

Multirezistentní bakterie animální provenience

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

Úvod

V této práci jsme se zabývali bakteriemi s rezistencí k beta-laktamovým antibiotikům vyskytujícími se u hospodářských zvířat a multirezistentními kmeny v odpadních vodách zdravotnických zařízení. Změřili jsme se hlavně na gramnegativní nefermentující tyčinky a enterobaktérie animální provenience produkující širokospektré beta-laktamázy a v druhé části studie na přítomnost ESBL- a AmpC- pozitivních enterobakterií v odpadních vodách Fakultní nemocnice Olomouc.

Jako multirezistentní označujeme bakterie, které přežijí vystavení účinku příslušných antibiotik. Antibiotika se řadí mezi antimikrobiální látky schopné usmrtit nebo aspoň inhibovat růst a množení mikroorganismů v dávkách, které zároveň nepoškozují makroorganismus (Votava, 2005). Chemické látky produkované mikroorganismy jsou nazývány *antibiotika*. Antibiotika jsou dnes vyráběna jako semi-syntetické či syntetické látky odvozené od původních produktů mikroorganismů. 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 antimikrobiální 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).

V této práci jsme zkoumali účinnost antibiotik patřící do skupiny tzv. beta-laktamů. Jejich základní strukturou je beta-laktamový kruh skládající se z čtyřčlenné struktury obsahující tři atomy uhlíku a jeden dusík. V případě penicilinových antibiotik se k tomuto kruhu připojuje pětičlenný kruh obsahující atom síry, zatímco u cefalosporinů je připojený kruh šestičlenný. Vazbou dalších radikálů na základní strukturu se mění variabilita v rámci skupin a současně i vlastnosti nově vzniklých antibiotik (Příborský, 2004; Votava, 2005). Beta-laktamová antibiotika se v bakteriálních buňkách vážou na enzymy karboxylázy a transpeptidázy, které se účastní tvorby peptidoglykanu. Tyto enzymy katalyzují tvorbu peptidových a glycinových můstků, které spojují řetězce střídajících se molekul N-acetylglukosaminu a kyseliny N-acetylmuramové. Tato cílová místa jsou označována jako penicilin vázající neboli PBP (z angl. penicillin-binding proteins). Vazbou antibiotika na PBP se zastaví tvorba peptidoglykanu v buněčné stěně rostoucí bakterie. Zároveň se spouští autolytické enzymy, které rozvolňují již vytvořenou buněčnou stěnu. To způsobí lýzu bakteriální buňky. Beta-laktamová antibiotika

jsou z tohoto důvodu baktericidní (Votava, 2005). Beta-laktamová antibiotika se dělí podle struktury na peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy.

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 na určité antibiotikum. 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.

Pro tuto práci jsou důležité beta-laktamázy. Jsou to enzymy schopné hydrolyzovat beta-laktamový kruh penicilinových, cefalosporinových a dalších beta-laktamových antibiotik (Hrabák, 2007).

Materiál a metody

Detekce karbapenemáz je nutnou podmínkou pro provádění efektivních preventivních opatření pro zabránění šíření tohoto typu rezistence (Hrabák, 2012). V této studii jsme šedesát vzorků z vyšetřovaných jatečných brojlerů (*Gallus gallus*) naočkovali přímo na selektivní půdy (CHROMagar KPC), které jsou vhodné pro detekci rezistence ke karbapenemům. Po následné kultivaci byly získány izoláty, u nichž byla zjišťována minimální inhibiční koncentrace (MIC) meropenemu a imipenemu. Izolované bakterie pak byly dále identifikovány metodou MALDI TOF MS

Druhá část této práce byla zaměřena na přítomnost enterobakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC v odpadních vodách zdravotnického zařízení. Vzorky jsme opakovaně odebírali od 1. října do 10. prosince 2013 z odpadních vod Fakultní nemocnice Olomouc (FNOL). K záchytu byly použity selektivní půdy. Všechny izoláty byly identifikovány standardními mikrobiologickými postupy a metodou MALDI TOF MS.

Současně byla stanovena produkce ESBL a AmpC enzymů příslušnými fenotypovými testy a pozitivní výsledky byly confirmovány detekcí příslušných genů.

Výsledky

Ze vzorků trusu jatečných brojlerů byly na selektivních půdách pro detekci rezistence ke karbapenemům izolovány dva kmeny *Acinetobacter baumannii*. Následné stanovení minimálních inhibičních koncentrací meropenemu a imipenemu však nepotvrdilo reálnou rezistenci ke karbapenemům. Rovněž příslušné molekulárně-biologické testy na přítomnost genů kódujících tento typ rezistence byly negativní.

Na základě vyšetření odpadních vod FNOL bylo ze selektivních půd získáno 41 enterobakterií. Nejčastěji se jednalo o kmeny *Klebsiella pneumoniae* (29,3 %), *Escherichia coli* (22,0 %) a *Citrobacter freundii* (22,0 %). Celkem 20 izolátů (48,8 %) produkovalo širokospektré beta-laktamázy, u 13 se jednalo o ESBL a 7 kmenů produkovalo AmpC enzymy. ESBL- a AmpC-pozitivní enterobakterie byly současně multirezistentní s vysokou odolností k aminoglykosidům a fluorochinolonům. Účinek byl zachován v případě karbapenemů, kolistinu a tigecyklinu.

Závěr

V současné době je pozorována celosvětově stoupající rezistence bakterií k antibiotikům, která následně představuje vážný terapeutický problém. Multirezistentní bakterie jsou stále častěji detekovány nejen v lidské populaci, ale současně v animální oblasti a životním prostředí, včetně odpadních vod. Jako pozitivní výsledek předložené studie lze hodnotit skutečnost, že nebyly zachyceny karbapenem-rezistentní kmeny animální provenience. Na druhé straně je však nutné poukázat na přítomnost enterobakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC v odpadních vodách zdravotnického zařízení.

Zdroje:

1. Bush K., a kol., 1995, *A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure*, Antimicrob. Agents Chemother. 39: 1211-1233
2. Hawkey P.M., Jones A.M., 2009, *The Changing epidemiology of resistance*, J. Antimicrob. Chemother. 64: i3-i10
3. Hrabák J., 2007, *Klinicky významné β -laktamázy gramnegativních bakterií: AmpC*, Epidemiol. Microbiol. Imunol. 56: 155-165
4. Příborský J., 2004, *Peniciliny, farmakologie a klinická farmakologie*, Maxdorf, Praha, 105 s.
5. Sanders Ch. C., a kol., 1997, *Penicillin-binding proteins and induction of AmpC β -lactamase*. Antimicrob. Agents Chemother. 41:2013-2015
6. Votava M., 2005, *Lékařská mikrobiologie obecná*, Neptun, Brno
7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>