu vůči určitému antibiotiku. Druhým typem je rezistence sekundární neboli získaná. Ta vzniká, mimo jiné, jako následek antimikrobiální léčby. Může být výsledkem mutace chromozomu nebo je získána horizontálním přenosem cizorodé DNA v podobě plazmidů a dalších mobilních elementů.

U karbapenemových antibiotik je nejzávažnějším mechanismem sekundární rezistence produkce enzymů, konkrétně metalo-beta-laktamáz (MBL) a serinových karbapenemáz. Tyto enzymy hydrolyzují amidovou vazbu čtyř-členného  $\beta$ -laktamového kruhu (Hrabák 2012). Serinové karbapenemázy jsou enzymy destruuující všechna beta-laktamová antibiotika, jsou inhibovány kyselinou 3-aminofenylboritou (3-APB), slabě také kyselinou klavulanovou. MBL hydrolyzují beta-laktamy s výjimkou monobaktamů, jejich inhibitorem je ED-

TA. Tyto inhibitory se s výhodou používají ve fenotypové detekci těchto enzymů. Častým producentem výše zmíněných enzymů, zejména serinových karbapenemáz, jsou bakterie rodu *Acinetobacter*.

Rod *Acinetobacter* se řadí mezi medicínsky významné gramnegativní nefermentující aerobní tyčinky, nepohyblivé, známé svojí vysokou rezistencí. Nejznámějším zástupcem tohoto rodu je druh *Acinetobacter baumannii* (komplex *A.baumannii/A. calcoaceticus*), dalšími relativně častými druhy jsou *A. Iwofii* a *A. schindleri*. Jedná se o oportunní patogeny běžně se vyskytující v přírodě, u člověka na kůži a sliznicích, mohou ale způsobovat např. uroinfekce, pneumonie, někdy i život ohrožující sepse. Zvláště tyto kmeny jsou typické svojí multirezistencí, na níž se může právě podílet i produkce karbapenemáz. Léčba infekcí vyvolaných těmito bakteriemi je pak velmi obtížná.

Z uvedeného výše je zřejmé, že správná identifikace produkce karbapenemáz je velmi důležitým úkolem pro mikrobiologické laboratoře. Toto je velmi obtížné, protože laboratorní identifikace není v mnoha případech přesná. Při detekci vycházíme ze stanovení citlivosti vůči imipenemu, meropenemu nebo ertapenemu (fenotypové metody), ale neplatí, že by rezistence k antibiotiku znamenala produkci karbapenemáz. Rezistence ke karbapenemům může být způsobena i jinými mechanismy, a stejně tak produkce karbapenemáz může vykazovat falešnou citlivost (Htoutou Sedláková, 2014).

Určení citlivosti ke karbapenemům je možné stanovením minimální inhibiční koncentrace (MIC) pomocí diluční mikrometody a E-testu. EUCAST definuje rezistentní enterobakterie jako kmeny s hodnotou MIC > 2mg/l pro meropenem a imipenem a MIC > 0,5 mg/l pro ertapenem.

Pro detekci serinových karbapenemáz se využívá diskový test (CD test), používající disky imipenemu, imipenemu s 3-APB, meropenemu a meropenemu s 3-APB. V případě produkce serinových karbapenemáz dochází k rozšíření inhibiční zóny (IZ) kolem disku karbapenemu s 3-APB o více než 4 mm ve srovnání s IZ kolem disku s karbapenemem samotným (Pasteran, 2009).

Detekce MBL je založena na stejném principu inhibice enzymů jako průkaz ostatních širokospektrých beta-laktamáz, ale jako inhibitor se používá EDTA. Modifikovaný DDST k průkazu MBL za použití centrálního disku EDTA a kombinace disků imipenemu, imipenemu s EDTA, meropenemu a meropenemu s EDTA je specifickou metodou pro jejich detekci (Hrabák, 2007). Jako pozitivní výsledek je považováno rozšíření IZ kolem disku s inhibitorem o minimálně 5 mm ve srovnání s IZ kolem disku se samotným karbapenemem nebo deformace IZ rozšířením či projasněním ve směru centrálnímu disku s EDTA.

Pro současnou detekci produkce serinových karbapenemáz a MBL slouží kombinovaný test, který využívá kombinace disků meropenemu, meropenemu s 3-APB, meropenemu s EDTA a meropenemu s 3-APB a EDTA. Pozitivní výsledek je dán rozšířením IZ kolem disku s 3-APB nebo EDTA o nejméně 5 mm.

**Cílem práce** bylo zjištění, zda se ve veterinární oblasti vyskytují kmeny rezistentní ke karbapenemům a zda tyto kmeny produkují některé z výše zmíněných enzymů, což představuje potencionální zdroj pro šíření v lidské populaci.

## Materiál a metody

Od 1.11.2014 do 25.3.2015 bylo odebráno a vyšetřeno 450 vzorků z chovných hal nacházejících se na Moravě. Jednalo se převážně o vzorky drůbeže (*Gallus gallus*) a prasat. Vzorky byly v laboratoři zpracovány, zality peptonovou vodou (Trios), protřepány a inkubovány 24 hodin aerobně při 37 °C. Následně byla peptonová voda vyočkována na půdy BRILLIANCE™ CRE medium (Oxoid), které byly inkubovány 24 hodin aerobně při 37 °C. Suspektní izoláty byly identifikovány metodou MALDI TOF MS (Bruker) a jejich citlivost k antibiotikům byla stanovena diluční mikrometodou podle kritérií EUCAST. U izolátu s MIC meropenemu  $\geq 2$ mg/l byla citlivost potvrzena pomocí E-testu, současně u nich byly provedeny fenotypové testy pro průkaz karbapenemáz a metallo-beta-laktamáz, které byly popsány v úvodu textu. Fenotypově pozitivní izoláty byly podrobeny molekulárně genetické analýze k detekci příslušných genů.

Obr. 1 CD test

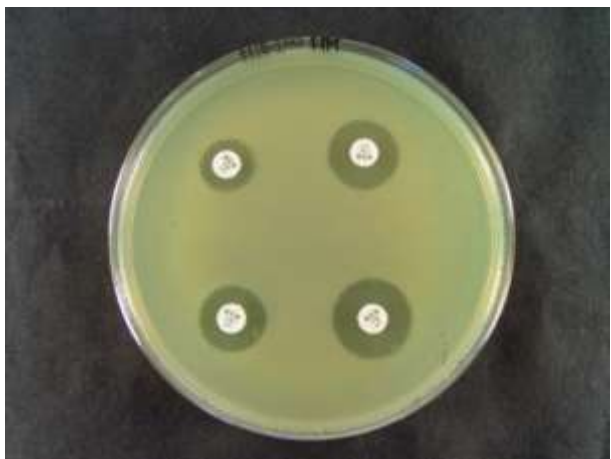


Obr. 2 MBL test



ZDROJ: Ústav mikrobiologie LF UP, vyfoceno 9.4.2015

Obr. 3 kombinovaný test



ZDROJ: Ústav mikrobiologie LF UP, vyfoceno 9.4.2015

## Výsledky

Z celkového počtu 450 vzorků bylo izolováno 33 acinetobaterů, přičemž u 2 kmenů *Acinetobacter* sp. (1 kmen *Acinetobacter lwofii* a 1 kmen *Acinetobacter schindleri*) byla potvrzena produkce serinových karbapenemáz typu OXA. Při porovnání s již popsány OXA enzymy ve světové literatuře však nedošlo ke stoprocentní kompatibilitě a tak je možné, že izolované enzymy jsou nově popsány karbapenemázami.

## Závěr

V naší práci jsme popsali dva acinetobaktery animální provenience se zcela novým genotypem. Tyto mohou představovat velké riziko i pro lidskou populaci z důvodu jejich rychlého přenosu a multirezistence k antimikrobním přípravkům.

## Zdroje

1. Hrabák J., 2007, *Klinicky významné  $\beta$ -laktamázy gramnegativních bakterií: AmpC*, Epidemiol. Microbiol. Immunol. 56: 155-165
2. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A., *Sensitive Screening Tests for Suspected Class A Carbapenemase Production in Species of Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 2009;47:1631–1639
3. Htoutou-Sedlakova M., Hanulik V., Chroma M., Hricova K., Šenkyříkova M., Kolař M.: *Rezistence enterobakterii ke karbapenemům*. *Klinická Mikrobiologie a Infekční Lekařství*. 2011, 17:12-18.
4. Hrabák J, Vaniš V, Bergerova T, Jindrak V, Chudačkova E, Urbaškova P., *Průkaz metalo-slaktamaz (MBL) u gramnegativních bakterií*. *Zpravy CEM (SZU, Praha)* 2007; 16:417-422
5. Hrabák M., Hugo J., a kol., *Velký lékařský slovník*, Maxdorf, 2009
6. Votava M, 2005, *Lékařská mikrobiologie obecná*, Neptun, Brno

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>