

# Prevalence karbapenem-rezistentních enterobakterií

v gastrointestinálním traktu hemato-onkologických pacientů

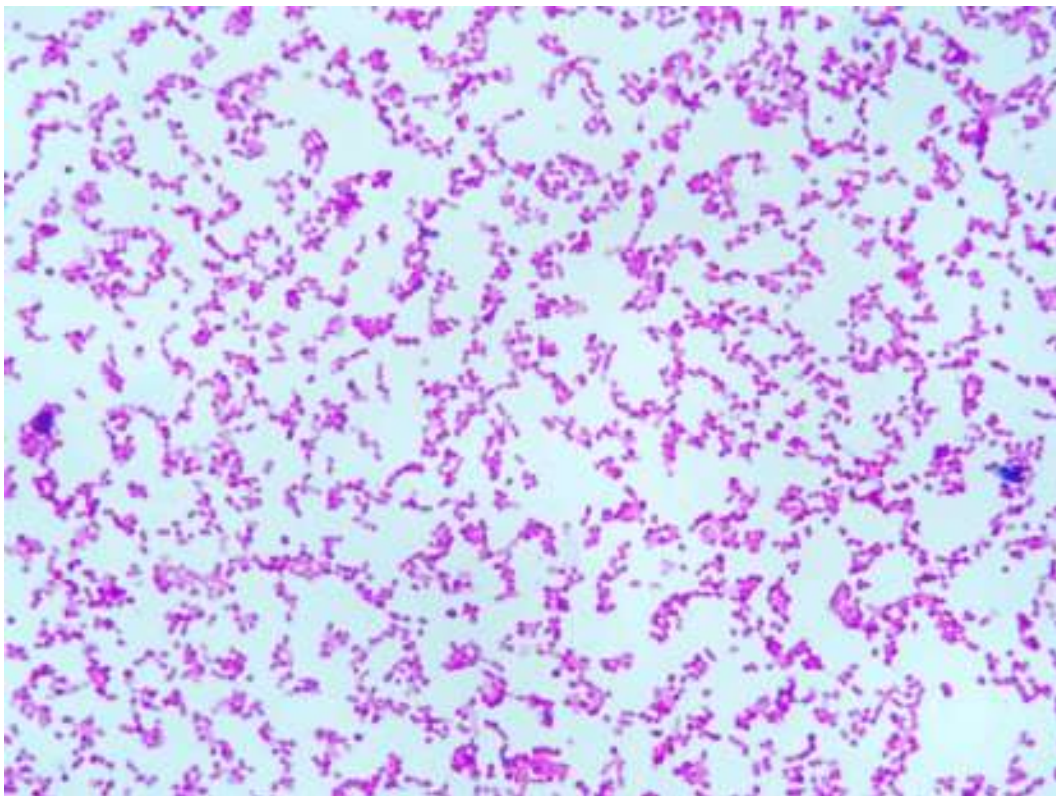
**Autor:** Martin Kubec, Michaela Ducháčková, **Školitel:** MUDr. Miroslava Htoutou Sedláková

Ústav mikrobiologie, LF UP v Olomouci

## Úvod a cíl práce

V naší práci jsme se zabývali studiem gramnegativních bakterií, tedy mikroskopických jednobuněčných organismů, které se Gramovým barvením barví červeně. Barvení podle Grama (Hans Christian Joachim Gram, 1884) umožňuje rozdělit bakterie do dvou hlavních skupin: grampozitivní (modrofialové) a gramnegativní (růžovočervené). Různá barvitelnost podle Grama souvisí se strukturálními rozdíly buněčné stěny mezi oběma skupinami bakterií [1].

Obr. 1 Gramnegativní bakterie



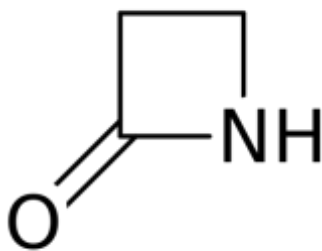
<http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/gram/tycka.jpg>, cit. 3.4.2015

V rámci široké a nesourodé skupiny gramnegativních bakterií jsme se navíc zaměřili konkrétně na bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, které jsou součástí přirozené střevní mikroflóry obratlovců. Do této rozsáhlé čeledi se řadí mnoho rodů bakterií. Některé jsou *obligátními lidskými patogeny*, což znamená, že vždy vyvolávají onemocnění, a to i u zdravých osob s nepostiženou odolností [2].

Příkladem je *Yersinia pestis*, původce moru, nebo *Salmonella enterica*, původce salmonelózy. Naše studie se ale zaměřuje na *patogeny oportunní*, které jsou součástí běžné mikroflóry střevní a nebezpečné se stávají až při jisté příležitosti, respektive za jistých podmínek, tedy většinou u jedinců se sníženou obranyschopností [2]. Takovouto příležitostí může být též zanesení oportunních enterobakterií mimo místo jejich přirozeného výskytu např. do dýchacích, či močových cest. Zde mohou vyvolávat mnohdy závažné infekce vyžadující adekvátní léčbu.

Součástí adekvátní léčby je podávání antibiotik. Antibiotika jsou antimikrobiální látky schopné usmrtit, nebo aspoň inhibovat růst a množení mikroorganismů v dávkách, které zároveň nepoškozují makroorganismus [2]. Enterobakterie mohou vykazovat proti takovým antibiotikům rezistenci, neboli odolnost, která je chrání před jejich účinky. Antibiotika se pak stávají neúčinnými. Tato odolnost může být *primární* (přirozená) vyplývající např. ze stavby bakterií nebo může být *sekundární* (získaná), kdy bakteriální kmeny primárně citlivé se mohou stát rezistentní [2]. Získaná rezistence vzniká mutací bakteriální DNA, která podmiňuje znak uplatňující se ve strategii přežití bakterie v přítomnosti antibiotika. Tyto mutace se mohou přenášet i mezi různými bakteriálními kmeny, nebo dokonce různými rody bakterií, tedy horizontálně, formou drobných fragmentů DNA, např. plazmidů. Rezistence bakteriálních kmenů lékařsky významných bakterií vůči antibiotikům stále stoupá. Děje se tak především tam, kde se antibiotika často používají, především v nemocnicích [2].

Obr. 2 Beta-laktamový kruh



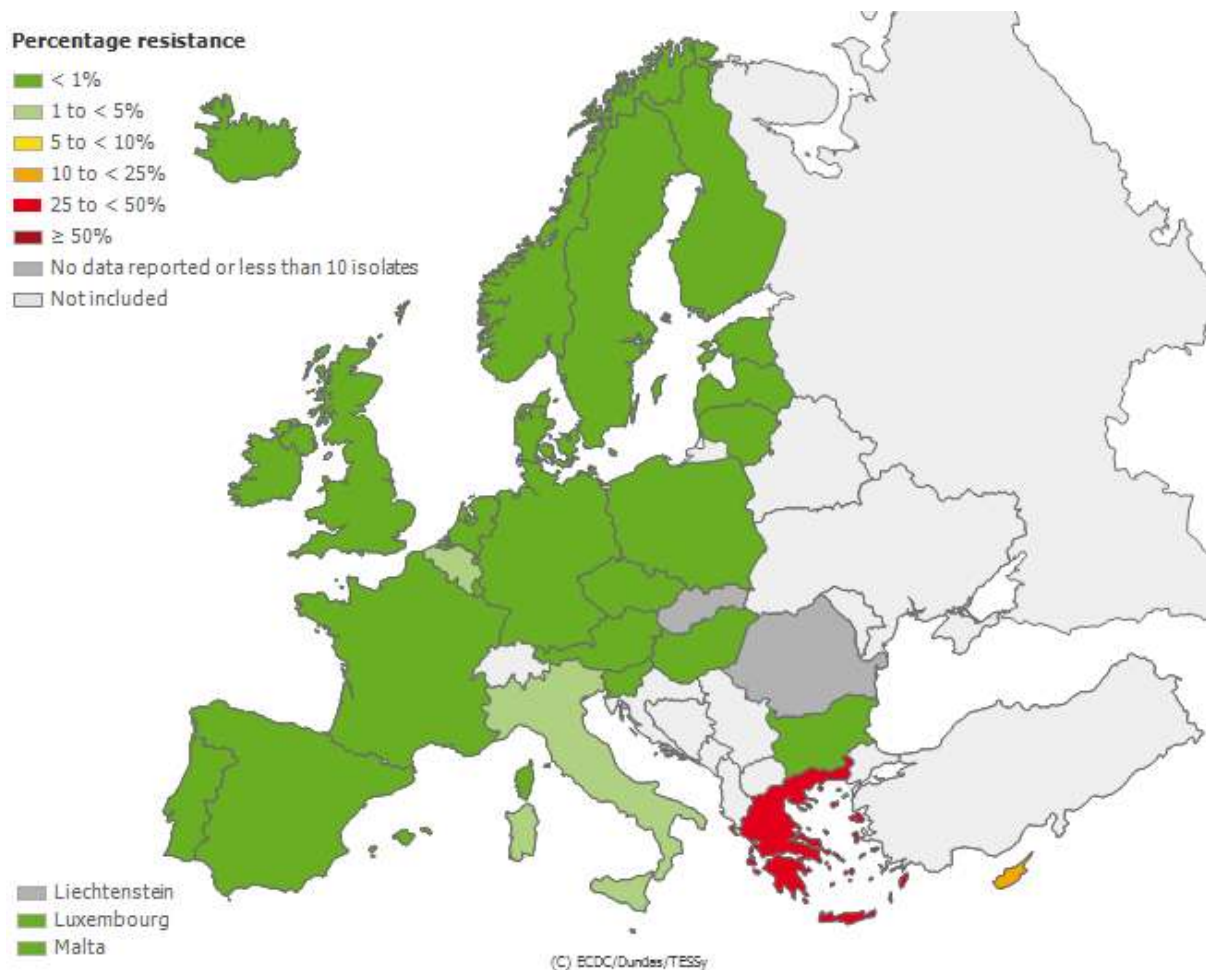
<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3b/Beta-lactam.svg> , cit. 3.4.2015

V naší práci jsme se zaměřili na zkoumání rezistencí enterobakterií ke karbapenemům, které náleží do skupiny tzv. beta-laktamů. Jsou to účinné přípravky, které jsou pro své výhodné vlastnosti, např. baktericidní účinek a minimální toxicitu, velmi často podávány. Mají široké spektrum účinku zahrnující grampozitivní i gramnegativní bakterie. Strukturálním základem všech zástupců je čtyřčlenný beta-laktamový kruh, který podmiňuje antibakteriální účinek. Na podkladě odlišností molekulárních struktur, které jsou navázány na aktivní místo, jsou definovány 4 základní skupiny, a to peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy. V souvislosti s jejich masivním používáním, především penicilinů a cefalosporinů, však došlo k výraznému rozšíření bakteriálních mechanismů,

podmiňujících odolnost k účinku beta-laktamových antibiotik. Nejdůležitějším mechanismem rezistence jsou širokospektré beta-laktamázy typu ESBL a AmpC. Vzhledem k významnému rozšíření produkce těchto enzymů u enterobakterií způsobujících infekce, především u pacientů v intenzivní péči, zvyšuje se spotřeba karbapenemů, které jsou na bakterie produkující uvedené enzymy stále dobře účinné [3-4].

V posledních letech ale stoupá výskyt enterobakterií, které vykazují rezistenci i ke karbapenemům. Účinná terapie pacientů trpících infekcemi, které jsou způsobeny takovými bakteriemi, se pak stává velmi obtížnou až nemožnou.

Obr. 3 Výskyt karbapenem-rezistentních kmenů *Klebsiella pneumoniae* v Evropě



<http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARSNet/database/Pages/database.aspx>, cit. 3.4.2015

Mechanismy odolnosti respektive exprimované znaky, které se podílejí na vzniku odolnosti vůči karbapenemům, mohou být podmíněny třemi základními mechanismy:

- produkci serinových karbapenemáz,
- produkci metalo-beta-laktamáz
- produkci širokospektrých beta laktamáz typu ESBL či AmpC se současnou ztrátou porinů [5].

Ve všech uvedených případech se jedná o enzymy, působky bílkovinné povahy, které svou aktivitou rozkládají beta-laktamový kruh karbapenemů a ty se stávají neúčinnými.

Z výše uvedeného též vyplývá, že jednou z nejvíce ohrožených skupin pacientů z hlediska rizika nákazy infekcí vyvolanou oportunními enterobakteriemi jsou pacienti s oslabenou imunitou, což jsou mimo jiné i pacienti s hematologickými malignitami - nádory krve a kostní dřeně. Imunitní systém takovýchto pacientů je vážně oslaben vlivem útlumu aktivity kostní dřeně a podáváním cytostatik. Tito pacienti jsou velmi náchylní k bakteriálním infekcím endogenního původu, jejichž zdrojem je přirozená mikroflóra pacienta [6].

V naší studii jsme se proto zaměřili na stanovení prevalence nosičství enterobakterií produkujících karbapenemázy, tedy rezistentních ke karbapenemům na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc (HOK).

### **Materiál a metody**

V časovém úseku 1.1.2014 – 31.1.2015 byly rektální výtěry pacientů hospitalizovaných na HOK naočkovány na selektivní chromogenní médium Chrom ID ESBL agar (BioMérieux). Tento agar je *selektivně-diagnostickou půdou*. Selektivní půdou se rozumí, že je určena k výběrovému růstu vybraných patogenů. Její součástí jsou látky, které potlačují růst jiných mikrobů. Diagnostická půda rovněž obsahuje látky, které se mění vlivem metabolismu mikroba. Změna se projeví rozdílnou morfologií, jinou barvou kolonie,

Obr. 4 Příklad E-testu



(zdroj vlastní)

nebo půdy [1]. Selektivně-diagnostická půda, kterou je Chrom ID ESBL agar, pak kombinuje obě tyto vlastnosti a *používá se pro specifickou detekci* námi zkoumaných *enterobakterií*.

Vyrostlé kolonie bakterií byly identifikovány standardními mikrobiologickými postupy za použití MALDI TOF (Bruker) a jejich citlivost k antibiotikům byla stanovena diluční mikrometodou, což je test, který vedle citlivosti, či rezistence bakterie k antibiotiku stanoví i míru této citlivosti pomocí tzv. MIC. MIC je minimální inhibiční koncentrace, neboli nejnižší koncentrace antibiotika, která inhibuje růst testované bakterie [1]. U izolátů s *MIC meropenemu 2 mg/l a vyšší* byla ověřena rezistence k meropenemu dalším z dilučních testů - E-testem.

Následně byly provedeny *fenotypové testy* k detekci serinových karbapenemáz a metalo-beta-laktamáz (MBL). Fenotypové testy vycházejí z difuzních diskových metod používaných pro testování účinku kombinace antibiotik. Antibiotika byla ale zčásti nahrazena i jinými chemikáliemi jako EDTA, či kyselina 3-APB, které potlačují růst enterobakterií rezistentních ke karbapenemům, což se projeví příslušnými zónami projasnění kolem disků a uplatňuje se při *stanovení mechanismu* rezistence.

Obr. 5 MBL-test k fenotypové detekci metalo-beta-laktamáz - pozitivní výsledek



(zdroj vlastní)

Izoláty s pozitivními fenotypovými výsledky byly podrobeny *genetické diagnostice* genů kódujících produkci MBL a serinových karbapenemáz pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). PCR je metoda molekulární genetiky, která je založena zejména na využití vlastností nukleových kyselin a využití různých enzymů [1]. Pomocí pulzní gelové elektroforézy (PFGE) byla ještě stanovena *genetická příbuznost* izolátů, aby se zjistilo, zdali se nejedná o jeden a tentýž izolát přenášený po oddělení personálem, nebo pacienty.

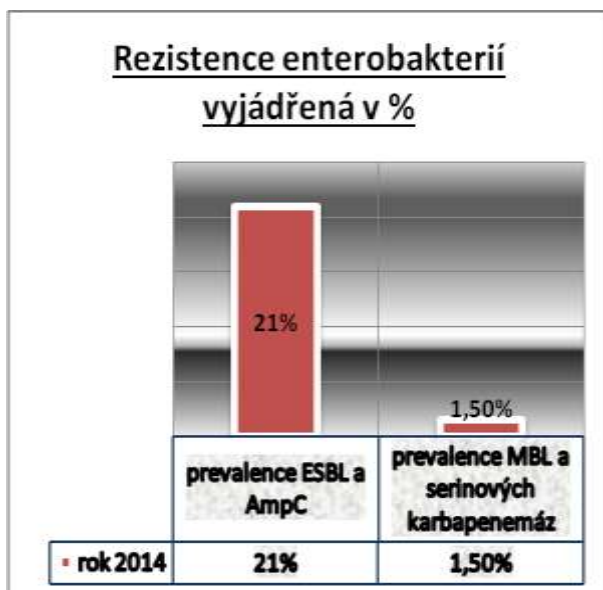
## Výsledky

Do studie bylo zahrnuto 1229 stolic, získaných výtěrem konečníku od 266 pacientů. U pěti pacientů (1,9 %) byly detekovány enterobakterie (čtyři kmeny *Klebsiella pneumoniae* a jeden kmen *Serratia marcescens*) rezistentní k meropenemu. Fenotypovými testy byla potvrzena produkce MBL u čtyř kmenů *Klebsiella pneumoniae* (1,5%). Genotypová diagnostika potvrdila ve všech čtyřech případech přítomnost genu *blaNDM-1*. Pomocí pulzní gelové elektroforézy byla zjištěna jedinečnost zkoumaných izolátů; možný horizontální přenos na oddělení tak nebyl potvrzen.

## Závěr

V naší studii jsme potvrdili gastrointestinální nosičství enterobakterií s produkcí karbapenemáz u hemato-onkologických pacientů.

Graf 1 Rezistence enterobakterií vyjádřená v %



(zdroj vlastní)

Prevalence za rok 2014 činila 1,5 %. V předchozím roce byla stanovena v podobné studii také prevalence enterobakterií s produkcí širokospektrých beta- laktamáz typu ESBL a AmpC v GIT hemato-onkologických pacientů, která se vyšplhala na 21 %. I když je prevalence nosičství enterobakterií produkujících karbapenemázy výrazně nižší, jedná se o nebezpečné fenotypy rezistence, které mohou potenciálně v případě hemato-onkologických pacientů způsobovat těžko léčitelné infekce.

## Seznam použité literatury

### Odborné publikace:

1. KOUKALOVÁ, Dagmar. *Praktická cvičení z lékařské mikrobiologie I*. 2. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009, 94 s. ISBN 978-80-244-2266-4.
2. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005, 351 s. ISBN 80-86850-00-5.
3. BUSH, K, JACOBY, GA. *An updated functional classification of  $\beta$ -lactamases*. *Antimicrob, Agents Chemother* 2010; 54:969-976.
4. JACOBY, GA, BUSH, K. *Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant  $\beta$ -lactamases*. 2009; dostupné na: <[http:// www.lahey.org/Studies/](http://www.lahey.org/Studies/)> [cited 2013 Jan 9].
5. NORDMAN, P a kol. *The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase producing bacteria*. *Lancet Infect Dis*. 2009; 9:228–36
6. KOLAR, M a kol. *Incidence of fecal enterobacteriaceae producing broad-spectrum beta-lactamases in patients with hematological malignancies*. 2015; dostupné na: < <http://biomed.papers.upol.cz> > [cited 2015 April 3]