

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

Detection of extended spectrum beta lactamases (ESBL) and AmpC type beta lactamases in enterobacteria

Jaroslav Hrabák, Václav Vaniš, Tamara Bergerová, Pavla Urbášková

A. DEFINICE

- **Širokospektré β -laktamázy – ESBL** (extended-spectrum β -lactamases) jsou enzymy produkované některými mikroby, které hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny všech generací a monobaktamy. Jsou inhibovány inhibitory β -laktamáz (např. klavulanovou kyselinou), nehydrolyzují karbapenemy a obvykle ani cefamyciny (např. cefoxitin).
- **β -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 β -laktamáz (např. klavulanovou kyselinou).

B. KLINICKÉ A EPIDEMIOLOGICKÉ DŮSLEDKY PRODUKCE β -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 β -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 β -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 β -laktamovým antibiotikům, např. při jejich léčebné aplikaci, může způsobit selekci mutantů, u nichž došlo k derepresi genu *ampC* těchto β -laktamáz [4]. Mutanty hyperprodukující β -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 β -laktamáz zprostředkovávají transpozony nebo integrony, klony rezistentních kmenů se šíří vertikálně. Integrony v genových kazelech obvykle sdružují kromě genů β -laktamáz také geny determinující rezistenci k aminoglykosidům, chloramfenikolu, rifampicinu, sulfonamidům, případně i k dalším antibiotikům [4, 5]. Frekvence výskytu kmenů se získanou rezistencí k β -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 [<http://www.rivm.nl/earss>] 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 β -laktamáz využívá inhibici hydrolýzy antibiotika klavulanovou kyselinou.

C.1. Vyhledávání kmenů produkujících ESBL [7]

- Pro základní skrining producentů ESBL lze použít metodu vyhledávání podle průměru inhibičních zón (IZ) okolo disků, nebo podle hodnot minimálních inhibičních koncentrací (MIC) indikátorových β -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 pro cefpodoxim ≤ 17 mm (≤ 22 mm u *Proteus mirabilis*), pro ceftazidim ≤ 22 mm a pro aztreonam a cefotaxim ≤ 27 mm; hraniční hodnoty MIC jsou pro cefpodoxim > 4 mg/l (> 1 mg/l u *P. mirabilis*) a pro ceftazidim, aztreonam a cefotaxim > 1 mg/l [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

* Clinical Laboratory Standard Institute, USA

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 mechanistickému pojetí je zatížena statistickou chybou.

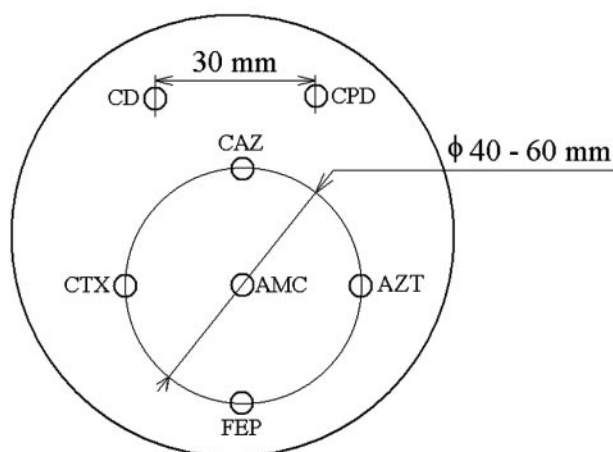
C.3. Metoda DDST** [5, 9, 10]

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

C.4. 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 průměru 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 rozřezem 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.

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. (20/10 µg); AZT: aztreonam (30 µg); CAZ: ceftazidim (30 µg); CPD: cefpodoxim (10 µg); CD: kombinace cefpodoxim/klavulanová kyselina (10/1 µg); CTX: cefotaxim (30 µg); FEP: cefepim (30 µg).

** Double Disk Synergy Test

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 β-laktamázy AmpC, jako je cefoxitin nebo imipenem. Vzdálenost disků je v rozmezí 20–30 mm od středu.

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 těchto cefalosporinů s klavulanovou kyselinou, pokud je rozdíl průměru ≥ 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).

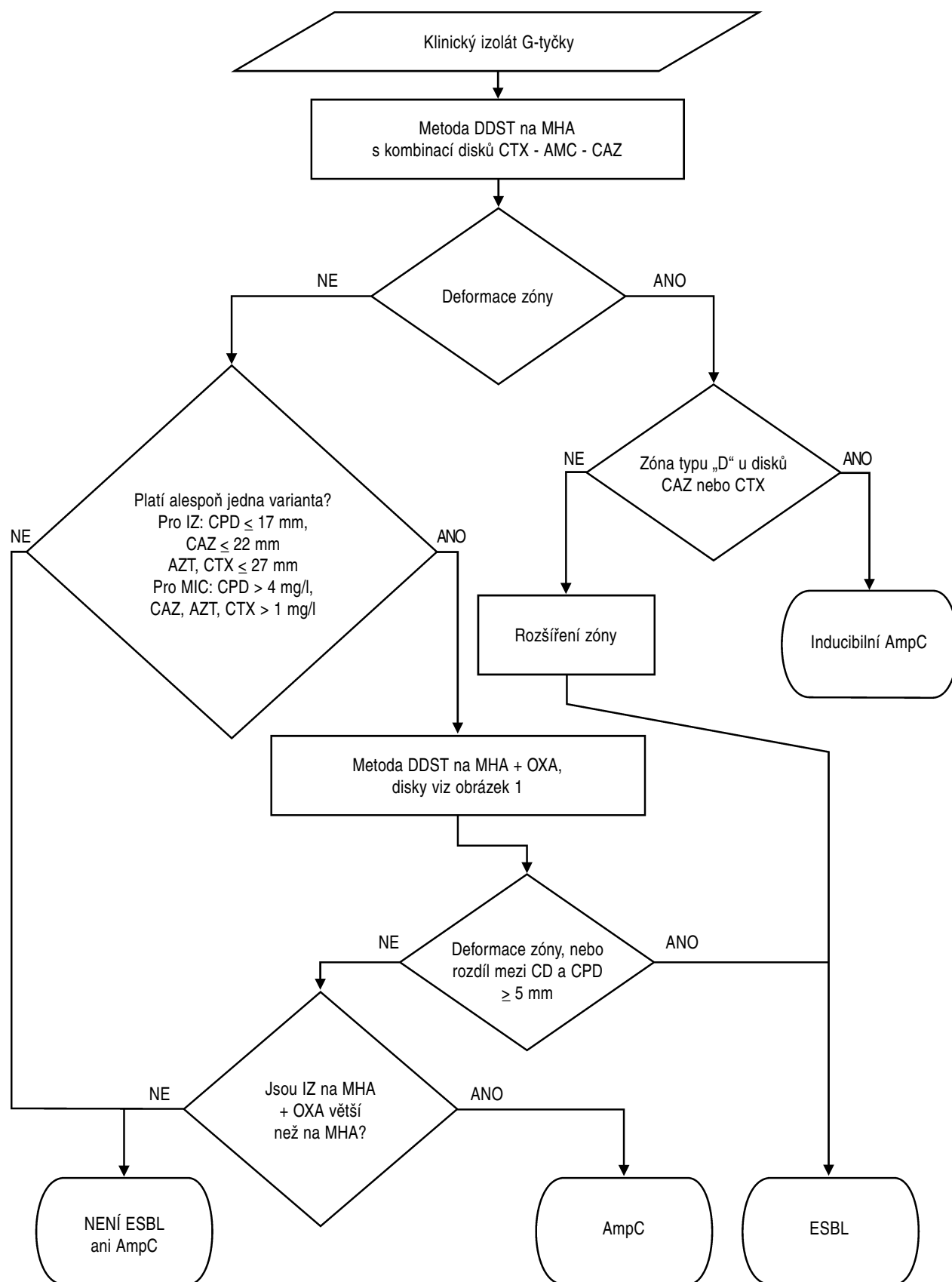
F. DETEKCE ESBL V PŘÍTOMNOSTI AmpC

- 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 β-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 re-

Graf 1: ALGORITMUS PRŮKAZU ESBL A AmpC



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 (20/10 µg); AZT: aztreonam (30 µg); CAZ: ceftazidim (30 µg);

CPD: cefpodoxim (10 µg); CD: kombinace cefpodoxim/klavulanová kyselina (10/1 µg); CTX: cefotaxim (30 µg); FEP: cefepim (30 µg).

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 nesplyvat
Disky	Amoxicilin/kyselina klavulanová (20/10 µg), cefotaxim (30 µg), ceftazidim (30 µg), cefepim (30 µg), aztreonam (30 µg), cefpodoxim (10 µg), cefpodoxim/k. klavulanová (10/1 µg)
Uspořádání disků	Viz obrázek 1
Inkubace	35 °C ± 2 °C v normální atmosféře
Pozitivní kontrola	<i>Escherichia coli</i> 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 µg), cefotaxim (30 µg), ceftazidim (30 µg), cefepim (30 µg), aztreonam (30 µg), cefpodoxim (10 µg), cefpodoxim/k. klavulanová (10/1 µg)
Uspořádání disků	Viz obrázek 1
Inkubace	35 °C ± 2 °C v normální atmosféře
Pozitivní kontrola	<i>Escherichia coli</i> CNCTC 7376 (producent ESBL+AmpC), nebo <i>Morganella morganii</i> CNCTC 7375* (producent ESBL+AmpC)

* podle zkušeností poskytuje spolehlivější výsledky

zistence (3b–3f) k β-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].

H. SDĚLOVÁNÍ VÝSLEDKŮ [5, 7, 9, 10]

- **Producent širokospektré β-laktamázy (ESBL)** je pokládán za rezistentní ke všem penicilinovým antibiotikům, monobaktamům (aztreonamu) a k cefalosporinům všech generací bez ohledu na výsledky minimální inhibiční koncentrace nebo diskové citlivosti Klinický účinek cefamycinu (cefoxitinu), a kombinace penicilínů s inhibitory β-laktamáz (kyselina klavulanová, sulbaktam, tazobaktam), je nejistý.

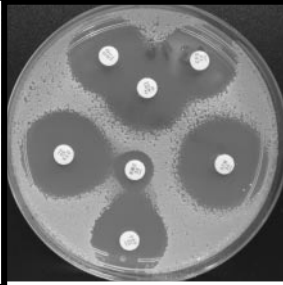
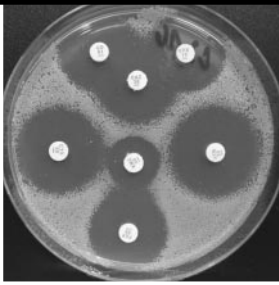
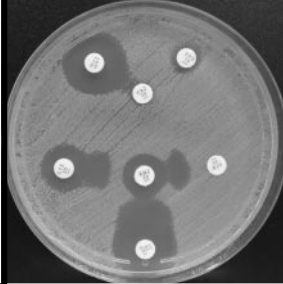
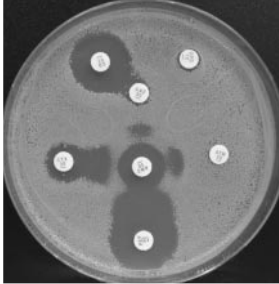
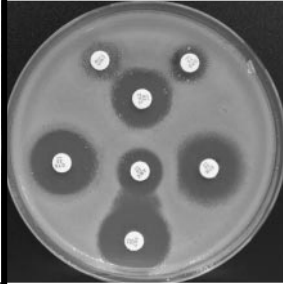
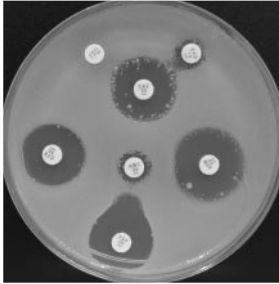
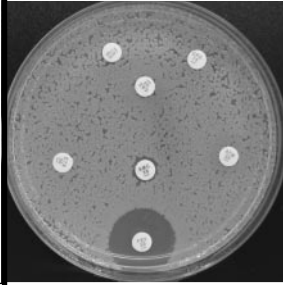
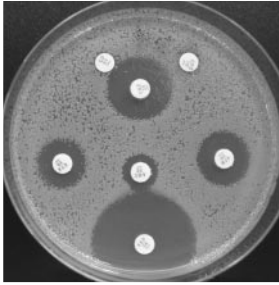
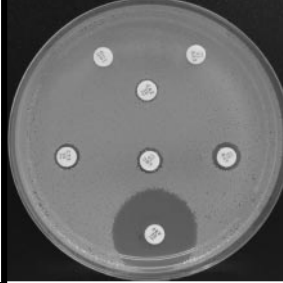
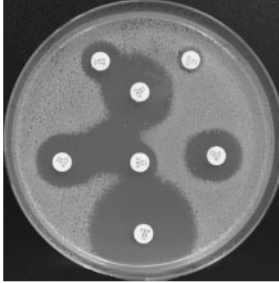
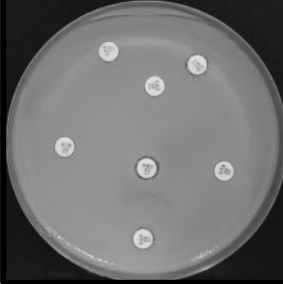
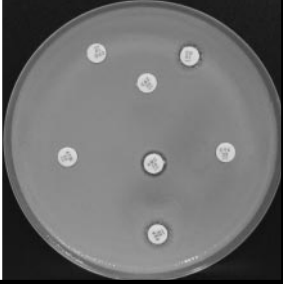
- **Producent β-laktamázy AmpC** je rezistentní k inhibitorům β-laktamáz, k cefamycinu a k většině cefalosporinů. Může být označen jako citlivý k cefalosporinům 4. generace pouze tehdy, neprodukuje-li ESBL a podle výsledků vyšetření citlivosti k cefepimu (cefpiromu) diskovou difúzní nebo diluční metodou je jednoznačně zařazen do citlivé kategorie.
- **Hyperproducent β-laktamázy K1** *K. oxytoca* je rezistentní k aztreonamu, cefalosporinům 1. generace a k cefuroximu a pokládá se za rezistentní také k cefotaximu. Může být označen jako citlivý k ceftazidimu a cefalosporinům 4. generace pouze v případě, neprodukuje-li β-laktamázy AmpC, respektive ESBL a podle výsledků vyšetření citlivosti k těmto antibiotikům diskovou difúzní nebo diluční metodou je jednoznačně zařazen do citlivé kategorie.

Metoda je zveřejněna na webových stránkách Centra epidemiologie a mikrobiologie SZÚ <http://www.szu.cz/cem/hpcem.htm> => Metody a diagnostika

LITERATURA

1. Queenan AM, Foleno B, Gownley C, Wira E, Bush K. Effects of inoculum and β-lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 269–275.

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	Nedeformované 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 amoxicilinu/klavulanové k. a cefalosporinů (aztreonamu) je zřetelné. Mezi IZ u disku cefpodoximu a kombinace cefpodoxim/klavulanová k. je rozdíl ≥ 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 aztreonamu bez deformací.		
3.e. Hyperprodukce AmpC + produkce ESBL	Na MHA je IZ jen u disku cefepimu. Produkci ESBL nelze hodnotit. Na MHA+OXA jsou deformace IZ ceftazidimu, cefotaximu a aztreonamu. Rozdíl IZ mezi cefpodoximem 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

2. Coudron PE. 2005. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β -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. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 557-584.
5. Bradford P. Extended-spectrum β -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 β -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