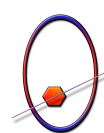




**Národní referenční  
laboratoř pro antibiotika**  
Státní zdravotní ústav  
Šrobárova 48  
100 42 Praha 10

**Ústav mikrobiologie**  
Lékařská fakulta v Plzni  
Univerzita Karlova v Praze  
Alej Svobody 80  
304 60 Plzeň



**Pracovní skupina pro monitorování rezistence (PSMR)  
při NRL pro antibiotika**

## **Výskyt multirezistentních gramnegativních bakterií v českých nemocnicích – upozornění na problém šíření bakterií produkujících transferabilní karbapenemázy**

Jaroslav Hrabák, Helena Žemličková

V současnosti dochází v mnoha zemích k významnému šíření multirezistentních gramnegativních bakterií, především druhů *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* a příslušníků čeledi *Enterobacteriaceae*. Nejčastějším a z epidemiologického hlediska nejvýznamnějším typem rezistence je produkce karbapenemáz, které hydrolyzují většinu  $\beta$ -laktamových antibiotik, včetně karbapenemů. Mezi nejvíce rozšířené typy patří enzymy KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) u enterobakterií a metalo- $\beta$ -laktamázy (např. VIM, NDM) u enterobakterií a pseudomonád. **Léčba infekcí způsobených těmito bakteriálními izoláty je výrazně omezena, nejsou výjimkou ani kmeny rezistentní ke všem dostupným antibiotikům. V České republice již byly takovéto bakteriální izoláty zaznamenány.** Z těchto důvodů je nezbytně nutné se k takovým kmenům chovat stejně jako k jiným multirezistentním mikrobům, jako například kmenům *Staphylococcus aureus* rezistentním k oxacilinu (MRSA). Dle zkušeností z okolních států, kde byla tato opatření implementována záhy po objevení prvních izolátů produkujících transferabilní karbapenemázy, lze dosáhnout významného snížení prevalence těchto multirezistentních mikrobů a významně snížit riziko přenosu mezi jednotlivými nemocničními zařízeními. **Rozšíření kmenů produkujících karbapenemázy významně komplikuje léčbu a výrazně zvyšuje náklady na zdravotní péči.**

**Inspirováno belgickým doporučením:** Glupczynski Y., Piérard D., Catry B., Gérard M., Simon A., Jans B. Escherichia coli multi-résistant, producteur d'une carbapénémase de type New Delhi Métallo-Beta-Lactamase (NDM-1): un premier cas importé dans un hôpital aigu en Belgique. RAPPEL DES CONSIGNES DE PRISE EN CHARGE DE PATIENTS TRANSFERES D'UN HOPITAL SITUE DANS UN PAYS A HAUTE ENDEMICITE DE BACTERIES PRODUCTRICES DE CARBAPENEMASES. Belgique, 2011.

## ÚVOD

Epidemiologicky nejzávažnější rezistence ke karbapenemům u enterobakterií, pseudomonád a acinetobakterů je způsobena karbapenemázami, enzymy schopnými účinně hydrolyzovat většinu  $\beta$ -laktamů včetně karbapenemů, jejichž geny jsou kódovány na mobilních genetických elementech (plazmidy, transpozony) schopnými horizontálního přenosu mezi bakteriemi. Na těchto mobilních genetických elementech jsou obvykle nesené další geny zodpovědné za rezistenci k ostatním skupinám antibiotik (např. geny pro aminoglykosidové acetyltransferázy, geny zodpovědné za rezistenci k chinolonům, atp.). **Léčba infekcí způsobených takovými bakteriálními izoláty je významně omezena (účinný zůstává obvykle pouze kolistin), avšak nejsou výjimkou ani izoláty rezistentní ke všem dostupným antibiotikům.**

Karbapenemázy jsou členěny, stejně jako ostatní  $\beta$ -laktamázy, dle klasifikace navržené K. Bush a spolupracovníky, případně dle Amblera. V těchto klasifikačních systémech, jež se vzájemně překrývají, jsou nalézány ve třech skupinách (viz Tabulka I.).

**Tabulka I.** Klinicky významné transferabilní karbapenemázy

Skupina dle klasifikace podle Bush/Amblera, označení	Označení karbapenemáz	Bakteriální druhy u nichž byly tyto enzymy nalezeny
Skupina 2f / 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 3 / B, metalo- $\beta$ -laktamázy	VIM, IMP, GIM, SIM, NDM, SPM, AIM, KMH, DIM, TMB	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>
Skupina 2d / D OXA	OXA-48  Skupiny OXA-23, -58, -40	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> ; <i>Acinetobacter baumannii</i>

### Karbapenemázy (KPC)

Enzymy KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) byly poprvé nalezeny v USA v roce 1996. Jejich substrátová specifita zahrnuje všechny  $\beta$ -laktamy (peniciliny, cefalosporiny všech generací, aztreonam a karbapenemy). Jsou slabě inhibovány kyselinou klavulanovou. Tato vlastnost je však v klinické praxi nepoužitelná. Kmeny enterobakterií produkující KPC mají široký rozptyl MIC karbapenemů (od 0,5 do > 32 mg/l) a často se

vyskytuje heterorezistence, kterou je možno pozorovat jako rezistentní subpopulaci vytvářející kolonie uvnitř inhibiční zóny kolem disků s karbapenemy.

Epidemiologie producentů KPC vykazuje určitá specifika. V současnosti (září 2011) je popsáno 10 různých variant enzymů KPC (<http://www.lahey.org/studies>). Geny *bla*<sub>KPC</sub> jsou většinou lokalizovány na transpozonu Tn4401. Celosvětově dochází ke klonálnímu šíření klonu *K. pneumoniae* ST258 a jeho jednolokusových variant, který náleží k epidemicky úspěšnému klonálnímu komplexu CC11. Epidemická úspěšnost tohoto klonu nebyla dosud vysvětlena. Rovněž plazmidový profil tohoto klonu je typický, s plazmidy velikosti cca 40, 110 a 200 kbp. Rezervoár kmenů produkujících KPC je pravděpodobně v Řecku, USA a Izraeli. Z těchto oblastí se producenti KPC šíří do ostatních zemí, především důsledkem cestování. V České republice byl první izolát *K. pneumoniae* produkující KPC nalezen na podzim roku 2009 v severomoravské nemocnici. Izolát rovněž náležel k mezinárodnímu klonu ST258 s typickým plazmidovým profilem.

### **Metallo- $\beta$ -laktamázy (MBL)**

První transferabilní MBL byla detekována u *P. aeruginosa* v Japonsku v roce 1990. I když výskyt získaných MBL je nejčastější u pseudomonád a acinetobakterů jejich záchyt u enterobakterií je stále významnější.

Nejčastější MBL nalézanou u enterobakterií a pseudomonád je typ VIM. Genová kazeta kódující tento enzym je obvykle součástí integronu třídy 1 spolu s dalšími determinanty rezistence.

Během posledních dvou let došlo k rozšíření další karbapenemázy ze skupiny MBL – enzymu označeného jako NDM-1 (**N**ew **D**elhi metallo- $\beta$ -lactamase). V současnosti jsou popsány 2 varianty (NDM-1 a NDM-2), avšak v blízké budoucnosti lze očekávat popis dalších dvou typů (<http://www.lahey.org/studies>).

Poprvé byl enzym NDM-1 popsán u kmene *K. pneumoniae* izolovaného od 59letého pacienta pocházejícího z Indie, trvale žijícího ve Švédsku. Při cestě do Indie v roce 2007 se podrobil operačnímu zákroku v nemocnici v Novém Dillí. Po návratu byl přijat do švédské nemocnice, kde byla identifikována neznámá metallo- $\beta$ -laktamáza nejprve u izolátů *K. pneumoniae*, následně u izolátu *E. coli*. Následně došlo ve Velké Británii k významnému rozšíření producentů enzymu NDM-1 a ten se zde stal v roce 2009 dominantní karbapenemázou u enterobakterií.

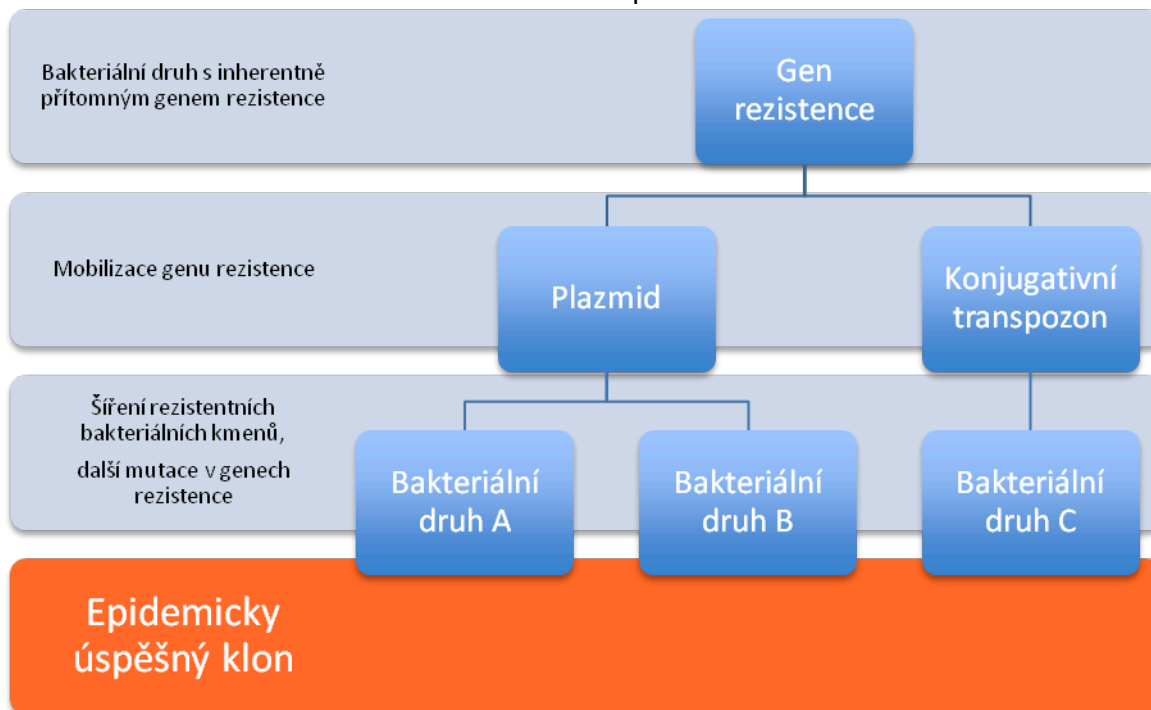
Popsané genetické uspořádání genu *bla*<sub>NDM-1</sub> je unikátní. Na rozdíl od ostatních skupin metallo- $\beta$ -laktamáz, které bývají kódovány jako genové kazety integronů, je gen *bla*<sub>NDM-1</sub> často součástí plazmidů replikonového typu A/C, které mohou nést i geny širokospektrých  $\beta$ -laktamáz (ESBL).

Enzym NDM-1 je nalézán především u *K. pneumoniae* a *E. coli*, dále u *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Providencia* spp. a *Proteus* spp. U *K. pneumoniae* byl nalezen u epidemiologicky úspěšného mezinárodně rozšířeného klonu ST14. Šíření však není dominantně klonální, ale dochází i k významnému horizontálnímu šíření (konjugativním přenosem plazmidů).

## EPIDEMIOLOGIE KARBAPENEMÁZ

Jak již bylo zmíněno výše, jsou geny kódující karbapenemázy obvykle součástí větších genetických elementů, kódujících rezistenci k ostatním skupinám antibiotik (aminoglykosidy, fluorochinolony, sulfonamidy, atp.). Podávání kteréhokoliv antibiotika z těchto skupin vede k selekci rezistence k ostatním antibiotikům. Rezistence se zároveň mezidruhově šíří horizontálním přenosem genů (viz obrázek 1). Zároveň dochází k šíření epidemicky úspěšných klonů (např. *K. pneumoniae* ST258 produkující KPC, *A. baumannii*).

**Obrázek 1.** Vznik a šíření rezistentních bakterií v prostředí.



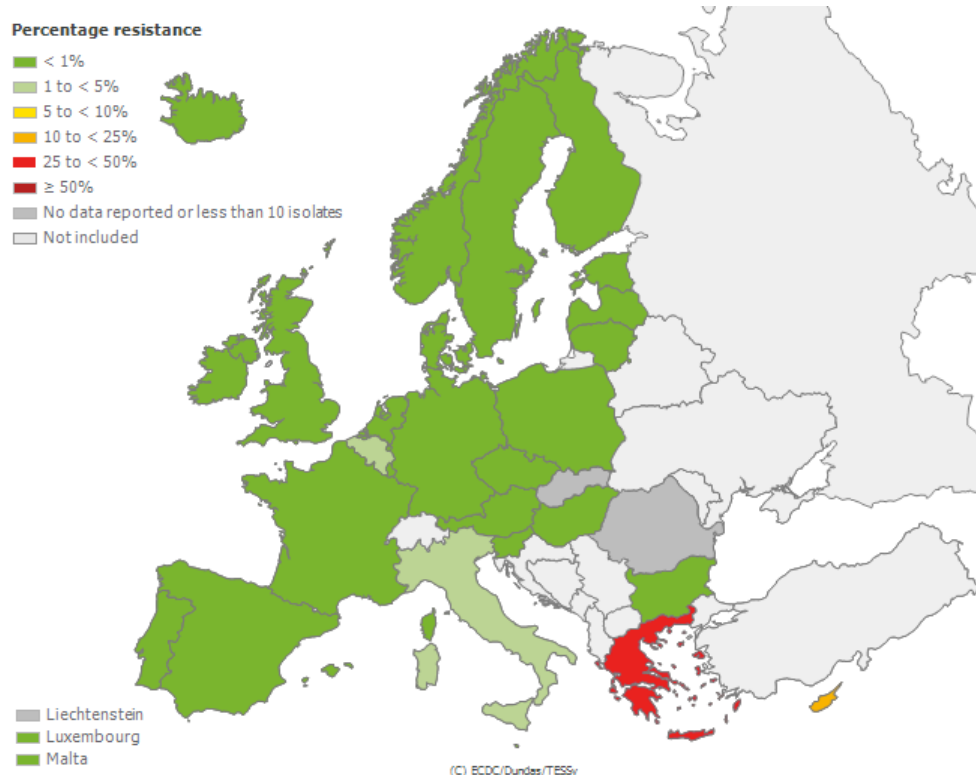
Závažným problémem v šíření rezistence je mezinárodní cestování. Při hospitalizaci pacienta, který byl dříve ošetřen v některé z rizikových zemí (tabulka II, obrázky 2,3) je nutné dbát zvýšené opatrnosti a provést důkladný mikrobiologický skríníng pro zachycení multirezistentního bakteriálního kmene. **Rizikovým faktorem kolonizace/infekce multirezistentním kmenem, vzhledem ke stále se měnící**

epidemiologické situaci, je předchozí nedávná hospitalizace (cca 1 rok) v nemocničním zařízení kteréhokoliv cizího státu.

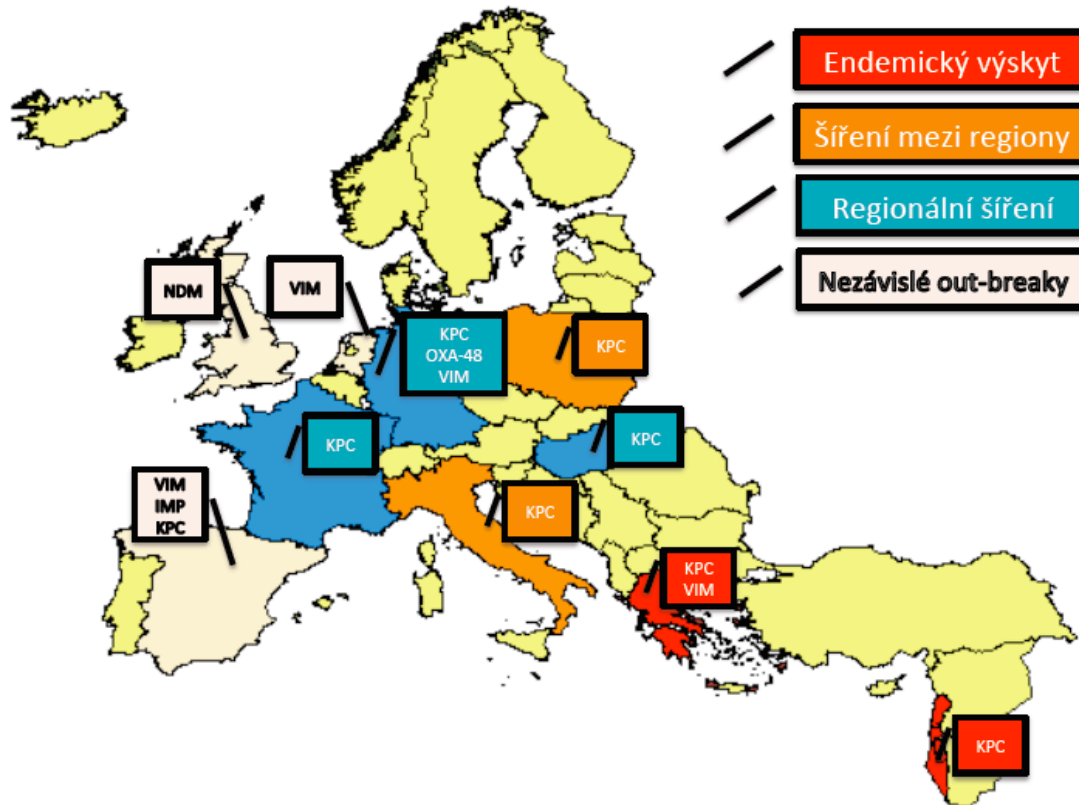
**Tabulka II.** Země s vysokým stupněm rezistence ke karbapenemům u enterobakterií.

Země	Rozšířený typ karbapenemázy
Pákistán, Indie	NDM
Velká Británie	NDM
Řecko	VIM, KPC
Turecko	OXA-48
Izrael	KPC
USA (především východní pobřeží)	KPC

**Obrázek 2.** Výskyt rezistentních bakteriálních izolátů v Evropě je značně heterogenní. Data ukazují výskyt rezistence ke karbapenemům u invazivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* v roce 2009. Databáze EARS-Net.



**Obrázek 3.** Rozšíření jednotlivých typů karbapenemáz v Evropě (podle H. Grundmanna *et al.*)



### VÝSKYT KARBAPENEMÁZ V ČESKÉ REPUBLICE

První získaná karbapenemáza byla v České republice zaznamenána u izolátu *P. aeruginosa* (IMP-7) v roce 2008. Identický bakteriální kmen byl nalezen i v polské Wroclawi, což podporuje význam cestování při šíření rezistence k antibiotikům. Vzápětí došlo k rozšíření dalšího typu metalo- $\beta$ -laktamázy u pseudomonád (VIM-2). Do současné doby bylo identifikováno > 50 izolátů *P. aeruginosa* produkujících MBL. Situaci ve dvou nemocnicích (Praha, Jihomoravský kraj) lze označit za endemickou.

U enterobakterií je výskyt karbapenemáz v ČR dosud sporadický. Byly zachyceny dva izoláty *Serratia marcescens* produkujících MBL typu VIM-1, dva izoláty *Enterobacter cloacae* produkujících rovněž MBL typu VIM. Dosud byly zachyceny dva případy importu KPC. Jednalo se o izoláty *K. pneumoniae* produkujících KPC-2, respektive KPC-3, izolované od pacientů dříve hospitalizovaných v Řecku (KPC-2) a v Itálii (KPC-3). Kmen produkujících enzym KPC-3 byl původcem nemocničního outbreaku na oddělení, kde byl původně pacient hospitalizován.

V létě 2011 byl v České republice zachycen první případ výskytu NDM-1. Gen *bla*<sub>NDM-1</sub> byl lokalizován na chromozomu kmene *A. baumannii* náležejícího k mezinárodnímu klonu I. Kmen byl izolován od pacienta repatriovaného z egyptské Hurghady. Jednalo se pravděpodobně o shodný kmen, jaký byl nalezen v Německu u pacienta rovněž repatriovaného z Egypta v roce 2007.

## **NÁVRH SLEDOVÁNÍ VÝSKYTU KARBAPENEMÁZ V ČR**

Vzhledem k závažnosti problému výskytu karbapenemáz u enterobakterií a pseudomonád navrhujeme zavedení aktivního sledování výskytu transferabilních karbapenemáz. Celorepubliková data budou čtvrtletně zpracována a zpětně distribuována prostřednictvím webových stránek Národní referenční laboratoře pro antibiotika Státního zdravotního ústavu a Ústavu mikrobiologie LF UK, Plzeň (<http://szu.cz-narodni-refencni-laborator-pro-antibiotika>; <http://www.betalaktamazy.cz>) a zveřejněna v měsíčním bulletinu Zprávy CEM.

Postup při vyhledávání kmenů produkujících karbapenemázu je znázorněn na obrázku 4, formulář pro confirmaci produkce karbapenemázy je uveden v příloze č. 1. Zvýšenou pozornost je třeba věnovat pacientům, kteří byli hospitalizováni v cizině.

Při stanovení citlivosti k antibiotikům lze doporučit zařazení ertapenemu jako indikátorového antibiotika, případně je nezbytné testovat další karbapenemy (meropenem, imipenem). Pokud je izolát necitlivý (dle hraničních hodnot EUCAST) alespoň k jednomu z testovaných karbapenemů, jedná se o izolát podezřelý z produkce karbapenemázy. Izolát čeledi *Enterobacteriaceae* by měl být neprodleně odeslán do NRL pro antibiotika nebo na Ústav mikrobiologie LF UK v Plzni k fenotypové a genotypové confirmaci produkce karbapenemázy. Laboratoř může provádět fenotypové ověření produkce enzymu paralelně dle popsané metodiky. U izolátů *P. aeruginosa* a *A. baumannii* obvykle nečiní fenotypový průkaz MBL obtíž. Při pozitivním záchytu MBL producenta doporučujeme kmen odeslat ke confirmaci mechanismu rezistence na výše uvedená pracoviště. Informace o potvrzení produkce karbapenemázy bude laboratoři sdělena v nejkratším možném termínu.

## **OPATŘENÍ PROVÁDĚNÁ V SOUVISLOSTI S VÝSKYTEM GRAMNEGATIVNÍCH BAKTERIÍ PRODUKUJÍCÍCH KARBAPENEMÁZY (příloha č. 2)**

Při výskytu karbapenemáz doporučujeme vycházet z polského postupu při výskytu KPC, vypracovaného prof. Walerií Hryniewicz, přeloženého a publikovaného ve Zprávách epidemiologie a mikrobiologie se svolením autorky (viz příloha č. 1). Aplikací tohoto postupu se v Polsku podařilo zamezit šíření karbapenemáz KPC mezi jednotlivými nemocnicemi a snížit prevalenci enterobakterií produkujících KPC na minimum.

## DIAGNOSTIKA KARBAPENEMÁZ (příloha č. 3)

Aplikací nových EUCAST/CLSI hraničních hodnot pro interpretaci výsledků vyšetření citlivosti karbapenemů by měli být zachyceni všichni producenti klinicky významných karbapenemáz. Jako indikátorové antibiotikum se nejlépe osvědčil ertapenem (informace o citlivosti by neměla být rutinně uváděna do výsledku). Případně je nutné testovat další karbapenemy – meropenem, imipenem. Pokud je kmen rezistentní k alespoň jednomu z těchto antibiotik, musí být provedeno ověření mechanismu rezistence, produkce MBL a KPC.

### Metalo- $\beta$ -laktamázy MBL

Fenotypový průkaz MBL je prováděn na základě synergie chelátorů kovových iontů (např. EDTA, dipikolinová kyselina) a imipenemu, meropenemu a ceftazidimu.

### Karbapenemázy KPC

Fenotypový průkaz KPC je založen na schopnosti některých látek inhibovat tyto enzymy. Jedná se především o kyselinu fenylboritou a její deriváty. Tato látka ovšem inhibuje také  $\beta$ -laktamázy typu AmpC a kmeny produkující tyto enzymy jsou při použití testu s kyselinou fenylboritou hodnoceny jako falešně pozitivní. V roce 2010 popsal Ch. Giske a kol. test, který by měl zabránit falešně pozitivnímu hodnocení takových izolátů zařazením disku s kloxacilinem. Avšak v České republice ani Giskeho modifikace neumožňuje odlišit tyto falešně pozitivní výsledky, neboť v našich podmínkách je většina kmenů *K. pneumoniae* rezistentní ke karbapenemům v důsledku strukturálních změn buněčné stěny se současnou produkcí enzymů typu AmpC (DHA-1) a OXA-1 hydrolyzující kloxacilin. Jedinou spolehlivou metodou pro confirmaci KPC je dosud pouze molekulárně-genetická detekce genu *bla<sub>KPC</sub>*. Další možností je detekce hydrolýzy některého z karbapenemů (viz níže).

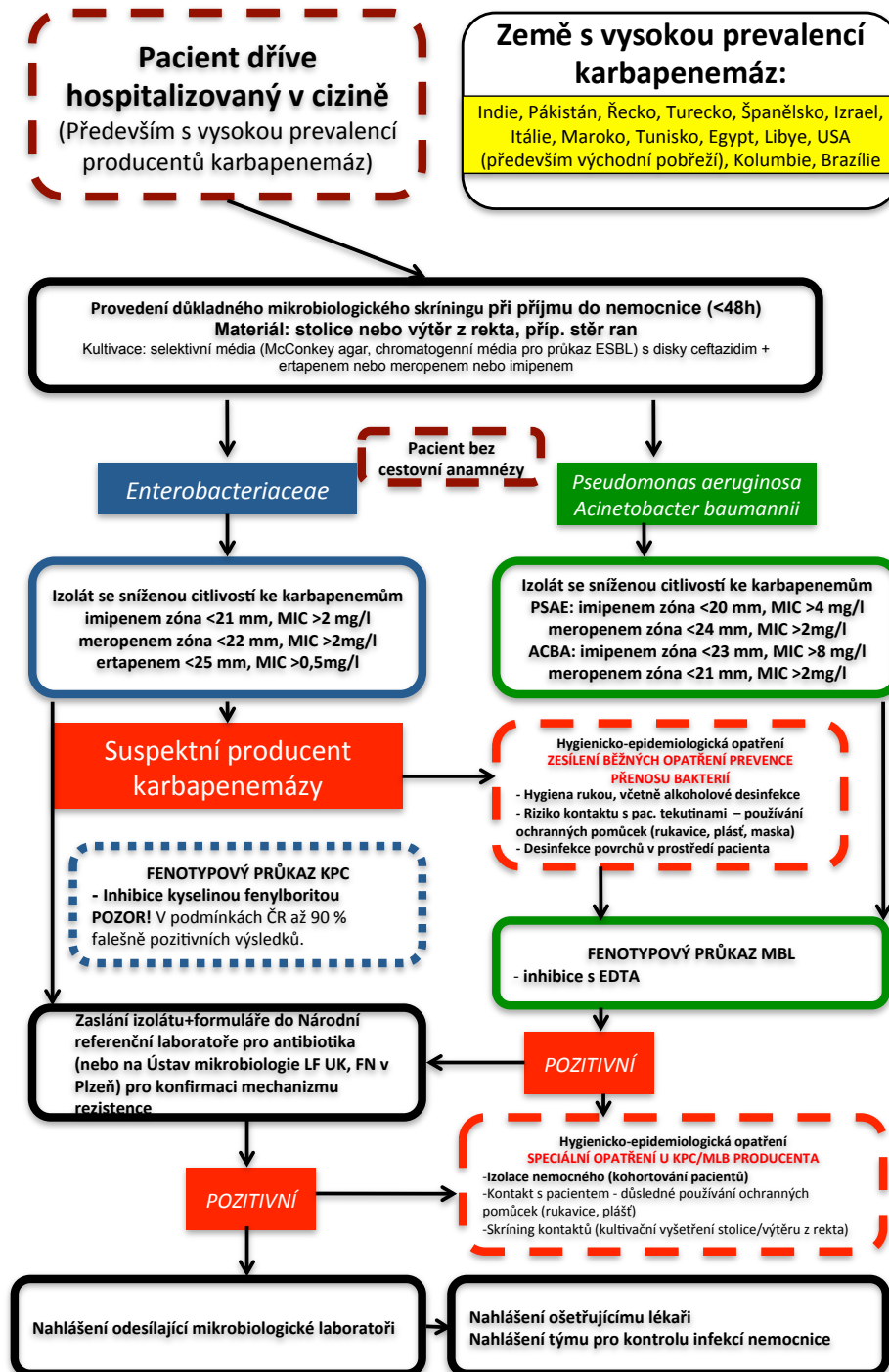
### MALDI-TOF MS detekce karbapenemáz

Jedná se o univerzální metodu pro průkaz karbapenemáz na základě jejich biologické aktivity – hydrolýzy meropenemu. Metoda byla vyvinuta a validována pracovníky Ústavu mikrobiologie LF UK a FN v Plzni. Popis metody lze nalézt v publikaci:

*Hrabák J, Walková R, Študentová V, Chudáčková E, Bergerová T. Carbapenemase Activity Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry. Journal of Clinical Microbiology 49, 2011: 3222 - 3227; DOI 10.1128/JCM.00984-11*



**Obrázek 4.** Postup pro zachycení bakteriálních izolátů produkujících karbapenemázy.



## KONTAKTNÍ PRACOVISŤE

### **Národní referenční laboratoř pro antibiotika**

Šrobárova 48  
100 42 Praha 10

**Kontaktní osoba:** **MUDr. Helena Žemličková, Ph.D.** (vedoucí NRL pro ATB)  
Tel.: 267 08 22 02  
E-mail: [hzemlickova@szu.cz](mailto:hzemlickova@szu.cz)

### **Ústav mikrobiologie**

Lékařská fakulta v Plzni  
Univerzita Karlova v Praze  
Alej Svobody 80  
304 60 Plzeň

**Kontaktní osoba:** **Jaroslav Hrabák, Ph.D.**  
Tel.: 377 10 32 65  
E-mail: [Jaroslav.Hrabak@lfp.cuni.cz](mailto:Jaroslav.Hrabak@lfp.cuni.cz)

## LITERATURA

Glupczynski Y., Piérard D., Catry B., et al. *Escherichia coli* multi-résistant, producteur d'une carbapénémase de type New Delhi Métallo-Beta-Lactamase (NDM-1): un premier cas importé dans un hôpital aigu en Belgique. RAPPEL DES CONSIGNES DE PRISE EN CHARGE DE PATIENTS TRANSFERES D'UN HOPITAL SITUE DANS UN PAYS A HAUTE ENDEMICITE DE BACTERIES PRODUCTRICES DE CARBAPENEMASES. Belgique, 2011.

Grundmann H., Livermore D.M., Giske C.G., et al.: Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. Euro Surveillace 2010, 15(46): pii=19711.

Hrabák J., Bergerová T., Žemličková H., Urbášková P.: Detekce širokospektrých  $\beta$ -laktamáz (ESBL),  $\beta$ -laktamáz AmpC, metalo- $\beta$ -laktamáz (MBL) a karbapenemáz KPC u gramnegativních tyčiek. Zprávy CEM 18 (3), 2009: 100 – 106.

Hrabák J., Červená D., Izdebski R., et al. Regional spread of *Pseudomonas aeruginosa* ST357 producing the IMP-7 metallo- $\beta$ -lactamase in the Central Europe, Journal of Clinical Microbiology, 49, 2011: 474-475.

Hrabák J.: Nová získaná metalo- $\beta$ -laktamáza NDM-1, Zprávy epidemiologie a mikrobiologie 19, 2010, 184-186.

Hrabák J., Niemczyková J., Chudackova E., 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 2011; DOI: 10.1007/s12223-011-0057-6

Hrabák J., Žemličková H., Bergerová T., Urbášková P.: Interpretace výsledků vyšetření citlivosti enterobakterií u producentů širokospektrých  $\beta$ -laktamáz,  $\beta$ -laktamáz AmpC a karbapenemáz, Zprávy epidemiologie a mikrobiologie 19, 2010, 194-196.

Hrabák J., Urbášková P., Bergerová T., Žemličková H.: Komentář k polskému doporučení postupu při výskytu kmenů *Enterobacteriaceae* produkujících karbapenemázy typu KPC ve zdravotnických zařízeních, Zprávy epidemiologie a mikrobiologie 19, 2010, 196-198.

Hrabák J., Běbrová E., Nyč O., Fridrichová et al.: Záchyt kmene *Serratia marcescens* současně produkujícího metalo- $\beta$ -laktamázu (MBL), širokospektrou  $\beta$ -laktamázu (ESBL) a dvě  $\beta$ -laktamázy typu AmpC ve FN Motol. Zprávy epidemiologie a mikrobiologie 18 (4), 2009: 139 – 141.

Hrabák J., Fridrichová M., Štolbová M., et al: First identification of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. Euro Surveillace 14, 2009: 19102.

Hrabák J., Chudáčková E.: Rezistence enterobakterií ke karbapenemům. Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie 57, 2008: 125 – 136.

Hryniewicz W. Doporučení týkající se postupu při výskytu kmenů *Enterobacteriaceae* produkujících karbapenemázy typu KPC ve zdravotnických zařízeních Polska. Zprávy epidemiologie a mikrobiologie 19, 2010, 198 – 200.

Struelens M.J., Monnet D.L., Magiorakos A.P., et al: New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing *Enterobacteriaceae*: emergence and response in Europe. Euro Surveillace 2010, 15(46): pii=19716.

**Příloha č. 1.** Formulář pro confirmaci produkce karbapenemázy – průvodní list vzorku.



**Národní referenční  
laboratoř pro antibiotika**  
Státní zdravotní ústav  
Šrobárova 48  
100 42 Praha 10

**Ústav mikrobiologie**  
Lékařská fakulta v Plzni  
Univerzita Karlova v Praze  
Alej Svobody 80  
304 60 Plzeň



**Pracovní skupina pro monitorování rezistence (PSMR)  
při NRL pro antibiotika**

**Konfirmace suspektního producenta karbapenemázy**

**Cílová laboratoř:**

*Výběr laboratoře*

MUDr. Helena Žemličková, PhD.  
Národní referenční laboratoř pro antibiotika  
Státní zdravotní ústav  
Šrobárova 48  
100 42 Praha 10  
hzemlickova@szu.cz

Jaroslav Hrabák, PhD.  
Ústav mikrobiologie  
Lékařská fakulta a Fakultní  
nemocnice v Plzni  
Alej Svobody 80  
323 00 Plzeň  
Jaroslav.Hrabak@lfp.cuni.cz

**Identifikační údaje vzorku**

Jméno a příjmení pacienta:

Rodné číslo:

Pohlaví:

Materiál:

Diagnóza:

Oddělení:

Datum odběru primárního vzorku:

Pacient s předchozí hospitalizací: *Ano/Ne/neznámo*

Pokud **ano**, uveďte, prosím, stručnou charakteristiku:

Zadávající laboratoř:

Bakteriální druh:

Hodnoty citlivosti ke karbapenemům:

	Imipenem	Meropenem	Ertapenem
MIC [mg/l]			
IZ [mm]			

Fenotypově prokázaná produkce karbapenemázy: *MBL/KPC/ostatní/není známo*

Pokud **ano**, uveďte prosím použitou metodu průkazu:

**Příloha č. 2.** Doporučení týkající se postupu při výskytu kmenů *Enterobacteriaceae* produkujících karbapenemázy typu KPC\* ve zdravotnických zařízeních Polska

---

**Doporučení týkající se postupu při výskytu kmenů *Enterobacteriaceae* produkujících karbapenemázy typu KPC\* ve zdravotnických zařízeních Polska**

*Recommendations on the steps to be taken in case of the emergence of KPC\* carbapenemase-producing strains of Enterobacteriaceae in healthcare settings in Poland*

---

**Waleria Hryniewicz**

Doporučení vypracované Prof. dr hab. n. med. Walerią Hryniewicz z polského Národního ústavu léků – národní konzultantkou v oblasti lékařské mikrobiologie, v rámci zdravotního programu financovaného z prostředků Ministra zdravotnictví – „Národní program ochrany antibiotik“.

Jedná se o opatření doporučené ministrem zdravotnictví Polska. Warszawa, 2010

Ve Zprávách EM publikováno se svolením autorky.

Přeložili:

Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D., Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice v Plzni  
RNDr. Pavla Urbášková, CSc., Národní referenční laboratoř pro antibiotika, Státní zdravotní ústav v Praze

V souvislosti s výskytem kmenů *Enterobacteriaceae*, zejména izolátů druhu *Klebsiella pneumoniae* v Polsku, produkujících β-laktamázy KPC, neboli enzymy štěpící karbapenemy a ostatní β-laktamová antibiotika a současně rezistentní na většinu antibakteriálních léků jiných skupin, nařizuje se zahájit okamžitá opatření zabráňující

---

\* KPC – anglická zkratka: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

jejich šíření. Produkce KPC představuje nejnebezpečnější z doposud popsáných mechanismů rezistence gramnegativních tyčků a dosavadní pozorování ukazují, že některé kmeny *K. pneumoniae* produkující KPC, vyskytující se také v Polsku, mají zvýšený epidemiologický potenciál. Antibiotika s prokázanou klinickou účinností proti některým kmenům produkujícím KPC chybí.

V souladu s výše popsány mi skutečnostmi se doporučují následující opatření:

1. Mikrobiologické laboratoře provádějící vyšetření pro zdravotnická zařízení jsou povinny vyšetřovat citlivost gramnegativních tyčků na karbapenemy, včetně metodik pro průkaz KPC u enterobakterií v souladu s doporučením referenčního centra ([www.korid.edu.pl](http://www.korid.edu.pl)).
2. Při podezření na izolaci kmene *Enterobacteriaceae* produkujícího KPC je nezbytné neprodleně informovat tým pro kontrolu nozokomiálních infekcí o existujícím podezření a zajistit izolaci pacienta do vyloučení přítomnosti tohoto mechanismu rezistence a zároveň zaslat kmen do referenčního centra pro ověření.
3. V případě potvrzení produkce KPC se doporučuje:
  - 1) bezodkladná izolace nemocného infikovaného/kolonizovaného producentem KPC;
  - 2) bezodkladný skríníng (kultivační vyšetření výtěru z rektu) pacientů hospitalizovaných na stejném oddělení jako pacient s producentem KPC, resp. těch, kteří jsou ošetřováni týmem personálem; ve skríníngu je nutné pokračovat u hospitalizovaných osob v kontaktním týdenním intervalu; kultivační vyšetření se doporučuje doplnit provedením PCR průkazu KPC přímo z odebraného materiálu;
  - 3) v následujících šesti měsících se na oddělení, kde byl pacient hospitalizován, provést šetření pro časný záchyt KPC;
  - 4) dále provést epidemiologická šetření pro zjištění původu producenta KPC u infikovaného/kolonizovaného pacienta a možný přenos z jiného zdravotnického zařízení;
  - 5) neprodleně nahlásit výskyt producenta KPC okresnímu inspektorovi ochrany veřejného zdraví na příslušných formulářích pro povinně hlášené původce bakteriálních infekcí.
4. Izolace pacienta s producentem KPC zahrnuje:
  - 1) umístění pacienta na izolačním pokoji se sanitární smyčkou;
  - 2) použití jednorázových rukavic a pláště před vstupem na izolační pokoj;
  - 3) odložení ochranných pomůcek před opuštěním pokoje;
  - 4) bezvýhradné dodržování hygieny rukou s použitím alkoholové desinfekce po odložení ochranných prostředků;
  - 5) vyhrazení lékařských nástrojů (např. stetoskop, teploměr, manžety pro měření krevního tlaku, atp.) a jejich bezodkladná dekontaminace před použitím u jiných pacientů;
5. Při kultivační negativitě KPC u ostatních pacientů na oddělení, na němž byl prokázán producent KPC, případně u pacientů ošetřovaných stejným personálem jako pacient infikovaný/kolonizovaný KPC se doporučuje dodržovat následující zásady:
  - 1) vyšetřit pacienty s vysokým rizikem kolonizace/infekce producentem KPC, tj. pacientů dlouhodobě hospitalizovaných (>7 dní), dlouhodobě léčených antibiotiky, závažně nemocných;
  - 2) u těchto pacientů se doporučuje skríníngová kultura po dobu následujících dvou měsíců.
6. Při potvrzení producenta KPC u dalších pacientů se pro potlačení zdroje infekce doporučuje postup spočívající na:
  - 1) rychlé identifikaci nosičů mezi pacienty: doporučuje se skríníng u všech pacientů hospitalizovaných na daném oddělení nebo ošetřovaných stejným personálem; kultura se provádí jednou týdně tak dlouho, dokud není potvrzena negativita po dobu dvou měsíců;
  - 2) prověření postupů, které zabraňují přenosu původců nozokomiálních infekcí;
  - 3) důsledné izolaci pacientů s producenty KPC (izolační pokoj, kohorty);
  - 4) prověření způsobů používání antibiotik, především fluorochinolonů a karbapenemů;
  - 5) vyčlenění ošetrovatelského personálu pro pacienty s kmeny produkujícími KPC;
  - 6) při vyšším počtu pacientů s producenty KPC na daném oddělení zvážit soustředění těchto pacientů (na daném oddělení).
7. Tým pro kontrolu nozokomiálních infekcí provádí průběžné monitorování a stálou kontrolu zásad dodržování izolace a dalších postupů zabraňujících šíření kmenů produkujících KPC.
8. Při přeložení pacienta s producentem KPC do jiné nemocnice se do propouštěcí zprávy uvede informace o infekci/kolonizaci kmenem produkujícím KPC.
9. Na pacienta propuštěného do domácího ošetření se nevztahují žádná zvláštní opatření ani při ambulantní péči, avšak při případném dalším přijetí do nemocničního zařízení předloží pacient záznam ve své zdravotnické dokumentaci.
10. Při dalším přijetí pacienta dříve kolonizovaného/infikovaného producentem KPC do zdravotnického zařízení je nutné provést kultivační vyšetření dvou po sobě jdoucích výtěrů z rektu v jednodenním intervalu; je doporučena izolace pacienta do doby obdržení výsledků vyšetření. Pokud jsou výsledky prvních vyšetření negativní, opakují se výtěry v týdenních intervalech během celé doby hospitalizace.
11. V období prvního měsíce od první izolace kmene KPC zasílá vedoucí pracovník zdravotnického zaří-

zení hlášení o postupu pro zamezení šíření inspekto-rátu ochrany veřejného zdraví. Při výskytu KPC u dalších pacientů se zasílá vstupní hlášení o pode-zření na epidemiologické ohnisko a také hlášení o postupu vedoucím k zamezení šíření v týdenním intervalu.

12. Při kolonizaci nejsou antibiotika indikována.
13. Doporučuje se vyšetřit pacienty (na přítomnost kme-ne KPC) z jiných zdravotnických zařízení v nichž dochází k epidemickému šíření KPC, případně se zde tyto vyskytují endemicky.

Varšava, leden 2010

**Dodatek k Doporučení týkající se postupu při výskytu kmenů *Enterobacteriaceae* produkujících karbapenemázy typu KPC ve zdravotnických zařízeních.**

V současné době platí, že je nutné věnovat mimořádnou pozornost pacientům přijímaným ze zařízení v němž do-chází k epidemickému šíření KPC, případně z takového, v němž se tyto kmeny vyskytují endemicky. Totéž se týká pacientů přijímaných z oblasti hlavního města Varšavy, kde je problém KPC velice závažný.

*Prof. dr hab. n. med. Walerie Hryniewicz  
národní konzultantka v oblasti lékařské mikrobiologie  
Narodowy Instytut Leków  
Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej  
Chelmska 30/34, 00-725 Varšava, Polsko*



**Příloha č. 3.** Metodika pro průkaz klinicky významných  $\beta$ -laktamáz včetně karbapenemáz.

ZPRÁVY EPIDEMIOLOGIE A MIKROBIOLOGIE (SZÚ, PRAHA) 2009; 18(3)

---

**Detekce širokospektrých  $\beta$ -laktamáz (ESBL),  $\beta$ -laktamáz AmpC, metalo- $\beta$ -laktamáz (MBL) a karbapenemáz KPC u gramnegativních tyček**

*Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, AmpC  $\beta$ -lactamases, metallo- $\beta$ -lactamases and Klebsiella pneumoniae carbapenemases in Gram-negative rods*

---

Jaroslav Hrabák, Tamara Bergerová, Helena Žemličková, Pavla Urbášková

**Souhrn • Summary**

Předkládaná metodika umožňuje rutinní identifikaci hlavních typů klinicky významných  $\beta$ -laktamáz – širokospektré  $\beta$ -laktamázy (ESBL),  $\beta$ -laktamázy AmpC a metalo- $\beta$ -laktamázy (MBL). V metodice je rovněž uvedena možnost průkazu karbapenemáz skupiny 2f, které představují v některých státech významný klinický a epidemiologický problém.

*Methodologies for the identification of clinically important  $\beta$ -lactamases – extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL), AmpC  $\beta$ -lactamase (AmpC), and metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) are reviewed. The detection of 2f carbapenemases that are a significant clinical and epidemiological problem in some countries is described as well.*

Zprávy EM (SZÚ, Praha) 2009; 18(3): 100–106.



**Klíčová slova:** širokospektrá  $\beta$ -laktamáza, metalo- $\beta$ -laktamáza, *Klebsiella pneumoniae* karbapenemáza, enterobakterie  
**Keywords:** extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, metallo- $\beta$ -lactamase, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, enterobacteria

## 1. Úvod

V současnosti dochází k významným změnám v epidemiologii producentů klinicky významných  $\beta$ -laktamáz, mezi něž lze řadit širokospektré  $\beta$ -laktamázy (ESBL),  $\beta$ -laktamázy typu AmpC, metalo- $\beta$ -laktamázy, a v některých státech i serinové karbapenemázy skupiny 2f (klasifikace podle Bush et al. [3]) [7, 8, 10, 15]. V České republice lze každoročně pozorovat vzestup výskytu ESBL u *Escherichia coli* (nyní převážně klonální šíření producentů enzymů skupiny CTX-M), nárůstu kmenů *Klebsiella pneumoniae* produkujících ESBL a AmpC (DHA-1). V minulém roce byla poprvé zjištěna produkce metalo- $\beta$ -laktamáz (IMP-7) u *Pseudomonas aeruginosa* [9] a *Serratia marcescens* (VIM) (nepublikovaná data). Pro zvýšení senzitivity a specifity již publikovaných testů lze doporučit uspořádání testů popsanych v tomto článku.

## 2. Definice

### 2.1. Širokospektré $\beta$ -laktamázy

Obecně přijímaná definice ESBL zahrnuje řadu faktorů, které exaktně popisují biochemické vlastnosti těchto enzymů. Jedná se o  $\beta$ -laktamázy hydrolyzující peniciliny, cefalosporiny všech generací a monobaktamy. Jsou inhibovány inhibitory  $\beta$ -laktamáz (např. klavulanovou kyselinou), nehydrolyzují karbapenemy a obvykle ani cefamyciny (např. cefoxitin). Dle funkční klasifikace navržené K. Bush et al. spadají do skupiny 2be, část do skupiny 2d [2, 7].

### 2.2. $\beta$ -laktamázy AmpC

$\beta$ -laktamázy AmpC jsou enzymy spadající do skupiny 1 (klasifikace Bush et al. [2]), resp. skupiny C podle Amblera. Z funkčního hlediska hydrolyzují peniciliny, cefamyciny, většinu cefalosporinů a monobaktamy, nehydrolyzují karbapenemy a nejsou inhibovány inhibitory  $\beta$ -laktamáz (např. klavulanovou kyselinou) [8].

### 2.3. Metalo- $\beta$ -laktamázy

Substrátová specificita MBL zahrnuje peniciliny, cefalosporiny a karbapenemy. Monobaktamy (aztreonam) nejsou MBL hydrolyzovány. Nejsou inhibovány kyselinou klavulanovou, tazobaktamem nebo sulbaktamem, čili inhibitory  $\beta$ -laktamáz s  $\beta$ -laktamovým kruhem. Donorem molekuly vody při hydrolyze amidové vazby  $\beta$ -laktamu je kovový iont (obvykle zinek) vázaný v aktivním místě enzymu. V Amblerově klasifikaci jsou MBL zařazeny do skupiny B, v klasifikaci navržené K. Bush et al. se nachází ve skupině 3 [2, 4, 10].

## 2.4. Ostatní

### 2.4.1. OXA

Zahrnují skupinu velmi heterogenních  $\beta$ -laktamáz náležejících do funkční skupiny 2d, resp. D podle Amblera. Všechny  $\beta$ -laktamázy skupiny OXA hydrolyzují oxacilin a nejsou (popř. velmi slabě) inhibovány inhibitory  $\beta$ -laktamáz. Substrátová specificita enzymů OXA je značně různorodá – od penicilinů až po karbapenemy [10].

### 2.4.2. K1

$\beta$ -laktamáza označovaná jako K1 je základní inherentní  $\beta$ -laktamáza druhu *Klebsiella oxytoca*. Je slabě inhibovatelná kyselinou klavulanovou, proto může při DDST vytvářet typickou inhibiční zónu označovanou jako „egg-like“. Základním charakteristickým znakem je hydrolyza aztreonamu [11].

### 2.4.3. Karbapenemázy 2f

Jedná se o serinové karbapenemázy spadající do funkční skupiny 2f (část skupiny AmpA). Jsou velmi slabě inhibovány kyselinou klavulanovou. Stejně jako v případě AmpC, jsou tyto enzymy inhibovány kyselinou boritou. Některými autory jsou řazeny k ESBL, avšak tato klasifikace není optimální [11].

## 3. Mikrobiologická diagnostika $\beta$ -laktamáz

Většina testů používaných v laboratořích klinické mikrobiologie je založena na fenotypových metodách přímo vycházejících ze zmíněných definic – substrátové specificity a citlivosti k inhibitorům. Využití molekulárně-genetických technik je omezené, neboť tyto metody nemají schopnost popisu stupně rezistence vyšetřovaného kmene.

Metody průkazu ESBL, AmpC a MBL byly popsány dříve [11, 12]. Doporučené rozložení disků je znázorněno na obrázcích 1, 2, a 3.

### 3.1. ESBL

Průkaz širokospektrých  $\beta$ -laktamáz využívá inhibici hydrolyzy antibiotika klavulanovou kyselinou. Pro vyhledávání podezřelých kmenů lze použít výsledky vyšetření citlivosti pomocí diskové difúzní metody (IZ), resp. hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) [11]. Produkce ESBL je konfirmována vyšetřením synergie mezi kyselinou klavulanovou a cefalosporiny třetí, resp. čtvrté generace (viz dříve publikovaná metodika [11]).

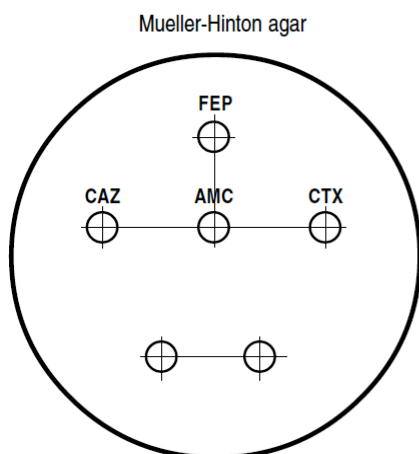
### 3.2. AmpC

Jako indikátorové antibiotikum může být použit cefoxitin. Toto antibiotikum velmi dobře hydrolyzuje většina AmpC  $\beta$ -laktamáz [8].

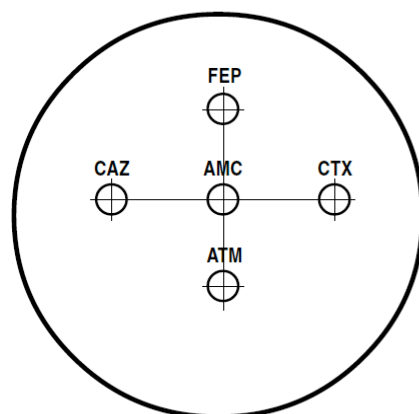
Inducibilní produkci AmpC lze prokázat jako antagonizmus mezi diskem s induktorem a cefalosporiny třetí generace. Jako induktor lze použít kyselinu klavulanovou, cefoxitin, resp. imipenem (viz tabulka 1) [6, 8].

V případě konstitutivních producentů, resp. hyperproducentů je možné použít inhibitorů tak, jako při průkazu

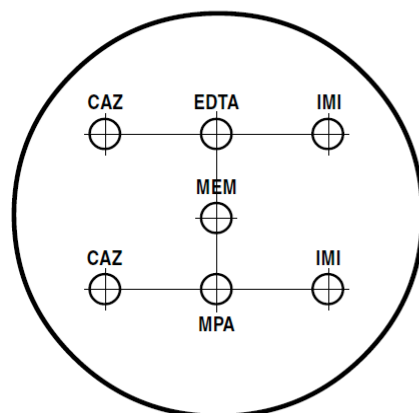
Obrázek 1: DOPORUČENÉ ROZLOŽENÍ DISKŮ pro průkaz ESBL a AmpC



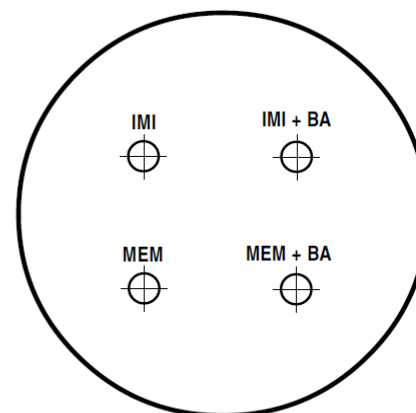
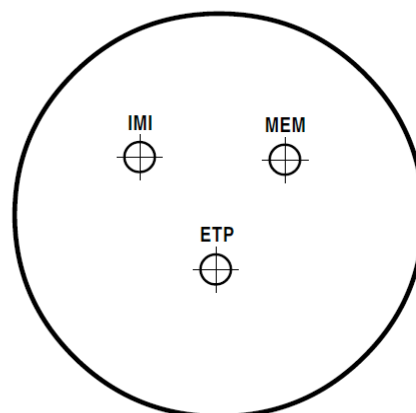
Mueller-Hinton agar se 128 mg/l oxacilinu (*inhibice AmpC*)



Obrázek 2: DOPORUČENÉ ROZLOŽENÍ DISKŮ pro průkaz MBL



Obrázek 3: DOPORUČENÉ ROZLOŽENÍ DISKŮ pro skríníng s průkaz KPC

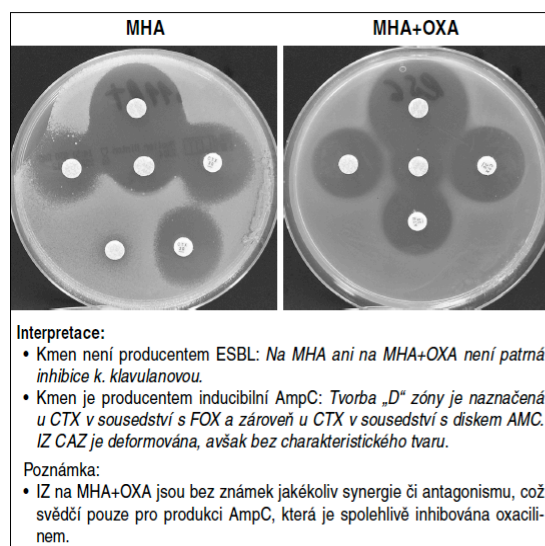


ESBL. Mezi důležité inhibitory AmpC patří oxacilin (kloxacilin), nebo kyselina boritá a její deriváty. Vzhledem k možné současné produkci ESBL je nejvhodnější použít Mueller-Hinton (MH) agar s oxacilinem (MHA+OXA) a srovnat průměr IZ s průměrem IZ na MH agaru bez přídavku inhibitoru [8]. Mimo tuto metodu byly vyvinuty metody založené na inhibici AmpC kyselinou boritou.

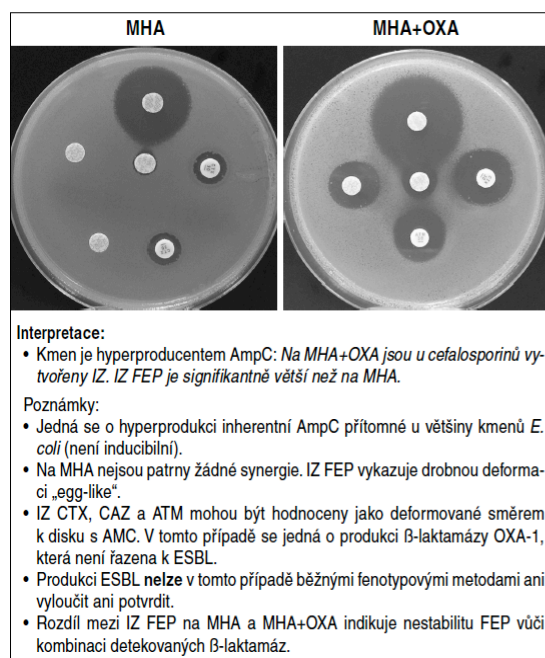
### 3.3. MBL

Metody průkazu MBL jsou založeny na průkazu inhibice těchto  $\beta$ -laktamáz chelátory kovových iontů (EDTA, kyselina 2-merkaptopropionová, atp.). Vzhledem k tomu, že u některých druhů (především *Acinetobacter* spp.) není EDTA dostatečně citlivá, je nutné použít kombinaci obou zmíněných inhibitorů – EDTA a kyseliny 2-merkaptopropionové (MPA) (viz tabulka 6). Uspořádání disků pro tuto metodu je zobrazeno na obrázku 1. Produkci MBL je nutné vždy konfirmovat spektrofotometrickou metodou hydrolyzy imipenemu prováděnou specializovanou laboratoří [1, 4, 12].

Tabulka 1: Produkce inducibilní AmpC. Kmen *Escherichia coli* dobře citlivý ke karbapenemům ( $MIC_{MER} \leq 0,125 \mu\text{g/ml}$ )



Tabulka 2: Konstitutivní produkce inherentní AmpC, současná produkce  $\beta$ -laktamázy OXA-1. Kmen *Escherichia coli* dobře citlivý ke karbapenemům ( $MIC_{MER} \leq 0,125 \mu\text{g/ml}$ )



### 3.4. Ostatní

#### 3.4.1. OXA

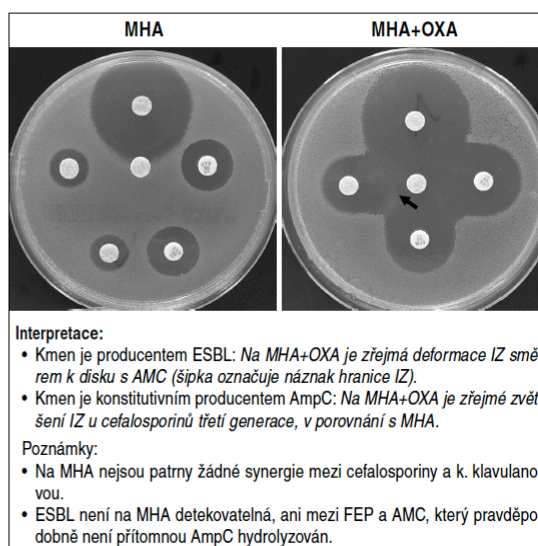
Jejich fenotypová detekce je velmi obtížná, proto lze spolehlivý průkaz provést pouze molekulárně-genetickými technikami [10]. Slabá inhibice kyselinou klavulanovou může v některých případech vést k nesprávné iden-

tifikaci producenta enzymů OXA s úzkým spektrem účinku (obvykle OXA-1) jako producenta ESBL (viz tabulka 2).

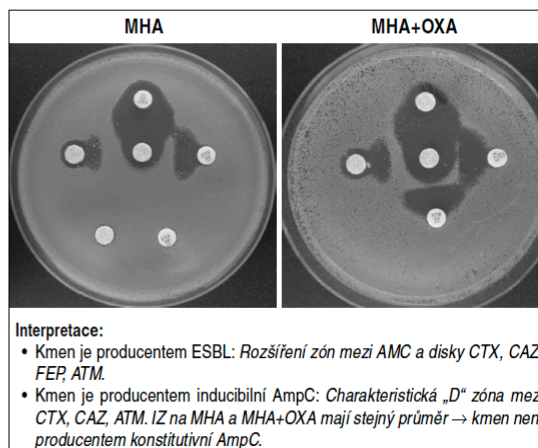
#### 3.4.2. K1

Specifický test pro průkaz  $\beta$ -laktamázy K1 není k dispozici. Základním předpokladem pro správnou identifikaci je provedená druhová identifikace. Na hyperprodukcii K1 lze usuzovat podle antibiogramu, na základě vysokého stupně rezistence k aztreonamu, cefalosporinům první a druhé generace a snížené citlivosti k cefotaximu. Kmen

Tabulka 3: Konstitutivní produkce AmpC a ESBL. Kmen *Morganella morganii* dobře citlivý ke karbapenemům ( $MIC_{MER} \leq 0,125 \mu\text{g/ml}$ ). Referenční kmen CNCTC 7375



Tabulka 4: Současná produkce ESBL a inducibilní AmpC. Kmen *Klebsiella pneumoniae* dobře citlivý ke karbapenemům ( $MIC_{MER} \leq 0,125 \mu\text{g/ml}$ )





při použití DDST nevykazují deformaci zón, případně je patrná pouze deformace typu „egg-like“ [11].

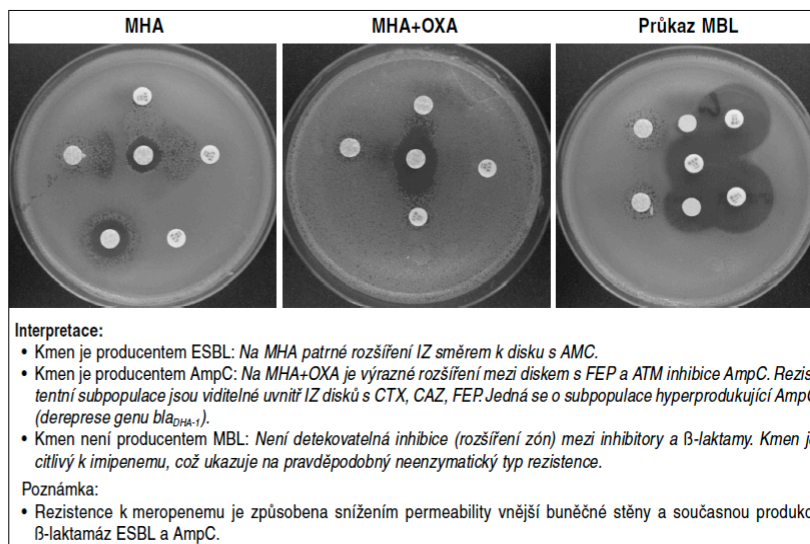
### 3.4.3. Karbapenemázy skupiny 2f

Karbapenemázy skupiny 2f jsou poměrně novým fenoménem v rezistenci enterobakterií ke karbapenemům [10]. Z tohoto důvodu dosud neexistují spolehlivé metody jejich detekce. V některých laboratořích se osvědčil průkaz produkce karbapenemázy tzv. 3D testem, avšak tento test je závislý na množství exprimovaného enzymu. Proto jeho standardizace pro rutinní aplikaci je obtížně proveditelná. Rovněž nelze použít DDST s kyselinou kladulanovou, neboť tyto karbapenemázy jsou inhibovány velmi slabě, přestože spadají do skupiny  $\beta$ -laktamáz inhibovatelných kyselinou kladulanovou a ostatními standardními inhibitory  $\beta$ -laktamáz (sulbaktam, tazobaktam) [10].

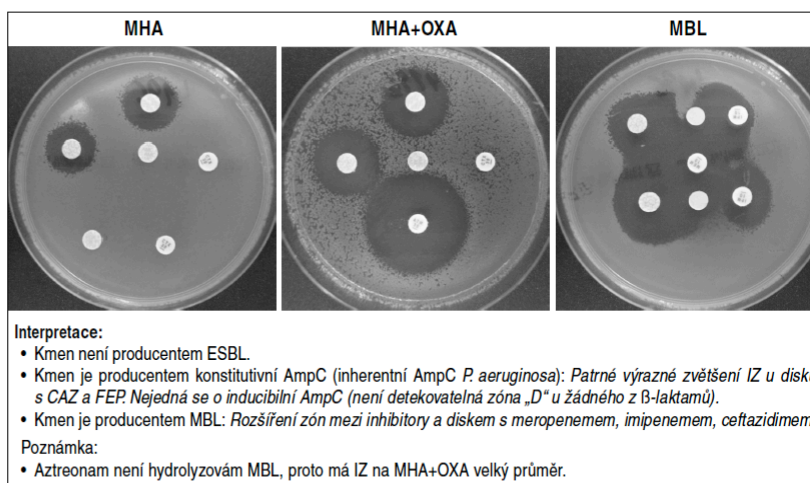
Pro rutinní vyhledávání podezřelých kmenů lze použít výsledky vyšetření MIC, resp. diskové citlivosti. Vhodným indikátorem se zdá být ertapenem [M. Gniadkowski, osobní sdělení]. Podezřelé kmeny jsou takové, které mají MIC meropenemu, imipenemu, nebo ertapenemu větší nebo rovno  $0,5 \mu\text{g/ml}$ . V případě diskové citlivosti tato hranice dosud zřejmě není, avšak za podezřelé lze považovat kmeny necitlivé alespoň k jednomu z karbapenemů (IZ meropenemu a imipenemu  $\leq 16$  mm, ertapenemu  $\leq 19$  mm) [3, 16].

Jako konfirmační test lze použít srovnání IZ imipenemu a meropenemu (disk  $10 \mu\text{g}$ ) a IZ imipenemu a meropenemu s přidávkem  $300 \mu\text{g}$  kyseliny borité (viz obr. 3). Je-li průměr IZ u disků s karbapenemem s přidávkem kyseliny borité větší než 5 mm v porovnání s IZ u samotného karbapenemu, může se jednat o produkci  $\beta$ -laktamázy KPC [5, 14]. Vzhledem k možné falešné pozitivitě je vždy nezbytné nutné produkci tohoto enzymu potvrdit ve specializované laboratoři, která disponuje příslušnými kontrolními kmeny. Verifikace je prováděna PCR amplifikací s následnou sekvenací a/nebo spektrofotometrickým měřením hydrolyzy imipenemu.

Tabulka 5: Současná produkce ESBL a AmpC. Kmen *Klebsiella pneumoniae* je rezistentní k meropenemu (MIC =  $8 \mu\text{g/ml}$ )



Tabulka 6: Současná produkce AmpC a MBL. Kmen *Pseudomonas aeruginosa*



Disky pro konfirmační test je potřeba připravit vždy čerstvě. Disk s karbapenemem se napustí  $20 \mu\text{l}$  roztoku kyseliny borité (zásobní roztok  $15 \text{ mg/ml}$ ) tak, že výsledná koncentrace na disku je  $300 \mu\text{g}$ . Disky je vhodné napouštět na sterilním podložním sklíčku a před použitím nechat alespoň 30 minut zaschnout [5, 14].

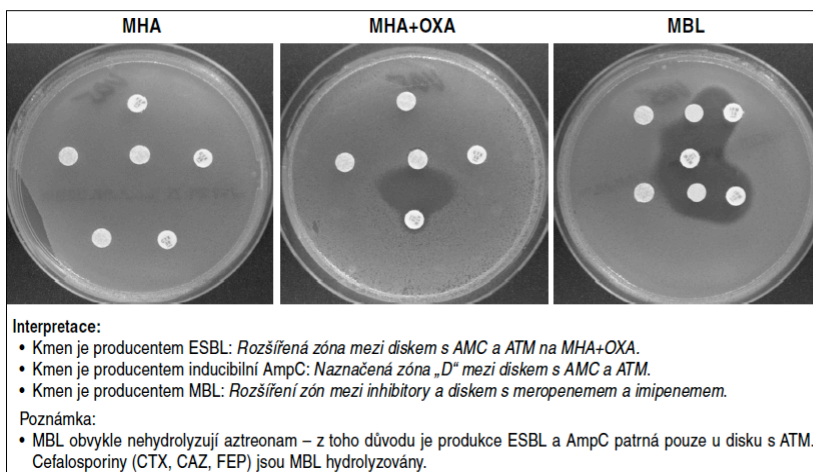
Příklad karbapenemáz 2f s různým stupněm rezistence je uveden v tabulce 8.

## 3.5. Současná produkce různých $\beta$ -laktamáz

### 3.5.1. Produkce ESBL a konstitutivní produkce AmpC

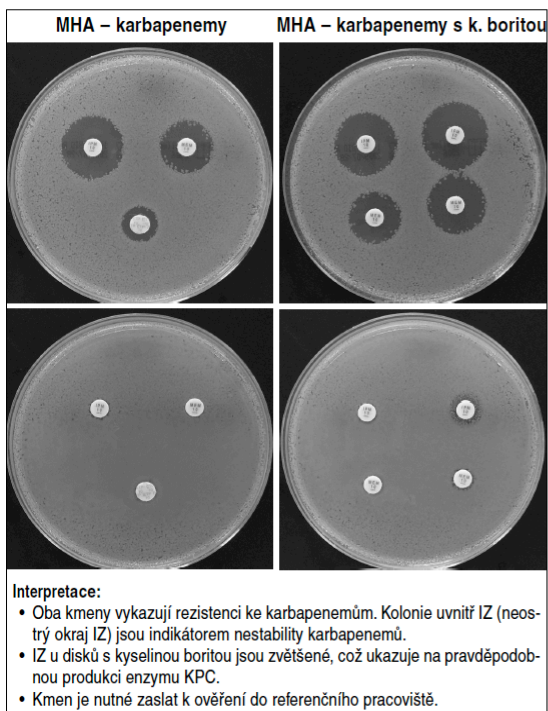
Konstitutivní produkce AmpC může maskovat vytvoření charakteristických deformací v případě současné produkce ESBL (viz Tabulka 3). Nejspolehlivější metodou k odfiltrování vlivu AmpC je použití MHA s oxacilinem

Tabulka 7: Současná produkce ESBL, AmpC, MBL.  
Kmen *Serratia marcescens* rezistentní ke všem  $\beta$ -laktamům



s kyselinou klavulanovou a disky s cefalosporiny. AmpC je však většinou produkována v nízké hladině i bez přítomnosti induktoru, proto lze často pozorovat zvětšení IZ na MHA+OXA. Charakteristické pro tuto kombinaci je „useknutí“ zvětšené inhibiční zóny u disku s AMC (viz tabulky 4, 5). Hlavním indikátorem pro produkci inducibilní AmpC je opět rezistence k cefoxitinu.

Tabulka 8: Různý stupeň rezistence u producentů karbapenemázy KPC (skupina 2f) u dvou kmenů *Klebsiella pneumoniae*



[11]. Konstitutivní produkce AmpC je charakterizována zvětšením IZ na MHA+OXA v porovnání s MHA. Jedním z hlavních indikátorů přítomnosti AmpC je rezistence k cefoxitinu [8].

### 3.5.2. Produkce ESBL a inducibilní produkce AmpC

Kmen, který současně produkuje inducibilní AmpC a ESBL, obvykle vytváří deformované IZ mezi diskem

### 3.5.3. Produkce MBL spolu s dalšími $\beta$ -laktamázy schopnými hydrolyzovat oxy-imino-cefalosporiny (ESBL, AmpC)

Vzhledem k tomu, že MBL hydrolyzují všechny  $\beta$ -laktamy s výjimkou monobaktamů (aztreonamu), bývá stupeň rezistence takových kmenů velmi vysoký. Aztreonam je jediným antibiotikem, které v tomto případě může sloužit jako indikátor (tabulka 7). Jeho umístění na MHA+OXA umožňuje detekovat ESBL (rozšíření zóny) i inducibilní AmpC („useknutí“ zóny). V případě pochybnosti lze použít stejné uspořádání disků z MHA+OXA na MHA.

## 4. Klinická interpretace

Enzymatická aktivita mnoha set známých typů  $\beta$ -laktamázy schopných hydrolyzovat cefalosporiny vyšších generací, případně karbapenemů, se vzájemně liší. Přesto biochemické konstanty nejsou jediným vodítkem ke stanovení stupně rezistence, neboť ten je významně závislý i na permeabilitě vnější buněčné stěny a tím prostupu antibiotika do periplasmového prostoru [10]. Na základě těchto argumentů je zřejmé, že jednoznačné interpretační kritérium pro producenty  $\beta$ -laktamázy nelze stanovit. Určitá interpretační kritéria lze nalézt v dokumentu EUCAST [13].

### 4.1. ESBL

Producent ESBL by měl být hodnocen jako rezistentní ke všem  $\beta$ -laktamovým antibiotikům včetně kombinací se serinovými inhibitory  $\beta$ -laktamázy (kyselina klavulanová, tazobaktam, sulbaktam). Jedinou výjimkou tvoří karbapenemy, které jsou všeobecně pokládány za léky volby u závažných infekcí způsobených producenty ESBL [7]. Dle expertních pravidel EUCAST by měl být kmen interpretován jako intermediárně citlivý k  $\beta$ -laktamovému antibiotiku, je-li hodnota MIC, resp. průměru IZ v citlivé kategorii. Jako rezistentní, je-li hodnota MIC (IZ) v intermediární kategorii [13].



#### 4.2. AmpC

Producenti získané AmpC (může být inducibilní) by měli být hodnoceni jako rezistentní k cefalosporinům 1.–3. generace. I když nejsou cefalosporiny 4. generace (cefepim) obvykle hydrolyzovány v signifikantní míře, je vhodné jejich klinické použití zvážit u každého případu zvláště, s ohledem na změnu citlivosti za přítomnosti inhibitoru AmpC (srovnání IZ na MHA a MHA+OXA).

#### 4.3. MBL

Producenti metalo- $\beta$ -laktamáz by měli být považováni za rezistentní ke všem  $\beta$ -laktamům (včetně karbapenemů), kromě aztreonamu, je-li kmen k němu citlivý a nereprodukuje-li některý z enzymů, který aztreonam hydrolyzuje (ESBL, AmpC, K1, atp.) [4].

Tato informace však slouží jen pro laboratorní účely, neboť aztreonam není v ČR dostupný.

#### 4.4. KPC

Interpretační kritéria pro producenty KPC nebyla dosud publikována. Přesto panuje shoda, že by v případě citlivosti kmene k některému z  $\beta$ -laktamů tato antibiotika neměla být preferována a kmen by měl být považován za rezistentní ke všem  $\beta$ -laktamům.

### 5. Závěr

Rezistence k antibiotikům je neustále se rozvíjející problém, umožňující sledování evoluce v reálném čase. Proto nelze žádnou metodiku považovat za bezvýhradně spolehlivou. Stejný problém zatěžuje interpretaci výsledků vyšetření a interpretační kritéria. Ani tato kritéria nelze považovat za zcela rigidní. Předkládaná metodika vychází z nejnovějších odborných poznatků s ohledem na epidemiologickou situaci v České republice a bude pružně aktualizována (viz také <http://www.betalaktamazy.cz>).

#### Poděkování

Autoři děkují Daně Červené za výtečnou laboratorní spolupráci. Práce byla financována grantem MŠMT č. 2E08003. Účast J.H. a T.B. byla částečně podpořena výzkumným záměrem č. MSM 0021620819.

#### POUŽITÉ ZKRATKY

MHA	Mueller-Hinton agar		
MHA+OXA	Mueller-Hinton agar s přidavkem 128 mg/l oxacilinu		
IZ	inhibiční zóna		
MPA	merkaptopropionová kyselina		
ESBL	širokospektrá $\beta$ -laktamáza		
EDTA	kyselina ethylendiamin tetraoctová		
MBL	metalo- $\beta$ -laktamáza		
AMC	amoxicilin/kyselina klavulanová		
ATM	aztreonam	FOX	cefoxitin
MEM	meropenem	CTX	cefotaxim
IMI	imipenem	CAZ	ceftazidim
ETP	ertapenem	FEP	cefepim
BA	kyselina boritá		

#### LITERATURA

1. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, et al. Convenient test for screening metallo- $\beta$ -lactamase-producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microb* 2000; 38: 40-43.

2. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-1233.
3. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth informational supplement. CLSI Document M100-S-16, PA, USA; 2006.
4. Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, et al. Metallo- $\beta$ -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 380-388.
5. Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type beta-lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 4083-4086.
6. Dunne MW, Hardin DJ. Use of several inducer and substrate antibiotic combinations in a disk approximation assay format to screen for AmpC induction in patient isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., and *Serratia* spp. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5945-5949.
7. Hrabák J. Klinicky významné  $\beta$ -laktamázy gramnegativních bakterií: širokospektré  $\beta$ -laktamázy (ESBL). *Epid mikrob imunol*, 2007, 56, 103-111.
8. Hrabák J. Klinicky významné  $\beta$ -laktamázy gramnegativních bakterií: AmpC. *Epid mikrob imunol*, 2007, 56, 155-165.
9. Hrabák J, Fridrichová M, Štolbová M, et al. First identification of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Euro Surveill* 2009; 14: 19102.
10. Hrabák J, Chudáčková E. Rezistence enterobakterií ke karbapenemům. *Epid mikrob imunol* 57, 2008: 125-136.
11. Hrabák J, Vaníš V, Bergerová T, et al. Průkaz  $\beta$ -laktamázy širokého spektra (ESBL) a typu AmpC u enterobakterií. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2007; 16: 31-36.
12. Hrabák J, Vaníš V, Bergerová T, et al. Průkaz metalo- $\beta$ -laktamázy (MBL) u gramnegativních bakterií. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2007; 16: 417-422.
13. Leclercq R, Cantón R, Giske C, et al. Expert rules in antimicrobial susceptibility testing, EUCAST, 2008, dostupné na [http://www.esmid.org/fileadmin/src/media/PDFs/4ESCMID\\_Library/3Publications/EUCAST\\_Documents/Other\\_Documents/EUCAST\\_Expert\\_rules\\_final\\_April\\_20080407.pdf](http://www.esmid.org/fileadmin/src/media/PDFs/4ESCMID_Library/3Publications/EUCAST_Documents/Other_Documents/EUCAST_Expert_rules_final_April_20080407.pdf).
14. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, et al. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2008; 47: 362-367.
15. Urbášková P, Jakubá V, Žemličková H, Macková B, a CZ-EARSS. Rezistence k antibiotikům u sedmi druhů invazivních bakterií, sledovaných v rámci EARSS v České republice v letech 2000–2006. *Prakt lék* 2007; 87(1): 32-39.
16. Urbášková P. 1998. Rezistence bakterií k antibiotikům. Vybrané metody. Trios.

Jaroslav Hrabák

Tamara Bergerová

Ústav mikrobiologie LF UK a FN v Plzni

Helena Žemličková

Pavla Urbášková

Národní referenční laboratoř pro antibiotika

Státní zdravotní ústav v Praze

#### Kontaktní adresa:

Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D.

Ústav mikrobiologie LF UK a FN v Plzni

Dr. E. Beneše 13, 305 99 Plzeň

Jaroslav.Hrabak@lfp.cuni.cz

## ERRATA k článku:

### Detekce širokospektrých $\beta$ -laktamáz (ESBL), $\beta$ -laktamáz AmpC, metalo- $\beta$ -laktamáz (MBL) a karbapenemáz KPC u gramnegativních tyčků

*Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, AmpC  $\beta$ -lactamases, metallo- $\beta$ -lactamases and Klebsiella pneumoniae carbapenemases in Gram-negative rods*

autorů: Jaroslav Hrabák, Tamara Bergerová, Helena Žemličková, Pavla Urbášková,  
otištěném v minulém čísle: Zprávy EM (SZÚ, Praha) 2009; 18(3): 100–106.

V obrázku 1, publikovaném na straně 102, chyběl popis dvou antibiotik. Čtenářům se omlouváme a přinášíme obrázek znovu, se správným popisem.

P.P.

Obrázek 1: DOPORUČENÉ ROZLOŽENÍ DISKŮ  
pro průkaz ESBL a AmpC

Mueller-Hinton agar

