

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

Michaela Buchlovská, DiS.

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví (B5345)

Michaela Buchlovská, DiS.

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví (B0914P360004)

**MECHANISMY REZISTENCE K VYBRANÝM SKUPINÁM
ANTIBIOTIK**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Chudějová, Ph.D.

PLZEŇ 2022

Na této straně se v tištěné verzi nachází zadání bakalářské práce.

Na této straně se nachází v tištěné verzi zadání bakalářské práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne: 25. 3. 2022

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Jméno a příjmení: Michaela Buchlovská, DiS.

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Mechanismy rezistence k vybraným skupinám antibiotik

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Chudějová, PhD.

Počet stran – číslované: 38

Počet stran – nečíslované: 21

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 34

Klíčová slova: Antibiotická rezistence, antibiotika, mechanismy antibiotik

Souhrn:

Antibiotika byla objevena za účelem léčby bakteriálních infekcí. Dodnes je jejich vynález považován za velký úspěch medicíny, ale jejich negativní účinky se začínají značně projevovat antibiotickou rezistencí. Vznik antibiotické rezistence sílí a s ní také počet málo citlivých bakterií na antibiotika. Bakterie si vytvářejí mechanismy, které se brání účinku před antibiotiky. Touto problematikou se zabývám ve své bakalářské práci, kde jsou popsány jednotlivé antibiotické rezistence u vybraných antibiotik. Dále je shrnuta diagnostika citlivosti antibiotik, které se věnuji v teoretické i praktické části. V praktické části jsou mimo jiné zahrnuta statistická data a diagnostická rozdílnost jednotlivých fenotypů u streptokoků, která vykazují určitý stupeň rezistence k erytromycinu nebo klindamycinu.

Abstract

Name and surname: Michaela Buchlovská, DiS.

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

Title of thesis: Resistance mechanisms of selected antibiotic group

Consultant: Mgr. Kateřina Chudějová, PhD.

Number of pages – numbered: 38

Number of pages – unnumbered: 21

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 34

Keywords: Antibiotics resistance, antibiotic, mechanisms of antibiotic

Summary:

Antibiotics have been discovered to treat bacterial infections. To this day, their invention is considered like a great success of medicine. But their side effects are beginning to manifest themselves significantly in antibiotic resistance. The development of antibiotic resistance is increasing and with it the number of bacteria that are less sensitive to antibiotics. Bacteria develop mechanisms that resist action from antibiotics. I am dealing with this issue in my bachelor thesis where the individual antibiotic resistance of selected antibiotics are described. Further I described diagnostics of antibiotic susceptibility, which I deal with in the theoretical and the practical part. The practical part includes among other things statistical file and diagnostic differences of individual phenotypes in streptococci which show certain type of resistance to erythromycin or clindamycin.

Předmluva

Antibiotika jsou léčiva, která poškozují nebo usmrcují bakterie. Málokdo si ale uvědomuje, jak nebezpečná mohou být pro lidský organismus. Koncem 60. let minulého století proto započaly studie o nevhodné preskripci antibiotik, která způsobuje nárůst infekcí, vyvolanými rezistentními kmeny. Byl proto zaveden tzv. ABS program, jehož název je odvozen od anglického termínu antibiotic stewardship. Tento program se zabývá sledováním antibiotické politiky, výskytem nozokomiálních nákaz v nemocničních zařízeních a jejich rezistencí, kterou se zabývá tato bakalářská práce.

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Kateřině Chudějové, PhD. za odborné vedení práce, cenné rady a vstřícnost při vypracovávání bakalářské práce. Dále děkuji Mgr. Markétě Stejskalové a Bc. Kateřině Vlkové za odbornou konzultaci. Také děkuji své rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	12
1 ÚVOD.....	14
TEORETICKÁ ČÁST	15
2 ANTIBIOTIKA	15
3 VÝZNAMNÉ SKUPINY ANTIBIOTIK.....	16
3.1 β -laktamová antibiotika	16
3.2 Makrolidy	17
3.3 Linkosamidy	18
3.4 Glykopeptidy	19
3.5 Oxazolidinony	20
3.6 Fluorochinolony.....	20
3.7 Tetracykliny.....	21
4 MECHANISMY ÚČINKU ANTIBIOTIK	22
4.1 Inhibice buněčný stěny	22
4.2 Inhibice cytoplazmatické membrány.....	23
4.3 Inhibice proteosyntézy.....	24
4.4 Inhibice nukleových kyselin.....	25
4.5 Antibiotika inhibující metabolické dráhy	26
5 MECHANISMY REZISTENCE K ANTIBIOTIKŮM.....	28
5.1 Přirozená (primární) rezistence	28
5.2 Získaná (sekundární) rezistence	28
6 JEDNOTLIVÉ MECHANISMY REZISTENCE.....	30
6.1 Modifikace antibiotik bakteriálními enzymy	30
6.2 Modifikace cílové struktury.....	31
6.3 Zhoršená permeabilita antibiotik.....	31
6.4 Efluxní systém	31

7 KLINICKY VÝZNAMNÉ MECHANISMY REZISTENCE U VYBRANÝCH SKUPIN ANTIBIOTIK	33
7.1 Oxacilin (meticilin).....	33
7.2 Makrolidy, linkosamidy a streptograminy.....	34
7.3 Vankomycin.....	35
7.4 Linezolid.....	36
8 DIAGNOSTIKA ANTIBIOTICKÉ CITLIVOSTI.....	37
8.1 Bujónová diluční mikrometoda	37
8.2 Disková difuzní metoda.....	38
8.3 Gradientové testy	38
8.4 Agarová diluční metoda.....	38
PRAKTICKÁ ČÁST	39
9 CÍL A ÚKOLY PRÁCE	39
10 METODIKA PRÁCE	40
11 POUŽITÝ MATERIÁL.....	41
11.1 Bakteriální kmeny.....	41
11.2 Použité antibiotické disky a agarová půda	41
11.3 Technické pomůcky.....	41
12 STANOVENÍ CITLIVOSTI K VYBRANÝM ATB	42
13 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	43
13.1 Průkaz fenotypového typu MLSB rezistence	43
13.2 Statistické zhodnocení	46
14 DISKUZE	50
15 ZÁVĚR	51
SEZNAM LITERATURY	52
SEZNAM OBRÁZKŮ	55
SEZNAM TABULEK	56

SEZNAM GRAFŮ	57
SEZNAM PŘÍLOH	58
PŘÍLOHY	59
Příloha A – Povolení sběru informací ve Fakultní nemocnici v Plzni	59

SEZNAM ZKRATEK

ABS	Antibiotic stewardship
ATB	Antibiotika
ATP	Adenosintrifosfát
CLSI	Institut pro klinické a laboratorní standardy (<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
DDT	Disková difuzní metoda
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ECDC	Evropské centrum pro prevenci a kontrolu nemoci (<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>)
<i>Erm</i>	Erytromycin ribozomální metyláza
ESBL	Širokospektré β -laktamázy (Extended-spectrum β -lactamases)
EUCAST	Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>)
IZ	Inhibiční zóna
MGE	Mobilní genetické elementy
MH	Mueller-Hinton agarová půda
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MLSB	Makrolidy-linkosamidy-streptogramin B
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
MRSA	Meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> citlivý k meticilinu/oxacilinu
NAG	N-acetylglukosamin

NAMA	Kyselina N-acetylmuramová
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PBP	Protein vázající penicilin (penicillin-binding protein)
RNA	Ribonukleová kyselina
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
tRNA	Transportní ribonukleová kyselina
VRE	Vankomycin rezistentní enterokoky
WHO	Světová zdravotnická organizace

1 ÚVOD

V teoretické části bakalářské práce je popsán vznik antibiotické rezistence, která dle WHO (Světová zdravotnická organizace) představuje velkou hrozbu pro zdraví obyvatelstva. Bakterie, které způsobují infekce, které byly dříve pomocí antibiotik (ATB) snadno léčitelné, se nyní stávají rezistentními. Následná léčba se stává neefektivní. První, kdo začal skloňovat pojem antibiotická rezistence byl sám Sir Alexander Fleming, který upozornil na nadměrné užívání a zneužívání ATB. Nyní, více než po půl století, se potvrdily jeho obavy a současné epidemiologické studie potvrzují vzrůstající spotřebu ATB, což má za následek rychle rostoucí počet rezistentních kmenů. ^[1,2]

Mezi hlavní důvody vzniku antibiotické rezistence patří zejména již zmíněné nadužívání ATB, například nevhodnou a nadměrnou preskripcí ošetřujícími lékaři. Dále jsou ATB hojně využívána v zemědělství a veterinární oblasti, např. pro prevenci infekcí u hospodářských zvířat a jejich rychlejší růst. Tento faktor následně negativně ovlivňuje okolní prostředí, kde se mikroorganismy snáze stávají rezistentními. ^[1]

S rychle vznikající rezistencí stoupají také požadavky na nová ATB a náklady na jejich výzkum. V roce 2019 zaznamenala WHO vývoj 32 nových ATB, z nichž pouze 6 splňovalo regule pro jejich klinické používání. Na základě vzniku rezistencí bylo zapotřebí uskutečnit několik organizačních kroků. Byl vytvořen například Globální akční plán pro antimikrobiální rezistenci, Světový týden antimikrobiálního povědomí či Globální systém pro sledování antimikrobiální odolnosti a používání a další. ^[2]

Praktická část je zaměřena na stanovení citlivosti streptokoků ke klindamycinu, erytromycinu a penicilinu a následnou laboratorní diagnostiku tzv. MLSB rezistence. Metodika byla prováděna pomocí diskového difuzního testu pro odlišení konstitutivního a inducibilního fenotypu testovaných bakterií. Součástí praktické části je rovněž statistika, která je zpracována z dat laboratorního informačního systému Fakultní nemocnice v Plzni, kdy bylo cílem zmonitorovat výskyt streptokokových kmenů vykazujících MLSB rezistenci.

TEORETICKÁ ČÁST

2 ANTIBIOTIKA

Antimikrobiální látky, které zamezují růstu bakteriálních mikroorganismů v malých koncentracích, jsou obecně známy pod pojmem antibiotika. Jejich počátky jsou známé z historicky dochovaných zápisů a poznatků starověkého Řecka, Číny nebo také Egypta. Dalšími důkazy mohou být poznatky ze středověku, kdy lidé vyzorovali, že plíseň na chlebu má hojivé účinky, a začali ji využívat při léčbě zánětlivých onemocnění. V roce 1928 byl objeven penicilin Sirem Alexandrem Flemingem, ale v klinické praxi se začal používat až během 2. světové války, kde bylo díky němu zachráněno mnoho lidských životů. ^[3,4]

Antibiotika by měla být pro lidský organismus primárně netoxická a mít dostatečný rozsah účinku a působit v cílových tkáních, kde bakterie působí. Důležitá je také epidemiologická situace a s tím spojený vznik rezistence k ATB, při které bakterie nereaguje na antimikrobiální léčbu. ^[4] Antimikrobiální léčba by měla být indikována po stanovení diagnózy a určení hlavního bakteriálního patogenu. Tomu předchází správný odběr materiálu a následně bezchybná analytická fáze. Velký vliv na vznik rezistence mají také pacienti, kteří musí respektovat nařízení lékaře a dodržet předepsanou léčbu. ^[5]

3 VÝZNAMNÉ SKUPINY ANTIBIOTIK

Kromě mechanismu účinku antibiotik, který bude popisován v dalších kapitolách, lze ATB rozdělit dle jejich molekulové struktury a spektra účinku. [6]

3.1 β -laktamová antibiotika

Tato skupina antibiotik se vyznačuje přítomností β -laktamového kruhu ve své molekulární struktuře (Obrázek 1) a svým baktericidním působením. Z důvodu velkého množství β -laktamů je obtížné popsat všechny ATB této skupiny. Nicméně nejvýznamnějšími podskupinami jsou peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktamy a inhibitory β -laktamázy. Každá z těchto podskupin zahrnuje řadu významných zástupců, kteří se využívají k terapii různých infekcí. [4]

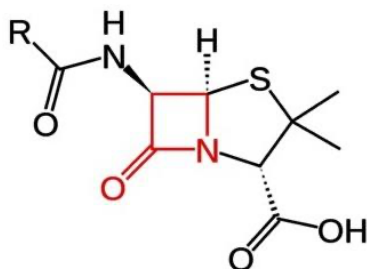
Nejnámější podskupinou jsou peniciliny, které lze zjednodušeně rozdělit na – základní, kombinované a antistafylokokové peniciliny. Základní neboli přirozené peniciliny se indikují při léčbě pyogenních infekcí a infekcí měkkých tkání. Nejčastějším původcem těchto infekcí jsou grampozitivní bakterie jako je *Streptococcus pyogenes* nebo *Streptococcus dysgalactiae*. Mezi taková ATB patří penicilin G a penicilin V. Širokospektré peniciliny (aminopeniciliny – amoxicilin, ampicilin) mají své spektrum účinku širší, a to zejména proti gramnegativním bakteriím. Poslední skupinou jsou protistafylokokové peniciliny, kam patří oxacilin, který je indikován u infekcí způsobených dominantně stafylokoky. Jeho účinnost na streptokoky je oproti penicilinu G snížena. Důležitost oxacilinu je zejména u léčby infekcí vyvolaných rezistentním kmenem stafylokoků, který tvoří penicilinázu. [4] Mechanismus účinku oxacilinu bude popsán v dalších kapitolách.

Další velkou podskupinou β -laktamových ATB jsou cefalosporiny, jejichž spektrum účinku je široké. Rozdělují se do pěti generací. První skupina cefalosporinů je účinná zejména na grampozitivity (např. *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.) a je odolná vůči stafylokokovým penicilinázám, Spektrum účinku druhé generace je stejné jako u první, ale navíc se uplatňuje především na infekce vyvolané běžnými gramnegativními bakteriemi jako je *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* a *Neisseria gonorrhoeae*. Na nefermentující gramnegativní bakterie je ale neúčinná. Třetí generace cefalosporinu vykazuje aktivitu vůči pseudomonádám a je hojně využívána v klinické praxi například u hnisavých onemocnění. Čtvrtá generace má podobné vlastnosti jako předchozí, s rozdílem

účinnosti na skupinu AmpC β -laktamáz. Poslední generace je schopna usmrtit meticilin-rezistentní stafylokoky (MRSA) a penicilin-rezistentní pneumokoky. [7]

Další významnou skupinou β -laktamových antibiotik jsou karbapenemy. Mají široké spektrum účinku s působností na většinu grampozitivních, gramnegativních, anaerobních a aerobních bakterií. Mezi zástupce této třídy se řadí ertapenem, který se využívá k léčbě infekcí vyvolané multirezistentními kmeny. Dále imipenem, který se užívá s inhibitorem cilastatinem, který v ledvinách brání dehydropeptidáze jeho degradaci. (4) V souvislosti s léčbou onemocnění, která jsou spojena s multirezistentními kmeny je zapotřebí monitorovat epidemiologickou situaci výskytu rezistencí. Jedná se především o rod *Klebsiella* spp. a ostatní enterobakterie, kdy byla v posledních letech mapována jejich schopnost produkce enzymů karbapenemáz, které jsou schopné štěpit a tím inaktivovat účinek karbapenemových antibiotik. [9]

Poslední významnou skupinou jsou monobaktamy, která jsou účinná pouze na gramnegativní bakterie včetně multirezistentních a lze je využít jako náhradu aminoglykosidů. Jejich výhodou je odolnost k β -laktamázám a metallo- β -laktamázám. Aztreonam je ATB, které se může aplikovat u pacientů s onemocněním močových cest či cystickou fibrózou. [11]



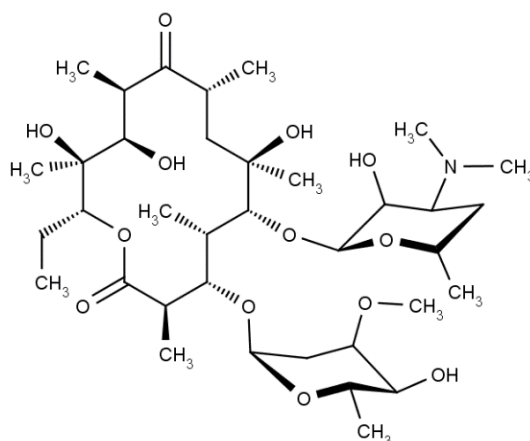
Obrázek 1: Obecná chemická struktura β -laktamových ATB ²⁸

3.2 Makrolidy

Makrolidy jsou bakteriostatická ATB pojmenována na základě své chemické struktury, jejíž součástí je makrocyclický lakton (Obrázek 2). Jako první z této skupiny byl objeven erytromycin, jehož spektrum účinku je podobné penicilinu. Makrolidy disponují navíc výhodou, že působí i na méně časté či kultivačně náročné bakterie – např. bordetely, legionely, mykoplasmata či chlamydie. V současnosti je používán v případě onemocnění respiračního či urogenitálního traktu. Dalšími zástupci jsou semisyntetické makrolidy,

tudíž taková ATB, která byla vytvořena z molekuly erytromycinu a následně upravena chemickou cestou. Všechna tato ATB, kam se řadí klaritromycin, azitromycin, spiramycin a roxithromycin mají podobné antibiotické účinky proti kultivačně náročným bakteriím, grampozitivním a anaerobním bakteriím. [4,8]

Účinky klaritromycinu se využívají při léčbě atypických respiračních infekcí a infekcí gastrointestinálního traktu. Vhodné je jeho použití při angíně u pacientů s alergií na penicilin. Stejně tak azitromycin, který se vyznačuje až 4x vyšší účinností než erytromycin či klaritromycin. Spiramycin se indikuje především u dětských pacientů s respiračním onemocněním a gravidních žen, kdy důvodem jeho užití je jeho malý toxický účinek a nižší vliv na gastrointestinální ústrojí. Roxitromycin je indikován pacientům primárně například při revmatické horečce. Oproti ostatním makrolidovým ATB má poměrně dlouhý biologický poločas, což umožňuje nižší dávkování léku např. i jen 1x denně. Také má vyšší koncentrace v krvi, proto lze využít i při hematogenním šíření infekce [4,8]



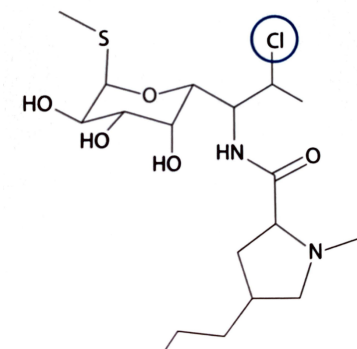
Obrázek 2: Obecná chemická struktura erytromycinu ²⁹

3.3 Linkosamidy

Molekula linkosamidů je složená z aminokyseliny prolinu a aminocukru, které jsou propojeny peptidickou vazbou. Jejich uplatnění je v případě infekcí zapříčiněných grampozitivními bakteriemi a anaeroby. Jsou to bakteriostatická antibiotika, která lze předepisovat i v těhotenství. [8]

Původní zástupce linkomycin byl nahrazen účinnějším, lépe vstřebatelným klindamycinem, který má na rozdíl od linkomycinu ve své molekule atom chlóru

(Obrázek 3). Inhibuje aktivitu stafylokoků, streptokoků a anaerobních bakterií. Klindamycin se používá také proti *Clostridium difficile*, který je spojován s průjmy a může vyústit až v rozvoj pseudomembranózní kolitidy, která je život ohrožující, ale využívá se hlavně k léčbě infekcí horních dýchacích cest, infekcí měkkých tkání a dekubitů. Ojediněle lze použít i k léčbě malárie či toxoplazmózy. [9]



Obrázek 3: Obecná chemická struktura klindamycinu ⁸

3.4 Glykopeptidy

Glykopeptidy, jak již vyplývá z názvu, obsahují ve své struktuře kromě cukerné složky také krátký peptidový řetězec, který je tvořen sedmi aminokyselinami. Díky své velké molekule nepůsobí tyto baktericidní ATB na gramnegativní bakterie, ale působí pouze na grampozitivní bakterie (např. listerie, korynebakteria) a grampozitivní striktně anaerobní bakterie. [4,8]

Hlavním zástupcem této skupiny je vankomycin, který je využíván při léčbě infekcí způsobených stafylokoky, streptokoky a jinými grampozitivními bakteriemi, včetně těch, která jsou rezistentní k β -laktamovým antibiotikům. Kromě toho existuje novější glykopeptid – teikoplanin, který vykazuje vysokou účinnost na enterokoky. Nasycení organismu je však pomalejší, než u vankomycinu proto i účinek antibiotik se dostaví pomaleji. [4,10]

3.5 Oxazolidinony

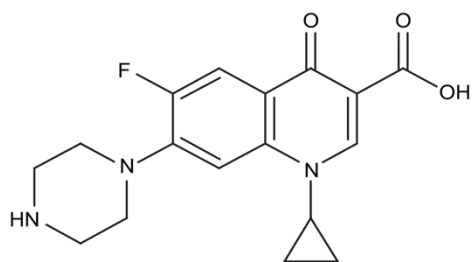
Tato bakteriostatická ATB byla vytvořena chemickou syntézou bez jakékoliv souvislosti s přírodním předkem. Účinkují proti grampozitivním kokům (*Staphylococcus aureus*, streptokoky, *Streptococcus pneumoniae*), grampozitivním tyčinkám, mykobakteriím a anaerobním bakteriím, jako je například *Clostridium difficile*, a na multirezistentní kmeny. [4,8]

Nejznámějším zástupcem oxazolidinů je linezolid, který představuje antibiotikum s úzkým spektrem účinku a který je výhodou vzhledem k snadnému pronikání do tkání. Jeho uplatnění je především pro léčbu nozokomiálních nákaz a onemocnění kůže. Stejně tak může být indikován v případě kloubních či kostních infekcí. Účinkuje proti grampozitivním kokům (*Staphylococcus aureus*, streptokoky, *Streptococcus pneumoniae*), grampozitivním tyčinkám, mykobakteriím a anaerobním bakteriím jako je například *Clostridium difficile* a na multirezistentní kmeny (MRSA, VRE). [4,8]

3.6 Fluorochinolony

Fluorochinolony jsou širokospektrá ATB s baktericidním účinkem, která také nebyla odvozena od žádného přírodního předchůdce. Jejich molekulová struktura je složena z chinolonového jádra a fluoru (Obrázek 4). Mají široké spektrum účinku a působí na gramnegativní tyčinky a koky, anaeroby a nefermentující gramnegativní tyčinky. Nejčastější využití fluorochinolonů je při terapii močových a gastrointestinálních infekcí a léčbě pohlavně přenosných nemocí. [4,11]

Nejpoužívanějším zástupcem ze skupiny fluorochinolonů je ciprofloxacin, který je známý především pro svůj účinek proti *Pseudomonas aeruginosa*, která způsobuje například záněty močových cest. Fluorochinolony jsou rozděleny do tří generací. První generaci zastupuje kyselina nalidixová, která se již nepoužívá, ale dříve sloužila k léčbě infekcí močových cest. Dále jsou to fluorochinolony druhé generace, kam se řadí ciprofloxacin, ofloxacin a levofloxacin. Jsou označovány také jako systémové fluorochinolony. Tuto skupinu doplňuje norfloxacin, který se nazývá močový fluorochinolon. Jak již z názvu vyplývá, používá se k léčbě močových cest. Poslední generaci zastupuje respirační ATB moxifloxacin, který se díky jeho širokému spektru účinku indikuje u respiračních onemocnění. [4,12]

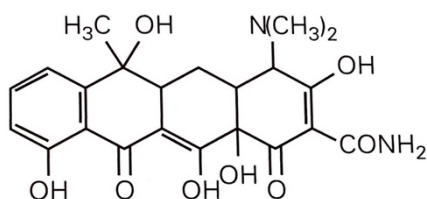


Obrázek 4: Obecná chemická struktura ciprofloxacinu ³⁰

3.7 Tetracykliny

Tetracykliny jsou širokospektrá bakteriostatická ATB se snadným průnikem do tkání. Jejich název je odvozen od čtyř lineárně fúzovaných aromatických kruhů přítomných v jádru molekuly (Obrázek 5). ^[8] Jsou účinné například proti mykobakteriím, a většině gramnegativních a grampozitivních bakterií. Kromě toho se mohou indikovat u protozoárních infekcí jako jsou malárie či toxoplazmóza. Značnou nevýhodou je jejich průnik placentou, tudíž je nelze použít v graviditě. ^[4]

Hlavním zástupcem tetracyklinu je doxycyklin, který se podává orální cestou s účinkem na chlamydie, rickettsie, francisely nebo bartonely. Především se užívá při pneumoniích, kapavce a jiných pohlavně přenosných infekcích. Dalším zástupcem této skupiny je tigecyklin, který se řadí ke glycylycyklinovým ATB a je používán při stafylokokových infekcích. Dále je ho možné využít proti gramnegativním bakteriím a anaerobně rostoucím bakteriím. Účinkuje také proti bakteriím, které si vytvořili rezistenci k β -laktamům. ^[8]



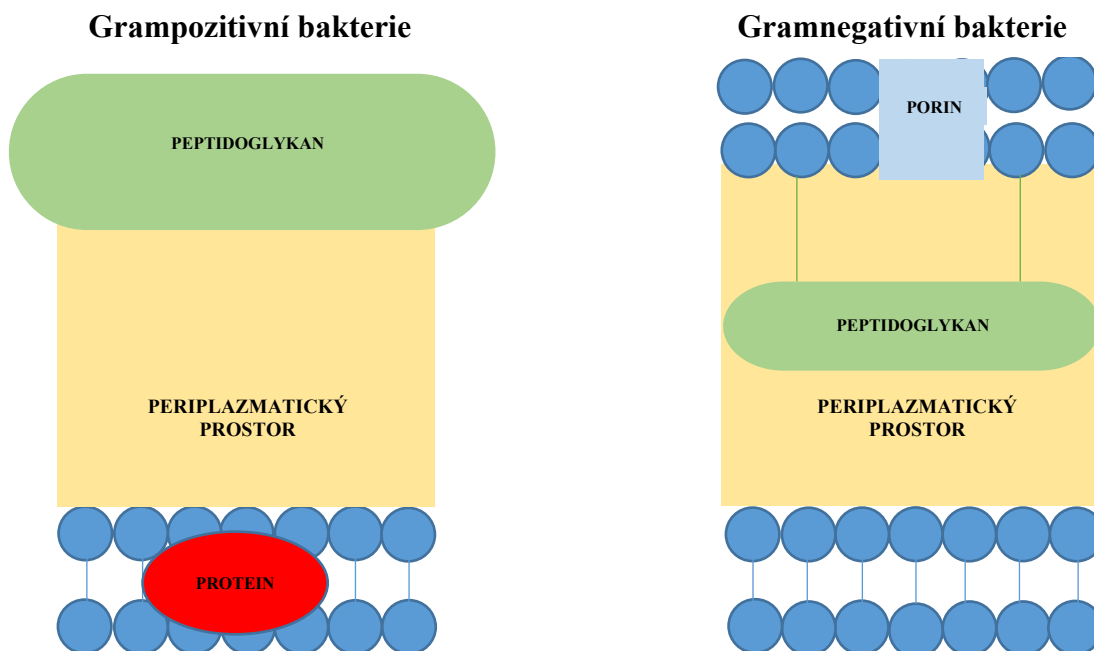
Obrázek 5: Obecná chemická struktura tetracyklinu ¹⁰

4 MECHANISMY ÚČINKU ANTIBIOTIK

Hlavním rozdělením antibiotik je jejich dělení dle jejich místa působení. Tato klasifikace vychází z mechanismů účinku antibiotik, které probíhají uvnitř bakterie na molekulární úrovni. Existuje pět základních míst působení ATB na bakterie. V první řadě je to buněčná stěna, dále buněčná membrána, ribozomy, nukleové kyseliny a metabolické dráhy. [10]

4.1 Inhibice buněčné stěny

Hlavní úlohou ATB je působit na bakteriální buňky a zároveň ponechat ostatní nepoškozené. Nejvhodnějším cílem antibiotik je tak peptidoglykan, který je složen z N-acetylglukosaminu (NAG) a kyseliny N-acetylmuramové (NAMA), které jsou zpevněné pentapeptidy. Peptidoglykan je součástí buněčných stěn grampozitivních i gramnegativních bakterií, jejichž buněčná stěna se liší jeho vrstvou (Obrázek 6). Ta se vyskytuje na vnější straně bakteriální buňky, kde zajišťuje její tvar, ochranu a přežití. Bez přítomnosti peptidoglykanu by došlo k deformaci a přílišnému rozpínání bakteriální buňky, které by jinak vzhledem k vnitřnímu hyperosmolárnímu prostředí nasávaly vodu až k prasknutí. [8,13]



Obrázek 6: Srovnání struktury buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií

Syntéza peptidoglykanu je složitý a zdlouhavý proces, který probíhá již v cytoplazmě a začíná vznikem z prekurzorů NAG a kyseliny NAMA. Po vytvoření se k NAMA připojí peptidový řetězec, který má na sobě připevněny tři aminokyseliny a spolu se navážou na NAG. Tento komplex, který se vytvořil v buněčné membráně je přenesen do buněčné stěny a tvoří základ peptidoglykanu. V dalším procesu se již zapojují enzymy (transglykosyláza, transpeptidáza), které spojí pomocí glykosidické vazby NAMA a NAG a vznikne tak pevná peptidoglykanová mřížka. [8, 10]

Mezi hlavní skupiny antibiotik, jejichž cílem je buněčná stěna patří zejména β -laktamová antibiotika a glykopeptidy.

Hlavním mechanismem účinku β -laktamových ATB je inhibice syntézy peptidoglykanu v jeho poslední fázi tvorby prostřednictvím inaktivace proteinů vázajících penicilin (penicilin-binding protein, PBP), které se na jeho syntéze podílejí společně s transpeptidázami. [26] Následkem je rozrušení buněčné stěny, a tím dochází k lýze buňky. Rezistence k β -laktamovým ATB může být způsobena několika mechanismy. Hlavním a nejčastějším mechanismem rezistence je inaktivace antibiotik pomocí enzymů β -laktamáz, dále změnou cílového místa (modifikace PBPs), a v neposlední řadě také změnou propustnosti porinu a eflux ATB z periplasmatického prostoru. Více budou tyto mechanismy popsány v následující kapitole. [8, 11]

Glykopeptidová ATB mají podobný účinek jako β -laktamy. Rovněž inhibují syntézu buněčné stěny. V tomto případě se ATB váží na konečné části peptidoglykanu, což znemožňuje jeho propojení. Následkem je oslabení bakterií a jejich osmotické poškození. [13]

Další antibiotika, která inhibují tvorbu peptidoglykanu je cykloserin, který zasahuje do intermediárního metabolismu. Dále pak bacitracin působící na membránu, a fosfomycin, který ovlivňuje prekurzory peptidoglykanu v cytoplasmatické membráně. [8]

4.2 Inhibice cytoplasmatické membrány

Cytoplasmatická membrána zastává bariérovou funkci a zároveň je to místo, kde kromě buněčného dýchání také vzniká energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP), který je důležitý pro metabolismus aerobních bakterií. Cytoplasmatickou membránu inhibuje řada antibiotik. Mezi hlavní zástupce patří polypeptidová ATB a nově jsou zde zařazeny i aminoglykosidy. [8]

Polypeptidová antibiotika zahrnují zejména polymyxin B a polymyxin E (kolistin). Jsou to ATB, která mohou poškozovat membránu tím, že se chovají jako detergent. Svým hydrofobním koncem se vklíní do membrány a degradují membránu gramnegativních bakterií a tím dojde k jejich smrti. [9]

Dále může bakteriální membránu ovlivňovat daptomycin, zástupce cyklických lipopeptidových ATB, který se svým hydrofobním koncem vklíní do bakteriální membrány. Několik takto zanořených molekul ATB následně vytvoří tunel, přes který z buňky mohou unikat malé ionty, což vede k rozvratu iontového prostředí a následné usmrcení bakterie. [14]

Aminoglykosidy jsou ATB, která byla dříve řazena mezi antibiotika inhibující proteosyntézu, ale před samotným účinkem na ribozomy musí aminoglykosid nejdříve překonat cytoplazmatickou membránu bakterie. U gramnegativních bakterií se molekuly ATB naváží na fosfolipidy a negativně nabitě bílkoviny za současného vytlačení hořčnatých a vápenatých iontů. Dochází tedy k narušení integrity bakteriální buňky, proto jsou v současné době tyto antibiotika řazena mezi inhibitory bakteriální membrány. Teprve po jejím překonání začínají inhibovat vlastní proteosyntézu. [8]

4.3 Inhibice proteosyntézy

Ribozomy bakterií se od eukaryotních ribozomů odlišují svou velikostí, jsou menší a složeny ze dvou podjednotek – 30S a 50S. Na menší podjednotce 30S se nachází mRNA, po které se přemisťuje ribozom. Molekula tRNA nacházející se na velké podjednotce má na svém povrchu tři nukleotidy, která mají svůj specifický kodon. Na druhém konci tRNA se nachází aminokyseliny, které se spojují v jeden peptidový řetězec. [8]

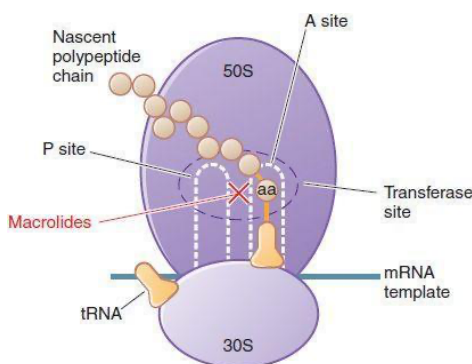
Mechanismus rezistence vzniklý inhibicí proteosyntézy funguje tak, že ATB je uchyceno na velké podjednotce ribozomu, kde se nachází molekuly tRNA (Obrázek 7). Jejich funkcí je za přítomnosti 3 nukleotidů (antikodonů) a kodonů na sebe vázat a připojovat peptidové konce za vzniku peptidových řetězců. Součástí ribozomu je také malá podjednotka, která na základě tvorby řetězců posouvá ribozom o jeden antikodon. Tento několika se opakující cyklus je dokončen za přítomnosti stop-kodonu, který zastaví proces proteosyntézy. Přítomnost ATB zabraňuje tomuto procesu na úrovni výměny tRNA, který připravuje aminokyseliny pro hladký průběh proteosyntézy. [8]

Ribozomy jsou cílem řady antibiotických skupin – mezi nejdůležitější řadíme makrolidy, linkosamidy, tetracykliny a linezolid. Jejich účinkem dochází k zastavení činnosti bakteriální buňky, nikoliv k jejímu usmrcení. Tyto antibiotika nemají tedy na bakteriální buňku účinek baktericidní, nýbrž bakteriostatický. [11]

Oxazolidinony jsou syntetická ATB a jejich hlavním zástupcem je linezolid. Toto ATB znemožňuje průběh proteosyntézy špatným uspořádáním celého ribozomu. Děje se tak navázáním na větší podjednotku v místě, kde se připojuje molekula tRNA, která je okamžitě zablokována a zabrání přístupu a napojování dalších aminokyselin. [8]

Makrolidy a linkosamidy inhibují proteosyntézu vazbou na 23S rRNA, která se nachází na velké podjednotce ribozomu poblíž peptidyltransferázy. Výsledkem je předčasný posun tRNA nebo jeho upevnění a znemožnění pohybu po ribozomu. [8,15]

Streptograminy způsobují předčasné uvolnění proteinů. Je to způsobeno chybnou stavbou ribozomu, které nedokáže do své velké podjednotky přijímat nové tRNA molekuly, a nedochází tak k připojení nové aminokyseliny. Ty se poté nemají kam navázat a jsou vypuzeny z ribozomu v podobě nefunkčních bílkovin. [8]



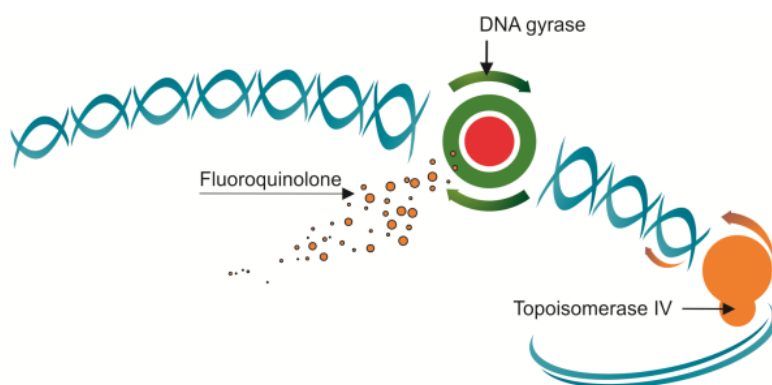
Obrázek 7: Stavba ribozomu a místo působení makrolidů ³¹

4.4 Inhibice nukleových kyselin

Funkce nukleových kyselin spočívá v přenosu a ukládání genetické informace ve formě deoxyribonukleové kyseliny (DNA) u prokaryotních (včetně bakteriálních) a eukaryotních buněk. Antibiotika, která inhibují nukleové kyseliny, působí přímo na DNA nebo na transkripci RNA. [8,11]

Hlavní skupinou inhibující syntézu nukleových kyselin jsou fluorochinolony, které inhibují topoizomerázy (hlavně topoizomeráza IV) nebo DNA-gyrázy (Obrázek 8). Tyto enzymy při syntéze DNA řídí rozvinování nebo svinování dvojšroubovice. Při navázání velkého počtu antimikrobiálních molekul na topoizomerázu/DNA-gyrázu enzymy neplní svou fyziologickou funkci, což vede k rozpadu DNA a následnému usmrcení buňky. Rezistence antibiotik k fluorochinolonům bývá nejčastěji způsobena bodovou mutací topoizomeráz nebo DNA-gyráz. [8,11]

Dalším antibiotikem inhibujícím syntézu nukleových kyselin je např. rifampicin používaný zejména jako antituberkulotikum. Na rozdíl od fluorochinolonů neinhibuje topoizomerázu, ale RNA-polymerázu. Důsledkem je blokáce přepisu DNA do mRNA. [8,11]



Obrázek 8: Mechanismus účinku fluorochinolonů³²

4.5 Antibiotika inhibující metabolické dráhy

Pro správnou replikaci buněk a jejich funkci při infekcích je důležitá zvýšená rychlost metabolismu folátů, mezi které se řadí kyselina listová. Ta je důležitou složkou pro lidský organismus při léčbě infekcí a má klíčovou úlohu v intermediárním metabolismu bakterií. Hlavní molekulou je koenzym tetrahydrofolát, který přenáší jednouhlíkaté skupiny.^[16]

Mezi hlavní ATB, která inhibují metabolické dráhy kyseliny listové patří sulfonamidy. Ty soutěží s kyselinou p-aminobenzoovou o místo v aktivním centru dihydropteroátsyntetázy, podporující kyselinu tetrahydrolistovou, důležitou látku pro syntézu nukleových kyselin a metabolismus aminokyselin. [8]

Metabolické dráhy kyseliny listové ovlivňuje také např. antibiotikum trimetoprim, které zabraňuje syntéze kyseliny tetrahydrolistové a také působí inhibičně na dihydrofolát reduktázu. Následkem je zábrana přeměny kyseliny dihydrofolové na kyselinu tetrahydrofolovou, která má důležitou funkci při syntéze DNA. [8,10]

ATB mohou také působit inhibičně na metabolickou dráhu mykobakterií. Příkladem je kyselina para-aminosalicylová, přes kterou se nedostává dostatečné množství železa do mykobakterií. Dále cykloserin, inhibující buněčnou stěnu špatnou tvorbou D-alaninu a diarylchainoliny, které v buněčném metabolismu zastavují tvorbu ATP. [8]

5 MECHANISMY REZISTENCE K ANTIBIOTIKŮM

Bakteriální rezistence představuje možnost bakterie odolávat antibiotické léčbě. Rozlišujeme rezistenci přirozenou a získanou. Obě rezistence jsou geneticky podmíněné a podléhají standardně dědičnosti. Rozšíření rezistencí jak přirozených, tak získaných probíhá klonálně z mateřské buňky na dceřinou (vertikální přenos) nebo horizontálně (skrze sdílení genetické informace mezi buňkami, a to i mezi různými kmeny bakterií). [17]

5.1 Přirozená (primární) rezistence

Primární rezistence je přirozená schopnost bakterie vzdorovat účinkům antibiotické léčby, jejíž příčinou může být absence cílového místa pro antimikrobiální látky, jejich špatná absorpce nebo vypuzení (eflux) antibiotik z buňky. [4]

Primární rezistence je často typickým znakem daného bakteriálního druhu. Týká se vlastností, stavby či metabolismu dané bakterie a může být využívána pro její selektivní izolaci nebo také její identifikaci při diagnostice na selektivních kultivačních půdách. [8] Do těchto půd se přidávají ATB, která umožňují růst hledaného kmene a tlumí růst ostatních mikroorganismů. [4]

Všechny grampozitivní bakterie a anaeroby si například vytvářejí přirozenou rezistenci k aminoglykosidům a kolistinu. Dalším příkladem jsou gramnegativní bakterie, které jsou rezistentní k oxacilinu, vankomycinu nebo linezolidu. K cefalosporinům jsou přirozeně rezistentní enterokoky, listerie a anaeroby. [11]

5.2 Získaná (sekundární) rezistence

Přenos získané rezistence může být uskutečněn horizontálně či vertikálně, prostřednictvím mutací genu.

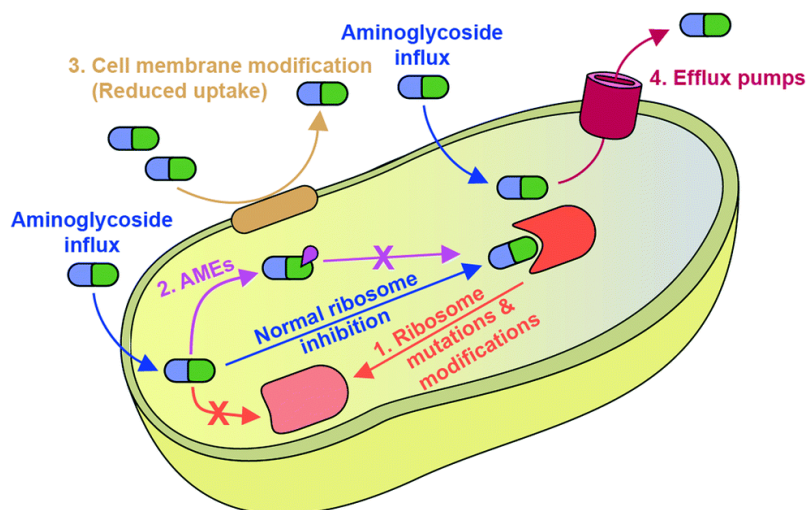
Podstatou vzniku získané rezistence je to, že z původně citlivého kmene se stal rezistentní k daným ATB. Příkladem klinicky významných získaných rezistencí je *Staphylococcus aureus* rezistentní k meticilinu (MRSA) nebo enterokok rezistentní k vankomycinu (VRE) a další. [11]

Horizontální přenos nejčastěji způsobuje rozvoj antibakteriálních rezistencí a vzniká prostřednictvím tří základních mechanismů, kterými bakterie získávají genetickou informaci z vnějšího prostředí – konjugace, transformace a transdukce. Konjugace je přenos genetické informace pomocí tzv. sex pilů. K přenosu genetické informace dochází prostřednictvím

tzv. mobilních genetických elementů (MGE). Mezi nejvýznamnější MGE patří zejména plasmidy, kterých mohou bakterie využívat pro získání genetické informace, nebo transpozony, které se mohou samovolně přemístit v určitých místech DNA a následně se vklínit do chromozomu a být součástí genomu buňky. Mezi MGE řadíme také integrony, představující jednoduchý, ale efektivní mechanismus, kterým přidávají nové geny do bakteriálních chromozomů k zajištění exprese. ^[15] Dalším mechanismem je transformace, při které bakterie získávají DNA z okolního prostředí. Zásobárnou této získané DNA jsou uhynulé bakterie a cílem je z okolního prostředí dostat co největší množství nukleotidů. Třetí mechanismus je transdukce, kdy je umožněn přenos genetické informace mezi dvěma bakteriemi za pomoci bakteriofágů. ^[8,17]

6 JEDNOTLIVÉ MECHANISMY REZISTENCE

Tato kapitola se zabývá problematikou rozvoje rezistence u bakterií a faktory, které tomu napomáhají. Jsou zde popsány funkce inhibičních enzymů, zacílení bakterií na cílové struktury, vstřebávání antibiotik, a nakonec aktivní transport ATB z buňky prostřednictvím efluxních pump. Všechny tyto mechanismy jsou shrnuty na Obrázku 9.



Obrázek 9: Mechanismy rezistence antibiotik ³³

6.1 Modifikace antibiotik bakteriálními enzymy

Mechanismus enzymatické inaktivace, který činí ATB neúčinným se nejčastěji vyskytuje u β -laktamových ATB. Nejvýznamnějším typem těchto enzymů jsou tzv. β -laktamázy, které působí hydroliticky na amidovou vazbu β -laktamového kruhu. Klasifikace jednotlivých skupin vychází ze struktury aktivního centra β -laktamáz. Rozdělují se na čtyři základní skupiny – penicilinázy, širokospektré β -laktamázy (ESBL), β -laktamázy třídy C (AmpC) a karbapenemázy. ^[8]

Penicilinázy, jak už vyplývá z názvu štěpí penicilin a jsou produkovány zejména kmeny *S. aureus*. ESBL a AmpC mají hydrolytickou aktivitu širší – kromě penicilinů štěpí i většinu cefalosporinů a monobaktamy. Enzymy s nejširším spektrem účinku jsou karbapenemázy. Karbapenemázy kromě zmíněných skupin štěpí i karbapenemová antibiotika. Geny pro všechny zmíněné skupiny enzymů jsou často lokalizovány na plasmidech, méně na chromozomu, což umožňuje horizontální přenos genů mezi gramnegativními bakteriemi. ^[8]

6.2 Modifikace cílové struktury

Bakterie mohou několika způsoby uplatnit svou schopnost změnit afinitu k cílovému místu a vyhnout se tak působení ATB. Změna může být na úrovni mutace genu, metabolických drah, nebo může probíhat až po reakci s ATB, kdy bakterie pozmění cílové molekuly. Další možností je vytvoření cílových míst v nadbytku, kdy bakterie začne produkovat cílový enzym ve větším množství. ^[8,19]

Změna způsobená mutací genů vede ke změně aktivního centra enzymu či jeho poruše. Příkladem těchto změn může být mutační změna u rezistence k linezolidu a tedizolidu, kdy je prokázána mutace na velké podjednotce ribozomu 23S rRNA. Dalším příkladem je rezistence k fluorochinolonům, kdy dochází k inhibici DNA-gyrázy či topoizomerázy IV. ^[19]

6.3 Zhoršená permeabilita antibiotik

Aby došlo k účinné léčbě musí ATB proniknout do intracelulárních prostor skrze cytoplazmatickou membránu bakterie, na které se nachází bílkovinné poriny. Funkcí těchto proteinů je zprostředkování průchodu látkám (toxiny, metabolity) z vnitřního a vnějšího prostředí včetně ATB. Z tohoto důvodu musí ATB proniknout až do vnitřní membrány, aby uplatnila své účinky. β -laktamy, tetracykliny nebo některé chinolony jsou ATB, která využívají porinů k překonání bariéry. V důsledku špatné funkce nebo narušení exprese porinu se zmíněná hydrofobní ATB nedostanou do buňky. ^[19,20]

Existuje několik typů porinů, které se odlišují svou strukturou, selektivitou a regulací exprese. Klasickým příkladem jsou OmpF, OmpC a PhoE, které produkuje *Escherichia coli*. *Pseudomonas aeruginosa* produkuje další důležitý porin a to OprD, který má schopnost snížit vstřebávání ATB. ^[19]

6.4 Efluxní systém

Efluxní pumpy jsou transmembránové pumpy pracující na principu aktivního transportního mechanismu, kterými jsou vyčerpávány ATB z bakteriální buňky. Velkou výhodou těchto pump je, že nemají jen jednu funkci, ale zastávají i přirozené úlohy v běžném fungování bakteriální buňky. Nevýhodou tohoto systému ale je jeho energetická náročnost a jen omezená schopnost odstranění ATB z bakteriální buňky. Spíše tedy snižují účinek antibiotik, které se již dostalo do buňky, oproti jiným mechanismům, které ATB zcela

zneškodňují. Exprese efluxních pump se vyskytuje u celé řady gramnegativních bakterií.

[8,11]

Rozlišuje se pět základních typů efluxních pump, která se rozdělují dle jejich energetického zdroje a struktury – ABC, MATE, SMR, RND, MFS. Zjednodušený přehled je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1: Klasifikace efluxních pump ⁸

Efluxní systém	Zdroj energie	Antibiotikum
ABC	ATP	makrolidy, fluorochinolony
MATE	Na ⁺ / H ⁺ gradient	trimetoprim, fluorochinolony, aminoglykosidy
SMR	H ⁺ gradient	tetracykliny
RND	H ⁺ gradient	β-laktamy, fluorochinolony, makrolidy, aminoglykosidy, tetracykliny, chloramfenikol, novobicin, rifampicin, trimetoprim
MFS	H ⁺ gradient	fluorochinolony, novobicin, chloramfenikol

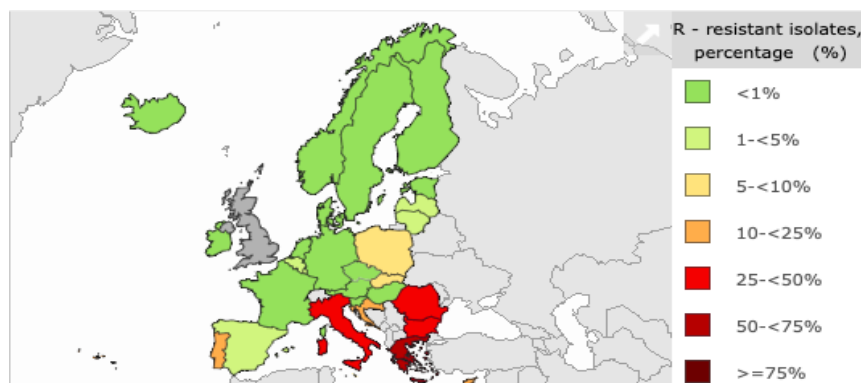
7 KLINICKY VÝZNAMNÉ MECHANISMY REZISTENCE U VYBRANÝCH SKUPIN ANTIBIOTIK

7.1 Oxacilin (meticilin)

Hlavním mechanismem rezistence u β -laktamového oxacilinu je změna syntézy PBP, kdy vzniká mutantní forma PBP2a, Tato změna je kódována genem *mecA*. PBP2a má nízkou afinitu k meticilinu a s největší pravděpodobností také k ostatním β -laktamovým ATB. Díky tomu *Staphylococcus aureus* získává rezistenci k meticilinu – tyto kmeny jsou poté označovány jako MRSA. Oxacilin se využívá k diagnostice MRSA, kdy se nachází v testovací půdě, na které je aplikovaný vyšetřovací kmen. Pokud se potvrdí jeho rezistence (vyšetřovaný kmen na půdě vyroste) je zřejmé, že bude rezistentní také k meticilinu. ^[22]

MRSA se řadí mezi nejčastěji se vyskytující rezistence vůči ATB. Obrázek 10 znázorňuje epidemiologickou situaci MRSA v Evropě za rok 2020. Tato data pochází z tzv. EARS-Netu – systému pro monitoring rezistence v Evropě. EARS-Net je řízen Evropským střediskem pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC). *S. aureus* se fyziologicky vyskytuje až u 30 % obyvatelstva. Nejčastěji kolonizuje nos, krk či kůži a také střevo. Běžně citlivý *S. aureus* (MSSA) byl dříve citlivý na penicilin, ale dnes jsou již skoro všechny kmeny MSSA penicilin rezistentní díky produkci penicilinázy. Riziko nákazy MRSA kmeny je spojeno s hospitalizací, častou návštěvou v ambulanci nebo přítomností ve stacionáři. K infekcím může dojít bez předchozí kolonizace, to znamená přenosem na pacienta například od personálu nemocnice. Riziko nákazy MRSA se zvyšuje prostřednictvím operačních rán či zavedením žilního katetru a dalších pomůcek, které mohou být kontaminovány z prostředí či od personálu kolonizovaného MRSA kmenem. ^[11]

Antibiotikum první volby pro terapii infekcí způsobenými kmeny MRSA je vankomycin, eventuálně lze uplatnit teikoplanin či linezolid. Lze také použít ceftarolin, což je cefalosporin 5. generace. ^[11]



Obrázek 10: Zastoupení MRSA kmenů v invazivních klinických materiálech v Evropě k roku 2020³⁴

7.2 Makrolidy, linkosamidy a streptograminy

Hlavním mechanismus rezistence k těmto skupinám antibiotik je nejčastěji mutace cílového místa, dále to může být také eflux antibiotik z buňky ven či modifikace antibiotika pomocí enzymů. Lze také prokázat mutaci v ribozomálních proteinech L4 a L22, která může vést k rezistenci k erytromycinu, a to nejčastěji u *Streptococcus pneumoniae*.^[23]

Zkřížená rezistence k těmto skupinám antibiotik je zapříčiněna produkcí enzymu metylázy, který způsobuje modifikaci vazebného místa na ribozomu a erytromycin se tak nemůže navázat. To vede k tomu, že jsou bakterie rezistentní nejen k makrolidům, ale také k linkosamidům a streptograminu B (označováno souhrnně jako MLSB rezistence). Na plasmidech ribozomu se nachází kódované *erm* geny (erytromycin ribozomální metyláza), které jsou distribuovány mezi bakteriemi. Rozdělují se do několika skupin, např. skupina A je typická pro stafylokoky, skupina B pro enterokoky a streptokoky. Kromě těchto genů lze detekovat také jiné druhy, jako například *ermTR* u β -hemolytických streptokoků.^[22] *Erm* geny se dokážou trvale aktivovat (konstitutivní rezistence) nebo se aktivují dle nutnosti v přítomnosti erytromycinu (inducibilní rezistence). Geny pro tuto rezistenci mohou být lokalizovány na plasmidu i chromozomu.^[8]

Dále může být rezistence k makrolidům způsobená mutacemi efluxních pump. Příkladem je přítomnost *mef* genů u *Streptococcus pneumoniae* nebo přítomnost *msr(A)* genů u kmenů *Staphylococcus aureus*.^[23] Spontánní bodová mutace, která je vytvořena během efluxu napadá gen pro syntézu enzymu peptidyl-transferázy, jehož funkcí je zabezpečit posun peptidového řetězce na ribozomu. V případě absence tohoto enzymu nedochází k translaci, tedy vzniku bílkovin z mRNA. Pokud je napadena molekula peptidyl-transferázy

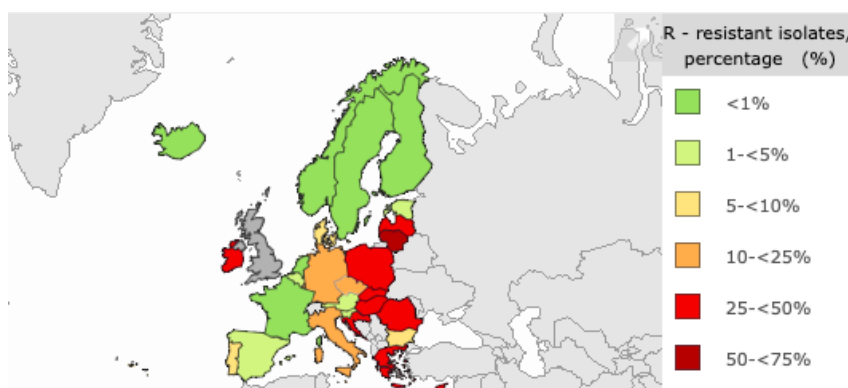
dojde v aktivním centru ribozomu ke snížené citlivosti vůči ATB. Tento typ rezistence je v literatuře také označován jako M fenotyp vyznačující se pouze zkříženou rezistencí makrolidů pouze ke streptograminům. Citlivost linkosamidů zůstává zachována. [8]

7.3 Vankomycin

Rozlišuje se devět genů způsobujících rezistenci k vankomycinu, které se označují jako *van* geny. Rezistence enterokoků k vankomycinu se vyznačuje záměnou D-alaninu za D-laktát u penptidoglykanu. Tyto kmeny tedy nazýváme vankomycin-rezistentní *Enterococcus* (VRE). Nejčastěji se jedná o geny *vanA* a *vanB*, které jsou lokalizovány zejména na plasmidech a vedou k vysokému stupni rezistence k vankomycinu. Existuje také záměna D-alaninu za D-serin, která se vyskytuje u genů typu *vanC* u kmenů *Enterococcus casseliflavus*, *E. gallinarum* a *E. flavescens*. V tomto případě jsou geny lokalizovány pouze na chromozomu, jedná se tedy o vrozenou vlastnost těchto kmenů. [8,21]

Rezistence k vankomycinu je nejčastěji nacházena u kmenů *Enterococcus faecium*, které způsobují např. infekce krevního řečiště a záněty močových cest. Obrázek 11 poukazuje na výskyt VRE v roce 2020 v Evropě. VRE se nejčastěji vyskytují a šíří v nemocničních zařízeních, kde pacienti pobývají delší dobu. Vyskytují se často například u hematoonkologických pacientů. Detekce VRE je méně častá než záchyt MRSA, ale přesto je zaznamenávána vysoká úmrtnost na infekce způsobené VRE kmeny. [1,8]

Antibiotikem volby, která jsou podávána při terapii infekcí způsobenými vankomycin rezistentními kmeny, jsou například linezolid, dalfopristin, daptomycin a tigeicyklin. Další příklad je nový lék oritavancin, který je registrován od roku 2014 a je to uměle připravený glykopeptid, který je strukturou podobný vankomycinu. [1,8]



Obrázek 11: Zastoupení VRE kmenů v invazivních klinických materiálech v Evropě k roku 2020 ³⁴

7.4 Linezolid

Rezistence k oxazolidinonům se v České republice objevuje výjimečně. Za rezistenci zodpovídají vzniklé bodové mutace, které mají za následek změnu na ribozomech nebo konfiguraci ribozomálních proteinů. Tyto mutace jsou kódovány geny, která se nevyskytují na plasmidech, ale jsou uloženy na chromozomech. ^[8]

Stejně jako u makrolidů dochází i zde ke změnám ribozomální RNA skrze metylaci. Za tuto změnu odpovídá enzym rRNA-metyl-transferáza, který je kódován na plasmidech a je řízen *cfr* geny. Enzym je schopný zabránit vazbě antibiotik, mezi něž patří linkosamid, chloramfenikol a další. ^[8]

8 DIAGNOSTIKA ANTIBIOTICKÉ CITLIVOSTI

V mikrobiologických laboratořích se rutinně provádí vyšetření ke zjištění citlivosti bakterií na daná antibiotika řadou postupů. Z rutinně využívaných metod jsou nejčastěji používány bujónová diluční metoda, disková difuzní metoda a gradientové testy. Pro výzkumné a doplňující účely se může využít i agarová diluční metoda, kterou většinou provádí specializovaná pracoviště typu NRL (Národní referenční laboratoř). Pro hodnocení citlivosti jsou zavedeny pojmy jako citlivý nebo rezistentní. V případě citlivého kmene k ATB se předpokládá účinnost jeho léčby. Pokud je kmen rezistentní na dané antibiotikum, léčba selhává a je neefektivní. Nově je také zařazen výsledek „citlivý, při zvýšené expozici“. Ten se využívá v případě, kdy jsou antibiotika doporučena podávat ve vyšších dávkách. O tom, zda je kmen zařazen do skupiny citlivé, rezistentní nebo citlivý se zvýšenou expozicí je rozhodnuto na základě každoročně aktualizovaných naměřených hodnot, které vydává nadnárodní společnost EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) pro Evropu, nebo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) pro USA. [25]

Pro hodnocení citlivosti ATB se užívá pojem breakpoint, taktéž označovaný jako hraniční koncentrace, podle níž se určuje rezistence bakterie. Výsledky jsou u dilučních metod posuzovány hodnotou minimální inhibiční koncentrací (MIC) v jednotkách mg/l. Pokud je hodnota MIC nižší než breakpoint, znamená to, že bakterie je citlivá na dané antibiotikum a předpokládá se úspěšná léčba. Naopak pokud je vyšší než breakpoint, je dané antibiotikum hodnocené jako neúčinné. V případě diskových difuzních metod se k hodnocení používá velikost inhibičních zón (IZ) vyjadřovaná v milimetrech. [26]

8.1 Bujónová diluční mikrometoda

Bujónová mikrometoda se provádí v 96 jamkové plastové mikrotitrační destičce, do nichž se aplikuje inokulum vyšetřovaných bakterií. Každý sloupec destičky obsahuje naředěný roztok testovaného antibiotika. Po uplynutí doby inkubace se zhodnotí výsledek jako nejnižší koncentrace ATB, která inhibuje růst testovaného kmene. Nejčastěji se používá 8 koncentrací jednoho antibiotika v ředění dvojnásobnou geometrickou řadou. [27]

Tato metoda je jednoduchá a ekonomicky výhodná, proto je první volbou v rutinních laboratořích. Koncentrace inokula uvnitř mikrotitračních destiček nemá vliv na výsledek. Výhodou této metody je schopnost určení rezistence. Nevýhodou je nemožnost odlišení kontaminace a nelze zhodnotit u bakterií, které snadno podléhají autolýze. [27]

8.2 Disková difuzní metoda

Principem diskové difuzní metody je měření průměru inhibiční zóny, která vznikne po 16-24 hodinách inkubace při 35 °C na agarové půdě okolo disku, který je napuštěn určitou antimikrobiální látkou. [28]

Disková difuzní metoda je výhodná pro její jednoduchost. Snadno také lze poznat přítomnou kontaminaci. Nelze ji použít u bakterií s nízkou rychlostí růstu nebo speciálními růstovými podmínkami nebo pokud potřebujeme znát MIC. Koncentrace inokula ovlivňuje výsledek a je snížena schopnost účinku rezistence zapříčiněná některými mechanismy rezistence. [27]

8.3 Gradientové testy

Zvaný také epsilometrický test (E-test), je test zjišťující MIC pomocí plastových proužků napuštěných ATB o známé koncentraci, který se aplikuje na agarovou půdu s naočkovaným inokulem. Na straně proužku je stupnice, kolem níž se vytvoří eliptická inhibiční zóna, kde je označena koncentrace a podle níž se po příslušné inkubaci určí hodnota MIC. [28]

Výhodou E-testu je, že se snadno odhalí kontaminace. Jeho provedení vždy stojí za zvážení, díky jeho vysoké ceně a řadě nevýhod mezi které se řadí také to, že koncentrace inokula může výrazně ovlivnit výsledek a také, jako u předchozích, je snížena schopnost detekce rezistence. [27]

8.4 Agarová diluční metoda

MIC se hodnotí na různě koncentrovaných agarových půdách. Běžně je připraveno 12-15 koncentrací stejného antibiotika ředěného dvojnásobně geometrickou řadou. Na půdu se aplikuje inokulum vyšetřovaných bakterií a po dané době se odečítá nejnížší množství antibiotika, které zabraňuje růstu bakterií. [27]

Mezi výhody této metody se řadí diagnostika většího množství kmenů, odhalení kontaminace a koncentrace použitého inokula neovlivňuje výsledek. Je také výhodná pro špatně rostoucí bakterie v tekutém prostředí jako jsou meningokoky nebo některé anaerobní bakterie. Tato metoda je velice pracná a zdlouhavá, také ekonomicky náročná a je snížena schopnost určení rezistence. Tato metoda se nepoužívá rutinně. [27]

PRAKTICKÁ ČÁST

9 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

Praktická část zahrnuje tyto 3 cíle:

1. Seznámit se s problematikou MLSB rezistence u gram pozitivních bakterií.
2. Zvládnutí laboratorní diagnostiky MLSB rezistence u streptokoků pomocí tzv. D-testu.
3. Statistické zpracování výskytu MLSB rezistence u vybraných streptokoků ve Fakultní nemocnici v Plzni na Ústavu mikrobiologie.

10 METODIKA PRÁCE

Praktická část byla provedena na specializovaném pracovišti ve Fakultní nemocnici v Plzni na Ústavu mikrobiologie. Ústav mikrobiologie se jako jediný v Plzeňském kraji zabývá monitorací spotřeby antibiotik a diagnostikou multirezistentních bakterií.

V mikrobiologických laboratořích se rutinně využívá pro stanovení citlivosti ATB disková difuzní metoda (DDT). Důležitou součástí provedení DDT je papírový disk, který je napuštěn antimikrobiálním činidlem o přesné koncentraci. Disky se kladou na naočkovanou půdu pomocí dávkovače nebo sterilní jehly. Po inkubaci v termostatu je odečítán průměr inhibičních zón (IZ), který je úměrný citlivosti kmenu. Tato hodnota v milimetrech se srovnává se známými hodnotami breakpointu pro dané antibiotikum.

U onemocnění, která jsou způsobena β -hemolytickými streptokoky, je ATB první volby penicilin. Zároveň přibývá mnoho pacientů, kteří vykazují alergickou reakci na penicilin. Pokud nastane zmíněná alergická reakce musí se nasadit jiná terapeutická léčba. V tomto případě se začnou podávat makrolidová ATB, proti kterým si bakterie svými mechanismy začínají postupně vytvářet rezistenci.

V praktické části jsem se seznámila s metodikou provádění stanovení citlivosti u streptokoků a provedením D-testu pro zjištění MLSB rezistence. Dále byl tento typ rezistence hodnocen z epidemiologického hlediska statisticky. Pro získání údajů ke statistickému zpracování jsem využila laboratorní systém Ústavu mikrobiologie. Soustředila jsem se na získání dat u streptokokových infekcí u pacientů za období 2019-2021. Ohled se nebral na věk, pohlaví či oddělení, které zajišťovalo odběr. Zpracované údaje jsou přehledně zadány do grafů pomocí MS Office.

11 POUŽITÝ MATERIÁL

11.1 Bakteriální kmeny

- *Streptococcus dysgalactiae*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Streptococcus pyogenes*

11.2 Použité antibiotické disky a agarová půda

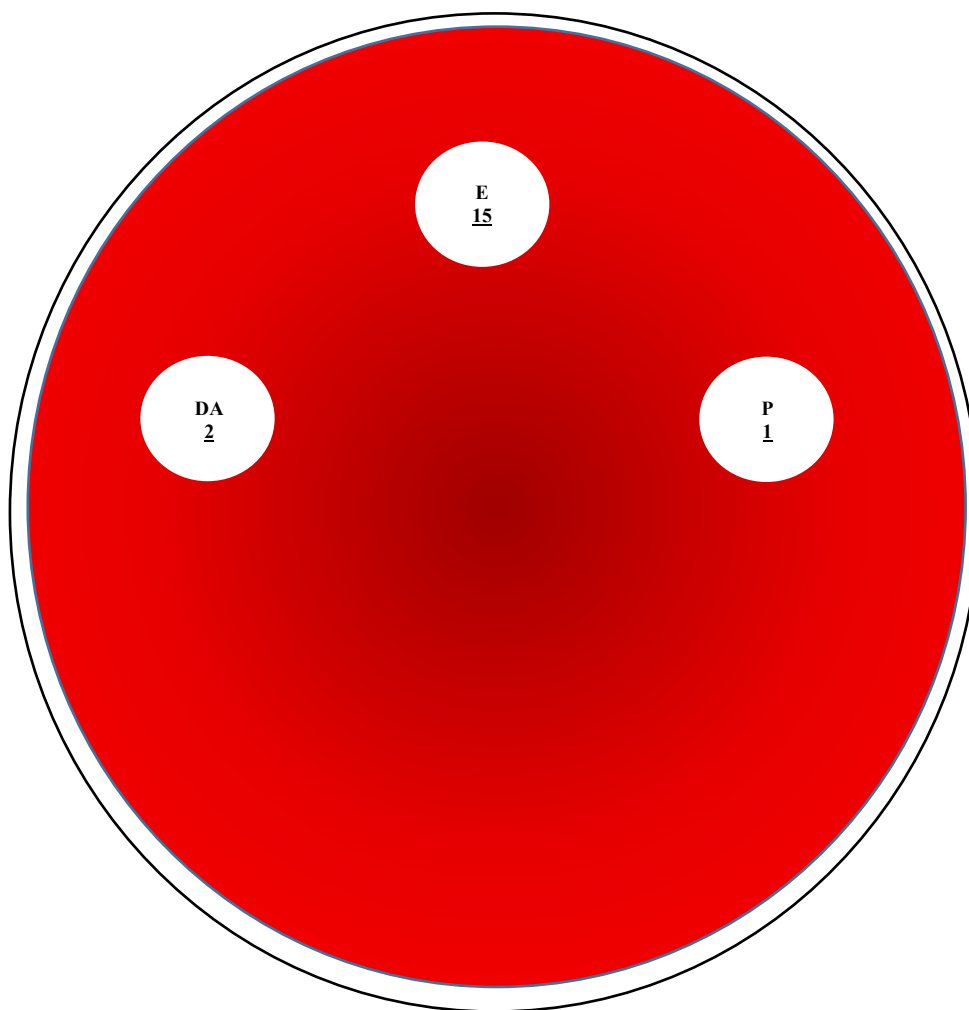
- Disk napuštěný 1 µg penicilinem (OXOID)
- Disk napuštěný 15 µg erytromycinem (OXOID)
- Disk napuštěný 2 µg klindamycinem (OXOID)
- Mueller-Hinton (MH) agar obohacený o 5 % beraní krve (Biomerieux)

11.3 Technické pomůcky

Bakteriologické kličky, fyziologický roztok, lihový kahan, denzitometr, sterilní tampón, sterilizovaná jehla, termostat, posuvné měřidlo.

12 STANOVENÍ CITLIVOSTI K VYBRANÝM ATB

Z testovaných kmenů byla nejdříve připravena suspenze o zákalu 0,5 dle McFarlandovy stupnice. Suspenze se připravila pomocí sterilní bakteriologické kličky, kterou se nabral narostlý kmen a resuspendoval se v 10 ml fyziologického roztoku. Vzniklá suspenze se rozetřela sterilním tampónem na MH agar do všech směrů, aby byl naočkovaný celý povrch plotny. Poté byly na agarovou půdu aplikovány komerčně dostupné antibiotické disky s penicilinem, klindamycinem a erytromycinem ve vzdálenosti 15 milimetrů od sebe pomocí sterilní jehly, jak znázorňuje Obrázek 12. Petriho miska s aplikovanými antibiotickými disky se položila víčkem dolů do termostatu, kde probíhala kultivace 24 hodin při teplotě 37 °C. Po inkubaci se odečetl při dobrém zdroji světla pomocí posuvného měřidla, díky kterému byla stanovena inhibiční zóna růstu, která se porovnála s danými breakpointy příslušného antibiotika.



Obrázek 12: Disková difuzní metoda pro detekci MLSB rezistence

13 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

V této kapitole jsou zahrnuty výsledky z laboratorního porovnání fenotypů streptokoků a statistické zpracování tří druhů streptokoků za období 2019-2021.

13.1 Průkaz fenotypového typu MLSB rezistence

Na Obrázku 13 je zobrazen kmen citlivý ke všem testovaným ATB. Jedná se o citlivý fenotyp. V tomto případě lze z testovaných ATB využít k léčbě infekce způsobené *Streptococcus dysgalactiae* klindamycin, erytromycin i penicilinové ATB.



Obrázek 13: *S. dysgalactiae* bez MLSB rezistence – citlivý k P, DA i CLI.

Legenda: P – penicilin, DA – klindamycin, E – erytromycin

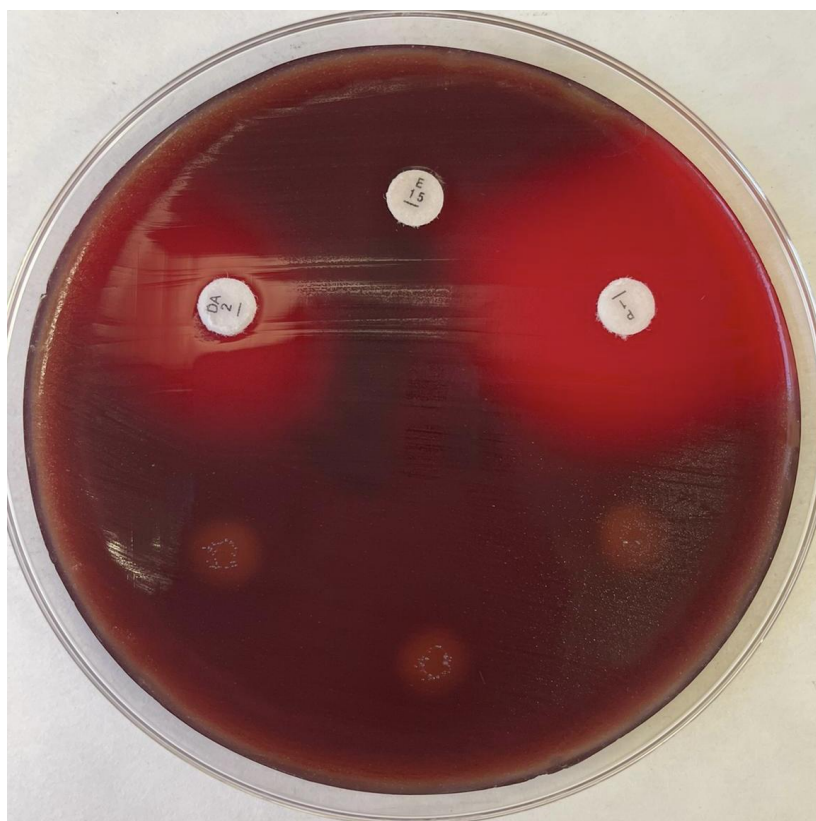
Na Obrázku 14 je zobrazen konstitutivní typ MLSB rezistence u kmenu *Streptococcus agalactiae*. Testovaný kmen je proto rezistentní k erytromycinu i klindamycinu. V tomto případě je možné k terapii využít pouze zde citlivý penicilin.



Obrázek 14: Konstitutivní typ MLSB rezistence u *S. agalactiae*

Legenda: P – penicilin, DA – klindamycin, E – erytromycin

Obrázek 15 zobrazuje indukibilní typ MLSB rezistence u kmenu *Streptococcus pyogenes*. Testovaný kmen je rezistentní k erytromycinu. Ke klindamycinu vykazuje indukovanou rezistenci. Pro terapii je z nabídky možné použít pouze penicilin. Klindamycin lze využít pouze v případě, že se nejedná o život ohrožující infekci a není možná jiná alternativa.



Obrázek 15: Inducibilní typ MLSB rezistence u *S. pyogenes*

Legenda: P – penicilin, DA – klindamycin, E – erytromycin

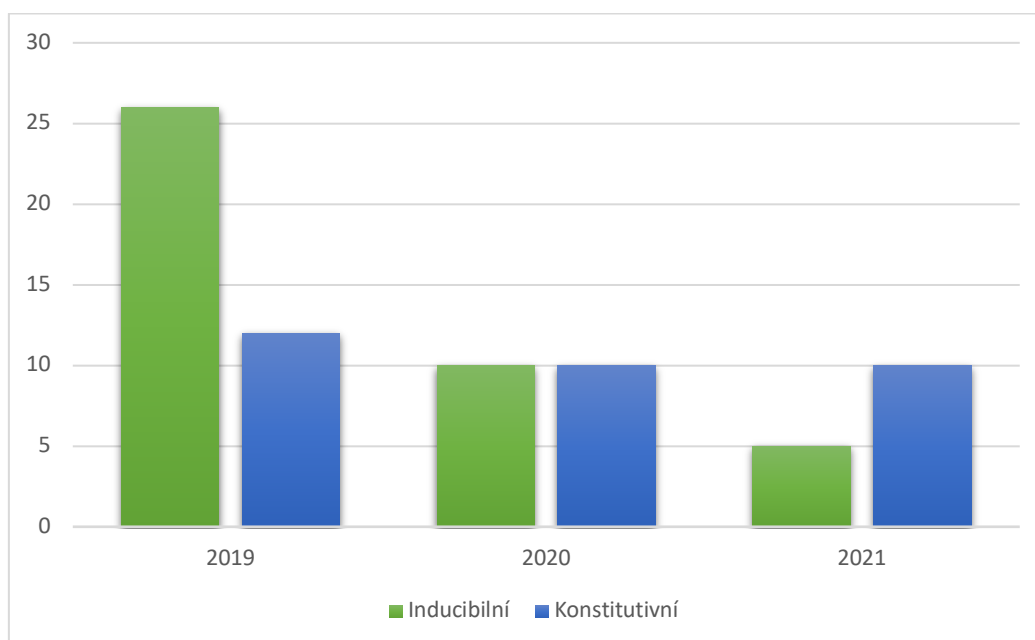
13.2 Statistické zhodnocení

Následující tři grafy (Graf 1-3) nám znázorní celkový počet všech pacientů, u kterých se vyskytoval buď konstitutivní nebo inducibilní typ MLSB rezistence za období 2019-2021. Celkové počty jsou shrnuty v tabulkách, které přísluší danému grafu pro lepší přehled.

*Tabulka 2: Přehled celkových počtů zachycených kmenů u *S. pyogenes* vykazujících konstitutivní nebo inducibilní MLSB rezistenci*

	2019	2020	2021	Celkem
Celkový počet	38	20	15	73
Inducibilní fenotyp	26	10	5	41
Konstitutivní fenotyp	12	10	10	32

*Graf 1: Grafické zpracování počtů detekovaných kmenů *S. pyogenes* vykazující konstitutivní nebo inducibilní MLSB rezistenci*



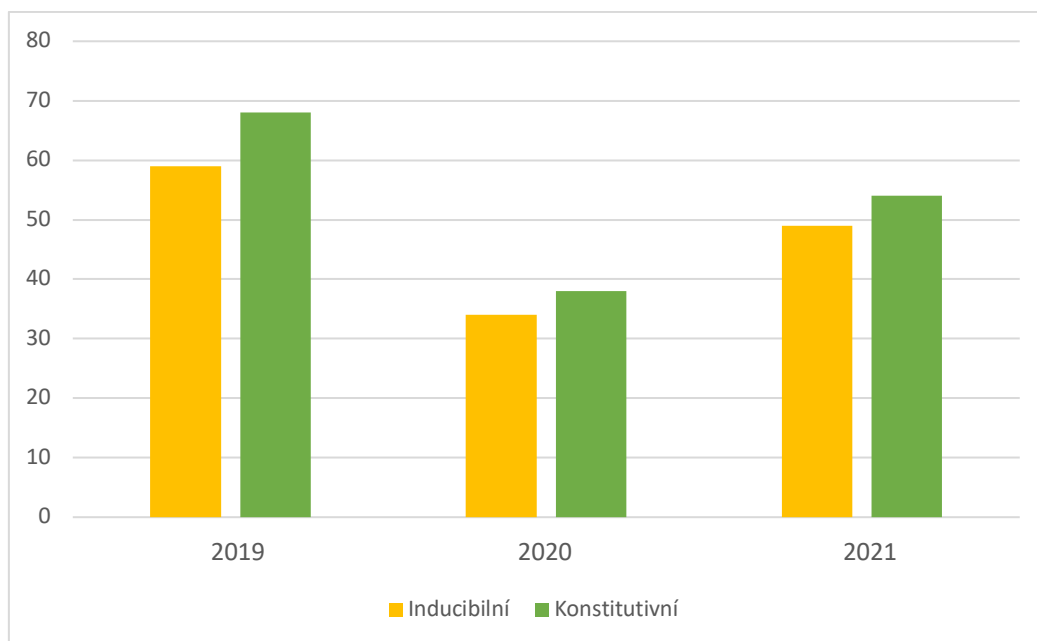
Mezi lety 2019–2021 byl pozorován pokles rezistentních kmenů *S. pyogenes* k makrolidům a linkosamidům ve FN Plzeň. V případě inducibilního fenotypu je každým rokem pozorován pokles až o polovinu. Konstitutivní fenotyp se pohybuje v průměru 10 případů ročně. V roce 2019 bylo z celkového počtu zachycených kmenů

68 % inducibilních fenotypů, 32 % bylo konstitutivního fenotypu. Oproti tomu v roce 2020 byl vyrovnaný počet fenotypů. Rok 2021 převažoval v konstitutivním fenotypu v poměru 2:1 k inducibilnímu fenotypu (Graf 1). Nejčastějším materiálem pro diagnostiku byly výtěry z krku.

*Tabulka 3: Přehled celkových počtů zachycených kmenů u *S. dysgalactiae* vykazujících konstitutivní nebo inducibilní MLSB rezistenci*

	2019	2020	2021	Celkem
Celkový počet	127	72	103	302
Inducibilní fenotyp	59	34	49	142
Konstitutivní fenotyp	68	38	54	160

*Graf 2: Grafické zpracování počtů detekovaných kmenů u *S. dysgalactiae* vykazujících konstitutivní nebo inducibilní MLSB rezistenci*

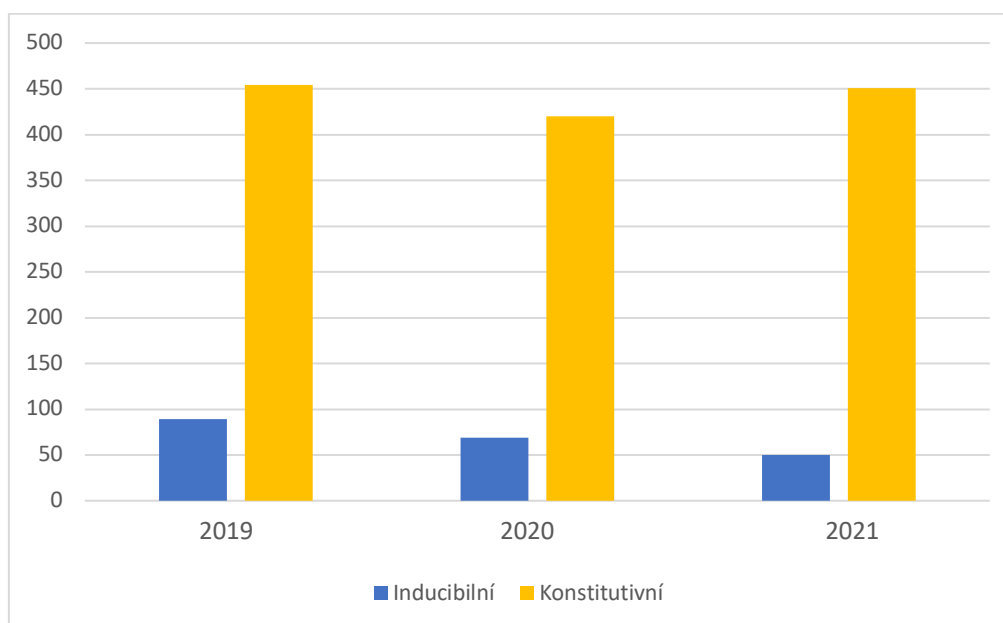


Jediným rokem, kdy byl zaznamenán mírný pokles v konečném součtu záchytu kmenů *S. dysgalactiae* rezistentních na erytromycin a klindamycin, je rok 2020. To samé platí pro konstitutivní fenotyp, který se dostal na 38 případů za tento rok. Naopak nejvíce diagnostikovaných pacientů s indukovaným i konstitutivním fenotypem byl zaznamenán v roce 2019, který svými 127 případy přispěl velkou mírou na celkový počet 302 za celé zkoumané období. Rok 2021 z celkového počtu 103 případů měl lehkou převahu konstitutivního fenotypu (52 %), dalších 48 % náleželo inducibilnímu fenotypu (Graf 2). Materiály pro diagnostiku *S. dysgalactiae* byly nejčastěji stěry, výtěry z krku či vředů.

Tabulka 4: Přehled celkových počtů zachycených kmenů u S. agalactiae vykazujících konstitutivní nebo inducibilní MLSB rezistenci

	2019	2020	2021	Celkem
Celkový počet	543	489	501	1533
Inducibilní fenotyp	89	69	50	208
Konstitutivní fenotyp	454	420	451	1325

Graf 3: Grafické zpracování počtů detekovaných kmenů u S. agalactiae vykazujících konstitutivní nebo inducibilní MLSB rezistenci



V období 2019-2021 bylo zachyceno celkem 1533 případů záchytu *S. agalactiae*. Z tohoto celkového počtu jich většina vykazovala konstitutivní typ rezistence k makrolidům a linkosamidů. V roce 2019, kdy byl nejvíce zastoupen inducibilní fenotyp kmene *S. agalactiae* a to v 16,4 % (n = 89) z celkového počtu. Zbýlých 83,9 % (n = 543) bylo konstitutivního fenotypu. Nejnižší záchyt byl v roce 2020, kdy bylo v konečném součtu o 54 případů méně. U jednotlivých fenotypů se vyskytuje pokles z předchozího roku o 20 případů. V roce 2021 nastal opět vzestup případů až na celkových 501. Záchyt konstitutivního fenotypu se podobá číslům z roku 2019 a v případě inducibilního fenotypu je ze všech tří let nejvyšší (n = 50). *S. agalactiae* byl nejčastěji detekován z materiálů z pochvy, abscesů či výtěru z krku.

14 DISKUZE

Cílem této práce bylo shrnout problematiku týkající se bakteriálních rezistencí, které neustále narůstají. V praktické části jsem se věnovala grampozitivním bakteriím (streptokokům) rezistentním k erytromycinu a klindamycinu (MLS_B rezistence).

MLS_B rezistence je v této době nejvíce spokojována s kmeny *Staphylococcus* spp. nebo *Streptococcus* spp. Antibiotická léčba onemocnění, která jsou způsobena zmíněnými bakteriemi, je ztížena a je nutno zvážit alternativní postupy.

Druhým cílem práce bylo se seznámit s laboratorní diagnostikou MLS_B rezistence. Zde jsem postupovala dle návodu přípravy rutinní diskové difuzní metody a provedla D-test u testovaných kmenů *Streptococcus* spp. Prvním testovaným kmenem byl *Streptococcus dysgalactiae* bez MLS_B rezistence, citlivý ke všem testovaným antibiotikům. Dalším kmenem byl *S. agalactiae* vykazující konstitutivní typ MLS_B rezistence s rezistencí k erytromycinu a klindamycinu. Lékem volby je tedy penicilin, na který byl kmen *Streptococcus agalactiae* citlivý. Konstitutivní fenotyp byl laboratorně diagnostikován u kmene *Streptococcus pyogenes*. Zde je k léčbě možné použít pouze penicilin.

V letech 2019-2021 bylo ve FN v Plzni vyšetřeno celkem 1838 izolátů kmenů *Streptococcus* spp., u nichž převládal konstitutivní fenotyp MLS_B rezistence. Nejvíce se vyskytující bakterií, u které se vyskytla MLS_B rezistence byl *Streptococcus agalactiae*, který je častou příčinou neonatálních sepsí. Nejméně z celkového počtu byl staticky zaznamenán kmen *Streptococcus pyogenes*, který je hlavním zdrojem infekcí dýchacích cest a u nějž jako jediné grampozitivní bakterie převládal inducibilní fenotyp rezistence k makrolidovým antibiotikům. *Streptococcus dysgalactiae* je zdrojem akutních infekcí. Také u něj převažoval konstitutivní fenotyp, ale ne v takovém měřítku jako u *S. pyogenes*. Tento trend je podobný tomu celosvětovému, avšak celkové počty v České republice i ve světě nejsou známy. Neexistuje žádná studie, která by se touto problematikou zabývala. Jsou dostupné pouze výzkumy z jednotlivých zemí světa. Například studie z roku 2006 monitoruje MLS_B rezistenci v Japonsku, kde bylo snahou pomocí PCR odlišit geny *erm* u MRSA a MSSA. Převládal opět konstitutivní fenotyp MLS_B rezistence.

15 ZÁVĚR

V bakalářské práci jsem shrnula mechanismy vedoucí k časté bakteriální rezistenci k antibiotikům. Dále jsem se zabývala laboratorní diagnostikou citlivostí k ATB, která neodmyslitelně patří k monitoraci léčby ATB a je důležitou součástí mikrobiologických laboratoří.

Dle výroční zprávy ECDC z března 2022 byl zaznamenán pokles spotřeby antibiotik zejména během koronavirové pandemie. Během let 2019-2020 klesla spotřeba o téměř 18 %. I přes tato prognostická data jsou dále nadužívána širokospektrá antibiotika a vznik rezistence nadále důležitým tématem.

Díky své bakalářské práci si myslím, že antimikrobiální léky i nadále zůstávají velmi důležitou součástí bakteriální léčby. Nicméně je vhodné ATB indikovat s opatrností a rozvahou zejména u hospitalizovaných a imunokompromitovaných jedinců. Za velmi důležité pokládám šířit osvětu o ATB v široké veřejnosti, aby tento celosvětový problém nebyl brán laickou veřejností na lehkou váhu.

SEZNAM LITERATURY

- 1 VENTOLA, C. Lee. *The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. Pharmacy and therapeutics*, 2015, 40.4: 277-283.
- 2 WORLD HEALTH ORGANIZATION, et al. *Antibiotic resistance: Multi-country public awareness survey. 2015.*
- 3 SPÍŽEK, Jaroslav. *Rezistence na antibiotika. Vesmír*, 1999, 78: 27-32.
- 4 HURYCH, Jakub a Roman ŠTÍCHA. *Lékařská mikrobiologie. 2020. Praha: Triton, 2019.*
- 5 ADÁMKOVÁ, MUDr Václava, et al. *Antibiotická léčba. Medicína pro praxi*, 2015, 12.5: 227-230.
- 6 PANKEY, George A.; SABATH, L. D. *Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. Clinical infectious diseases*, 2004, 38.6: 864-870.
- 7 BUI, Toai; PREUSS, Charles V. *Cephalosporins. StatPearls [Internet]*, 2021.
- 8 JIŘÍ, Beneš. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití. Grada Publishing as, 2018.*
- 9 BARER, Michael R.; IRVING, Will L. *Medical Microbiology E-Book: A Guide to Microbial Infections. Elsevier Health Sciences, 2018.*
- 10 GOERING, Richard, et al. *Mims' Medical Microbiology. Elsevier Health Sciences, 2018.*
- 11 ŠTEFAN, Marek. *Antibiotika v klinické praxi. Galén, 2019.*
- 12 FÁBREGA, Anna, et al. *Mechanism of action of and resistance to quinolones. Microbial biotechnology*, 2009, 2.1: 40-61.
- 13 SARKAR, Paramita, et al. *A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics. Medchemcomm*, 2017, 8.3: 516-533.
- 14 SILVERMAN, Jared A.; PERLMUTTER, Nancy G.; SHAPIRO, Howard M. *Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in Staphylococcus aureus. Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2003, 47.8: 2538-2544.
- 15 FYFE, Corey, et al. *Resistance to macrolide antibiotics in public health pathogens. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2016, 6.10: a025395.
- 16 FERNÁNDEZ-VILLA, Daniel; AGUILAR, Maria Rosa; ROJO, Luis. *Folic acid antagonists: antimicrobial and immunomodulating mechanisms and applications. International journal of molecular sciences*, 2019, 20.20: 4996.
- 17 EGOROV, A. M.; ULYASHOVA, M. M.; RUBTSOVA, M. Yu. *Bacterial enzymes and antibiotic resistance. Acta Naturae*, 2018, 10.4 (39): 33-48.

- 18 MUNITA, Jose M.; ARIAS, Cesar A. *Mechanisms of antibiotic resistance. Microbiology spectrum*, 2016, 4.2: 4.2. 15.
- 19 SANTAJIT, Sirijan; INDRAWATTANA, Nitaya. *Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. BioMed research international*, 2016, 2016.
- 20 CETINKAYA, Yesim; FALK, Pamela; MAYHALL, C. Glen. *Vancomycin-resistant enterococci. Clinical microbiology reviews*, 2000, 13.4: 686-707.
- 21 BAI, Jinna, et al. *The role of ArlRS in regulating oxacillin susceptibility in methicillin-resistant Staphylococcus aureus indicates it is a potential target for antimicrobial resistance breakers. Emerging microbes & infections*, 2019, 8.1: 503-515.
- 22 LECLERCQ, Roland. *Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clinical infectious diseases*, 2002, 34.4: 482-492.
- 23 ELIOPOULOS, George M.; MEKA, Venkata G.; GOLD, Howard S. *Antimicrobial resistance to linezolid. Clinical Infectious Diseases*, 2004, 39.7: 1010-1015.
- 24 KREJČÍ, Eva, et al. *Vzrůstající rezistence k antibiotikům a racionální antibiotická terapie. Medicína pro praxi*, 2020, 17.1: 8-12.
- 25 URBÁŠKOVÁ, Pavla; ŽEMLIČKOVÁ, Helena; HRABÁK, Jaroslav. *Jaké breakpointy používat pro interpretaci výsledků vyšetření citlivosti bakterií k antibiotikům. Zprávy epidemiologie a mikrobiologie*, 2010, 19.9: 266-267.
- 26 JINDRÁK, Vlastimil; HEDLOVÁ, Dana; URBÁŠKOVÁ, Pavla. *Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici. Mladá fronta*, 2014.
- 27 KHAN, Zeeshan A.; SIDDIQUI, Mohd F.; PARK, Seungkyung. *Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing. Diagnostics*, 2019, 9.2: 49.
- 28 ZENG, Ximin; LIN, Jun. *Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. Frontiers in microbiology*, 2013, 4: 128.
- 29 WILEY, Paul F., et al. *Erythromycin. x. I structure of erythromycin. Journal of the American Chemical Society*, 1957, 79.22: 6062-6070.
- 30 SHARMA, Prabodh Chander, et al. *Ciprofloxacin: review on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 2010, 25.4: 577-589.
- 31 HILAL-DANDAN, R.; BRUNTON, L. *Goodman and Gilman Manual of Pharmacology and Therapeutics*, 2. McGraw Hill Professional, Philadelphia, 2013.
- 32 NEGREI, Carolina; BODA, Daniel. *The Mechanisms of action and resistance to fluoroquinolone in Helicobacter pylori Infection. Roesler. Trends in Helicobacter pylori Infection BM editor. IntechOpen*, 2014, 349.
- 33 GARNEAU-TSODÍKOVÁ, Sylvie; LABBY, Kristin J. *Mechanismy rezistence k aminoglykosidovým antibiotikům: přehled a perspektivy. Medchemcomm*, 2016, 7.1: 11-27.

34 *Surveillance Atlas of Infectious Diseases [online]. Ecdc, 2020. Dostupné z: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4>*

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Obecná chemická struktura β -laktamových ATB ²⁸	17
Obrázek 2: Obecná chemická struktura erytromycinu ²⁹	18
Obrázek 3: Obecná chemická struktura klindamycinu ⁸	19
<i>Obrázek 4: Obecná chemická struktura ciprofloxacinu ³⁰</i>	<i>21</i>
Obrázek 5: Obecná chemická struktura tetracyklinu ¹⁰	21
Obrázek 6: Srovnání struktury buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií	22
Obrázek 7: Stavba ribozomu a místo působení makrolidů ³¹	25
Obrázek 8: Mechanismus účinku fluorochinolonů ³²	26
Obrázek 9: Mechanismy rezistence antibiotik ³³	30
Obrázek 10: Zastoupení MRSA kmenů v invazivních klinických materiálech v Evropě k roku 2020 ³⁴	34
Obrázek 11: Zastoupení VRE kmenů v invazivních klinických materiálech v Evropě k roku 2020 ³⁴	35
Obrázek 12: Disková difuzní metoda pro detekci MLSB rezistence	42
Obrázek 13: <i>S. dysgalactiae</i> bez MLSB rezistence – citlivý k P, DA i CLI.	43
Obrázek 14: Konstitutivní typ MLSB rezistence u <i>S. agalactiae</i>	44
Obrázek 15: Inducibilní typ MLSB rezistence u <i>S. pyogenes</i>	45

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Klasifikace efluxních pump ⁸	32
Tabulka 2: Přehled celkových počtů zachycených kmenů u <i>S. pyogenes</i> vykazujících konstitutivní nebo inducibilní MLSB rezistenci.....	46
Tabulka 3: Přehled celkových počtů zachycených kmenů u <i>S. dysgalactiae</i> vykazujících konstitutivní nebo inducibilní MLSB rezistenci.....	47
Tabulka 4: Přehled celkových počtů zachycených kmenů u <i>S. agalactiae</i> vykazujících konstitutivní nebo inducibilní MLSB rezistenci.....	48

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Grafické zpracování počtů detekovaných kmenů <i>S. pyogenes</i> vykazující konstitutivní nebo inducibilní MLSB rezistenci.....	46
Graf 2: Grafické zpracování počtů detekovaných kmenů u <i>S. dysgalactiae</i> vykazujících konstitutivní nebo inducibilní MLSB rezistenci.....	47
Graf 3: Grafické zpracování počtů detekovaných kmenů u <i>S. agalactiae</i> vykazujících konstitutivní nebo inducibilní MLSB rezistenci.....	48

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – Povolení sběru informací ve Fakultní nemocnici v Plzni

PŘÍLOHY

Příloha A – Povolení sběru informací ve Fakultní nemocnici v Plzni



Vážená paní
Michaela Buchlovská
Studentka oboru *Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví*
Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchránářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví
Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných dat a výsledků laboratorních metod, používaných v *Ústavu mikrobiologie (MIKRO) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem *„Mechanismy rezistence k vybraným skupinám antibiotik“*.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vrchní zdravotní laborantka MIKRO souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.**
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe a **pod přímým vedením** oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je paní ***Chudějová Kateřina, Mgr., Ph.D., odborný pracovník v laboratorních metodách a přípravě léčivých přípravků MIKRO FN Plzeň.***

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová
manažerka pro vzdělávání a výkonu NELZP
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň
tel. 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chabrovass@fnplzen.cz

29. 11. 2021