



Průkaz beta-laktamáz širokého spektra (ESBL) a typu AmpC u enterobakterií

A. Definice

- **Širokospektré b-laktamázy - ESBL** (extended-spectrum b-lactamases) jsou enzymy produkované některými mikroby, které hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny všech generací a monobaktamy. Jsou inhibovány inhibitory b-laktamáz (např. klavulanovou kyselinou), nehydrolyzují karbapenemy a obvykle ani cefamyciny (např. cefoxitin).
- **b-laktamázy typu AmpC** jsou řadou mikrobů produkovány inherentně (např. druhy *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Serratia* spp.). Hydrolyzují peniciliny, cefamyciny, většinu cefalosporinů a monobaktamy, nehydrolyzují karbapenemy a nejsou inhibovány inhibitory b-laktamáz (např. klavulanovou kyselinou).

B. Klinické a epidemiologické důsledky produkce b-laktamáz

- **Efekt inokula buněk.** Při vyšetření citlivosti producentů ESBL diluční metodou nebo diskovou difusní metodou v rutinním uspořádání (které vyžaduje koncentraci inokula buněk bakterií zhruba 10^5 buněk/ml), se mohou některé cefalosporiny *in vitro* falešně jevit jako citlivé. Při probíhající infekci je však přítomna vysoká koncentrace buněk původce ($> 10^5$ buněk/ml), která produkuje enzym v množství postačujícím k inaktivaci cefalosporinů a selhání léčby [1].
- **Význam inducibilní produkce enzymu.** Většina chromozomálních AmpC je inducibilních. Znamená to, že příslušný gen (např. bla_{DHA} , bla_{CMY} , bla_{MIR}) není v běžných podmínkách exprimován, hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) nebo inhibiční zóny většiny b-laktamových antibiotik jsou v kategorii citlivosti, a také v klinické praxi je kmen k příslušným cefalosporinům citlivý. K indukci produkce AmpC dochází při kontaktu s některými antibiotiky (cefoxitin, imipenem) nebo inhibitory b-laktamáz (především klavulanovou kyselinou) [2, 3, 4]. Předpokládá se, že tato indukce je vyvolána specifickou interakcí induktoru s proteiny vážícími peniciliny (PBP), s následným spuštěním signální cesty, která vede k expresi daného genu. Expozice b-laktamovým antibiotikům, např. při jejich léčebné aplikaci, může způsobit selekci mutant, u nichž došlo k derepresi genu *ampC* těchto b-laktamáz [4]. Mutanty hyperprodukcující b-laktamázu jsou obvykle rezistentní k většině penicilinů, cefalosporinů a aztreonamu. Citlivost zůstává zachována ke karbapenemům a *in vitro* obvykle také k cefalosporinům 4. generace (cefepim, cefpirom) [4], stejně jako u ESBL se však při léčebné aplikaci těchto antibiotik může uplatnit efekt inokula [1].
- **Z epidemiologického hlediska** představují oba typy rezistence vysoké riziko, neboť se mohou rychle šířit. Rychlejší horizontální šíření b-laktamáz zprostředkovávají transpozony nebo integrony, klony rezistentních kmenů se šíří vertikálně. Integrony v genových kazetách obvykle sdružují kromě genů



b-laktamáz také geny determinující rezistenci k aminoglykosidům, chloramfenikolu, rifampicinu, sulfonamidům, případně i k dalším antibiotikům [4, 5]. Frekvence výskytu kmenů se získanou rezistencí k b-laktamovým antibiotikům v důsledku produkce inaktivujících enzymů ESBL nebo AmpC je rozdílná v závislosti na druhu enterobakterie, na typu nemocničního zařízení, významné rozdíly jsou mezi odděleními jedné nemocnice, mezi nemocnicemi, zeměmi a kontinenty. V České republice (ČR) se sleduje rezistence k cefalosporinům se širokým spektrem účinku u izolátů z krve pacientů s bakteriemi způsobenou *E. coli* nebo *Klebsiella pneumoniae*. V roce 2005 bylo v ČR podle EARSS Annual Report rezistentních k cefalosporinům 3. generace (cefotaximu nebo ceftazidimu) zhruba 3 % izolátů *E. coli* a 32 % izolátů *K. pneumoniae* z krve; z toho tvořili producenti ESBL 2 %, respektive 20 % izolátů [6].

C. Detekce ESBL

- Průkaz širokospektrých b-laktamáz využívá inhibici hydrolýzy antibiotika klavulanovou kyselinou.

C.1. Vyhledávání kmenů produkujících ESBL [7]

- Pro základní skrínění producentů ESBL lze použít metodu vyhledávání podle průměru inhibičních zón (IZ) okolo disků, nebo podle hodnot minimálních inhibičních koncentrací (MIC) indikátorových b-laktamových antibiotik. Kmen podezřelý z produkce ESBL je takový, který má alespoň jednu hodnotu IZ nižší (nebo MIC vyšší), než je hodnota hraniční. Disková citlivost a stanovení MIC se provádí standardními postupy [8]. Hraniční hodnoty pro diskovou citlivost jsou 17 mm pro cefpodoxim, 22 mm pro ceftazidim a 27 mm pro aztreonam a cefotaxim; hraniční hodnoty MIC jsou 8 mg/l pro cefpodoxim a 1 mg/l pro ceftazidim, aztreonam a cefotaxim [7].

C.2. Konfirmační metoda CLSI* [7]

- Tato metoda využívá srovnání průměru inhibičních zón, které vytváří testovaný kmen na Mueller-Hinton agaru okolo disků s určitým cefalosporinem a okolo disku obsahujícím kombinaci téhož cefalosporinu s klavulanovou kyselinou. Je-li rozdíl průměru inhibičních zón větší než 5 mm (větší zóna musí být vždy u disku s kombinací), je kmen hodnocen jako producent ESBL.

Metoda platí jen pro druhy *Klebsiella* spp., *Escherichia coli* a *Proteus mirabilis*. Vzhledem k mechanickému pojetí je zatížena statistickou chybou.

* Clinical Laboratory Standard Institute, USA

C.3. Metoda DDST** [5, 9, 10]

- Metoda je založena na principu detekce deformace inhibičních zón, které vytváří testovaný kmen na Mueller-Hinton agaru mezi disky s cefalosporin a aztreonamem, a diskem s amoxicilinem/klavulanovou kyselinou. Vzdálenost disků je v rozmezí 20 - 30 mm od středů, podle testovaného druhu a zkušenosti laboratoře. Doporučené kombinace a rozložení disků ukazuje obrázek 1.



** Double Disk Synergy Test

C4. Rychlá detekce ESBL.

- Výsledky produkce ESBL jsou k dispozici nejdříve za 2 dny po indikaci vyšetření citlivosti, čili za jeden den po odečtení MIC nebo průměrů inhibičních zón. V rutinní praxi mikrobiologické laboratoře lze však zhruba 90% producentů ESBL odhalit za jeden den (zhruba za 18 hod), současně s odečtením výsledků vyšetření citlivosti ostatních antibiotik. Postupuje se jako u metody DDST s tím rozdílem, že inokulum vyšetřovaného kmene se naočkuje roztěrem na 1/2 Mueller-Hinton agaru, na kterou se umístí tři disky, obvykle ceftazidim, kombinace amoxicilinu s klavulanovou kyselinou a cefotaxim. Na druhé polovině plotny se stejným způsobem vyšetří další kmen. Je-li následující den výsledek negativní, postupuje se podle odstavce C1. Podrobný postup vyšetření je uveden v grafu 1.

D. Detekce AmpC [3]

- Pro detekci inducibilních enzymů typu AmpC lze použít totéž uspořádání jako pro metodu DDST při detekci ESBL. Klavulanová kyselina, obsažená v disku s amoxicilinem, je stejně dobrý induktor b-laktamázy AmpC, jako je cefoxitin nebo imipenem. Vzdálenost disků je v rozmezí 20-30 mm od středů.

E. Hodnocení výsledků

- **Metoda DDST** [5, 9, 10]

Producent ESBL vytváří zvětšenou inhibiční zónu, obvykle ve tvaru "zátky od šampaňského", kolem disku alespoň jednoho z antibiotik (aztreonamu, cefotaximu, ceftazidimu, cefepimu) na straně sousedící s diskem kombinace amoxicilin/klavulanová kyselina.

Producent inducibilní AmpC [3] vytváří deformovanou inhibiční zónu ve tvaru písmene D u aztreonamu nebo některého z cefalosporinů na straně sousedící s diskem kombinace amoxicilin/klavulanová kyselina (resp. cefoxitinu, nebo imipenemu).

Produkce ESBL může být skryta, pokud kmen současně produkuje AmpC. Pro průkaz ESBL je nutno produkci AmpC inhibovat (viz odstavec F).

- **Metoda CLSI** [7]

Producent ESBL vytváří inhibiční zóny mezi diskem s cefalosporinem a diskem obsahujícím kombinaci téhož cefalosporinu s klavulanovou kyselinou, pokud je rozdíl průměrů ≥ 5 mm ve prospěch disku s kombinací.



Producent inducibilní AmpC obvykle vytváří inhibiční zóny kolem disku kombinace cefalosporinu s klavulanovou kyselinou o menším průměru, než kolem disku se samotným cefalosporinem.

Produkce ESBL může být skryta, pokud kmen současně produkuje AmpC, a to i v případě, že se použije cefalosporin 4. generace a tentýž cefalosporin v kombinaci s klavulanovou kyselinou. Pro průkaz ESBL je nutno produkci AmpC inhibovat (viz odstavec F).

F. Detekce ESBL v přítomnosti AmpC

- Enzymy typu AmpC inhibuje kyselina boritá, kloxacilin, a další látky. Tyto inhibitory lze využít k selektivní inhibici enzymu AmpC [3].
- ESBL v přítomnosti AmpC lze detekovat na Mueller-Hinton agaru se 128 mg/l oxacilinu (viz tabulka 2). Další postup metody a hodnocení je shodné jako u průkazu ESBL (viz odstavec C a E a obrázek 1).
- Pokud je průměr inhibičních zón okolo disků na plotně s Mueller-Hinton agarem s oxacilinem větší, než na Mueller-Hinton agaru bez oxacilinu, jedná se o produkci enzymu typu AmpC.

G. Interpretace výsledků

- Charakteristické fenotypy citlivosti a rezistence lze rozeznat podle tvaru inhibičních zón kolem disků s b-laktamovými antibiotiky na půdě Mueller-Hinton agaru a na Mueller-Hinton agaru se 128 mg/l oxacilinu. Tabulka 3 uvádí citlivý fenotyp (3a) a pět fenotypů rezistence (3b-3f) k b-laktamovým antibiotikům u enterobakterií.
- Při interpretaci výsledků je také potřeba brát v úvahu deformace zón, které nejsou způsobeny producenty ESBL. Jedná se například o rozšíření inhibiční zóny okolo disku cefepimu směrem k disku s amoxicilinem s klavulanovou kyselinou, které je obvykle způsobeno enzymem SHV-1 u druhu *Klebsiella pneumoniae*. Tato zóna má charakteristický tvar, připomínající vajíčko ("egg-like") (Tabulka 3c).
- Druh *Klebsiella oxytoca* inherentně produkuje enzym K1, který je inhibován klavulanovou kyselinou. Hyperprodukce tohoto enzymu, která se při použití metody DDST jeví jako vajíčku podobné rozšíření inhibiční zóny u disků s cefalosporiny a/nebo s aztreonamem směrem k disku kombinace amoxicilin/klavulanová kyselina, může být chybně odečtena jako produkce ESBL [9].

Literatura

1. Queenan AM, Foleno B, Gownley C, Wira E, Bush K. Effects of inoculum and b-lactamase activity



in AmpC- and extended-spectrum b-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 269-275.

2. Coudron PE. 2005. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC b-lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4163-4167.
3. 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.
4. Livermore DM. b-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 557-584.
5. Bradford P. Extended-spectrum b-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933 - 951.
6. Urbášková P, Jakubů 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; v tisku.
7. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth informational supplement. CLSI Document M100-S-16, PA, USA; 2006.
8. Urbášková P. 1998. Rezistence bakterií k antibiotikům. Vybrané metody. Trios.
9. Livermore D, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 87-102.
10. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum b-lactamases: A clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 657-686.

Jaroslav Hrabák, Tamara Bergerová
Ústav mikrobiologie, LF UK a FN Plzeň

Václav Vaniš
Oddělení klinické mikrobiologie, Nemocnice Na Homolce, Praha

Pavla Urbášková
Národní referenční laboratoř pro antibiotika, CEM-SZÚ Praha



STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV

TABULKY A OBRÁZKY:

Obrázek 1. Doporučené uspořádání disků při metodě DDST, kombinované s metodou CLSI

Vysvětlivky a zkratky:

Metoda DDST : viz odstavec C3 v textu; metoda CLSI: viz odstavec C2 v textu; Kódové označení disků (obsah disku): AMC: kombinace amoxicilin/klavulanová kyselina. (20/10ug); AZT: aztreonam (30ug); CAZ: ceftazidim (30ug); CPD: cefpodoxim (10); CD: kombinace cefpodoxim/klavulanová kyselina (10/1ug); CTX: cefotaxim (30ug); FEP: cefepim (30ug).

Graf 1. Algoritmus průkazu ESBL a AmpC (kliknutím na obrázek jej zvětšíte)

Vysvětlivky a zkratky:

MHA: Mueller-Hinton agar; MHA+OXA: Mueller-Hinton agar s 128 mg/l oxacilinu

Kódové označení disků (obsah disku): AMC: kombinace amoxicilin/klavulanová kyselina. (20/10ug); AZT: aztreonam (30ug); CAZ: ceftazidim (30ug); CPD: cefpodoxim (10); CD: kombinace cefpodoxim/klavulanová kyselina (10/1ug); CTX: cefotaxim (30); FEP: cefepim (30ug).

Tabulka 1. Podmínky pro průkaz ESBL u enterobakterií

Půda	Mueller- Hinton agar
Objem inokula	2 - 5 ml ve fyziologickém roztoku
Příprava inokula	Přímá metoda roztěrem kolonií (z kultury na krevním agaru staré nejvýše 24 hod.)
Koncentrace inokula	0,5 dle McFarlandova zákalu (případně dále ředit 1:10 nebo 1:100); kolonie se mají okraji dotýkat, avšak nesplývat
Disky	Amoxicilin/kyselina klavulanová (20/10 ug), cefotaxim (30 ug), ceftazidim (30 ug), cefepim (30 ug), aztreonam (30 ug), cefpodoxim (30 ug), cefpodoxim/k. klavulanová (30/10 ug)
Uspořádání disků	Viz obrázek 1
Inkubace	35 °C +/- 2 °C v normální atmosféře
Pozitivní kontrola	Escherichia coli CNCTC 7374 (producent ESBL)



Tabulka 2. Podmínky pro průkaz ESBL v přítomnosti AmpC u enterobakterií.

Půda	Mueller-Hinton agar + 128 mg/l oxacilinu
Objem inokula	2 - 5 ml ve fyziologickém roztoku
Příprava inokula	Přímá metoda roztěrem kolonií (z kultury na krevním agaru staré nejvýše 24 hod.)
Koncentrace inokula	0,5 dle McFarlandova zákalu (případně dále ředit 1:10 nebo 1:100); kolonie se mají okraji dotýkat, avšak nesplyvat
Disky	Amoxicilin/kyselina klavulanová (20/10 ug), cefotaxim (30 ug), ceftazidim (30 ug), cefepim (30 ug), aztreonam (30 ug), cefpodoxim (30 ug), cefpodoxim/k. klavulanová (30/10 ug)
Uspořádání disků	Viz obrázek 1
Inkubace	35 °C +/- 2 °C v normální atmosféře
Pozitivní kontrola	Escherichia coli CNCTC 7376 (producent ESBL+AmpC)

Tabulka 3. Fenotypy rezistence k β-laktamovým antibiotikům u enterobakterií podle charakteru inhibičních zón

Fenotyp	Charakter inhibičních zón (IZ)	MHA	MHA + OXA
3.a. Bez produkce ESBL a AmpC	Nedeforované IZ, rozdíl průměru IZ u disku cefpodoximu a kombinace cefpodoxim/klavulanová k. je < 5 mm. Průměry IZ na MHA a MHA+OXA jsou shodné.	.	.
3.b. Produkce ESBL	Rozšíření IZ mezi disky amoxi-cilinu/klavulanové k. a cefalosporinů (aztreonamu) je zřetelné. Mezi IZ u disku cefpodoximu a kombinace cefpodoxim/klavulanová k. je rozdíl \approx 5 mm. IZ na MHA a MHA+OXA jsou podobné.	.	.
3.c. Produkce inducibilní AmpC	U disku aztreonamu je patrná typická IZ "D". Rozšíření mezi disky kombinace amoxicilin/ klavulanová k. a cefepimu nelze hodnotit jako produkci ESBL ("egg-like" IZ).	.	.
3.d. Hyperprodukce AmpC	Na MHA je IZ jen u disku cefepimu. Na plotně MHA+OXA s jsou IZ okolo cefalosporinů a azteronamu bez deformací.	.	.
3.e.		.	.



STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV

Hyperprodukce AmpC Na MHA je IZ jen u disku cefepimu. Produkci ESBL nelze hodnotit.

+ produkce ESBL Na MHA+OXA jsou deformace IZ ceftazidimu, cefotaximu a aztreonamu. Rozdíl IZ mezi cefpo-doximem a kombinací cefpodoxim/ klavulanová k. je signifikantní.

3.f.

Neenzymatický typ
rezistence (snížení
počtu pórů)

Nejsou vytvořeny IZ kolem disků na MHA, ani na MHA s oxacilinem.

Vysvětlivky: MHA - Mueller-Hinton agar; MHA+OXA: MHA se 128 mg/l oxacilinu; IZ - průměr inhibiční zóny kolem disku