

Vliv rezistence *Pseudomonas aeruginosa* na antibioterapii

Milan Kolář, Miroslava Htoutou Sedláková, Markéta Šenkyříková, Vojtěch Hanulík, Pavel Honig

Ústav mikrobiologie, LF UP a FN Olomouc

K velmi důležitým bakteriálním patogenům, především v případě nosokomiálních infekcí, patří kmeny *Pseudomonas aeruginosa*. Frekvence tohoto species jako původce infekcí, včetně život ohrožujících, se zvyšuje a současně stoupá jeho odolnost k účinku antibiotické léčby. Cílem předložené práce bylo stanovení rezistence *Pseudomonas aeruginosa* k antibiotikům a analýza souboru meropenem-rezistentních izolátů. V období od 1. 1. 2008 do 30. 6. 2013 bylo izolováno celkem 11 342 kmenů *Pseudomonas aeruginosa* z klinického materiálu pacientů hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Olomouc a 1 341 kmenů v případě pacientů Vojenské nemocnice Olomouc. Rezistence k antimikrobiálním přípravkům byla stanovena standardní diluční mikrometodou. U 57 meropenem-rezistentních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* byla stanovena produkce metalo-beta-laktamáz, serinových karbapenemáz a AmpC enzymů fenotypovými i genotypovými metodami. Byla prokázána stoupající četnost kmenů *Pseudomonas aeruginosa* rezistentních k meropenemu a piperacilinu s tazobaktamem. U řady izolátů zůstala zachována citlivost pouze ke kolistinu a amikacinu. Produkce metalo-beta-laktamáz a serinových karbapenemáz nebyla prokázána a rezistence k meropenemu je podmíněna především produkcí AmpC a ztrátou stěnových porinů.

Klíčová slova: *Pseudomonas aeruginosa*, infekce, léčba.

Effect of *Pseudomonas aeruginosa* resistance on antibiotic therapy

Pseudomonas aeruginosa strains are among very important bacterial pathogens, particularly in the case of nosocomial infections. The frequency of this species as a causative agent of infections, including life-threatening ones, is increasing, and so is its resistance to the effect of antibiotic therapy. The aim of the present paper was to determine the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics and to analyze the group of meropenem-resistant isolates. In the period from 1 January 2008 to 30 June 2013, a total of 11,342 strains of *Pseudomonas aeruginosa* were isolated from the clinical material of patients hospitalized in the Olomouc University Hospital and another 1,341 strains were isolated in the case of patients from the Olomouc Military Hospital. Resistance to antimicrobial agents was assessed using the standard dilution micromethod. In 57 meropenem-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*, the production of metallo-beta-lactamases, serine carbapenemases, and AmpC enzymes was determined by means of both phenotype and genotype methods. An increasing frequency of *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to meropenem and piperacillin with tazobactam was demonstrated. In a number of isolates, sensitivity only to colistin and amikacin remained preserved. The production of metallo-beta-lactamases and serine carbapenemases was not confirmed, and resistance to meropenem is particularly related to the production of AmpC and the loss of the cell wall porins.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, infection, treatment.

Klin Farmakol Farm 2013; 27(3–4): 101–105

Úvod

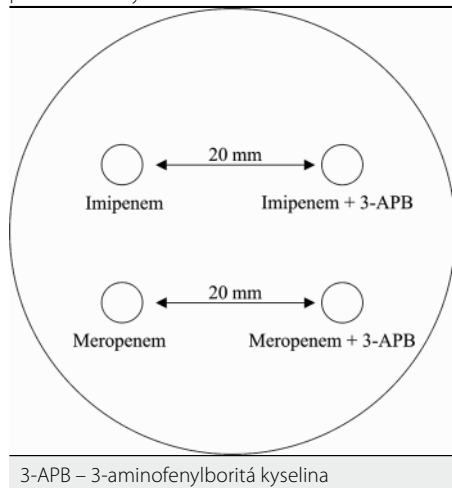
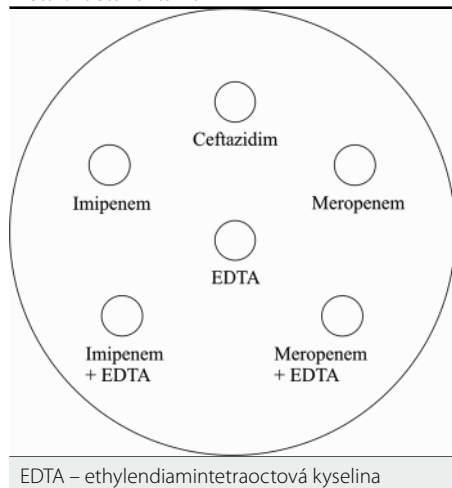
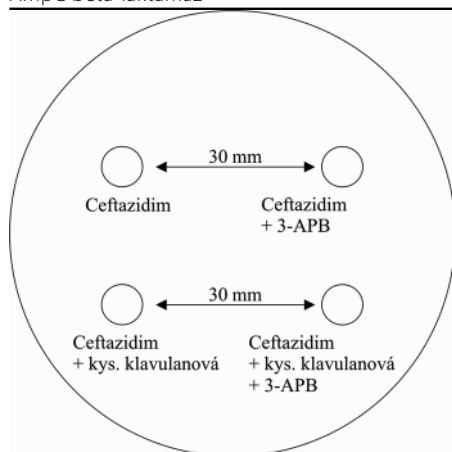
Bakteriální infekce patří k významným faktorům ovlivňujícím morbiditu a mortalitu, především u pacientů hospitalizovaných na jednotkách intenzivní péče (JIP). Nezbytnou součástí léčby je aplikace antibiotik, jejichž účinek je však limitován stoupající odolností bakteriálních patogenů. Důležitým faktorem ovlivňujícím strategii antibioterapie je dále měnící se zastoupení jednotlivých bakteriálních druhů u řady infekcí. Například u komplikujících infekcí pacientů s hematologickými malignitami do nedávné doby převažovaly grampozitivní bakterie, v posledních letech však stoupá význam gramnegativních bakterií (1, 2). Kolář et al. v multicentrické studii zahrnující 12 hematologických center České a Slovenské republiky dokumentují význam gramnegativních bakterií, které v případě primárně sterilních klinických materiálů (krev, sputum, moč) představují více jak 50 % izolátů,

příčemž k dominujícím bakteriím patří i kmeny *Pseudomonas aeruginosa* (3). Studie EPIC II uvádí, že u více jak poloviny pacientů na JIP byla prokázána infekce. Většina těchto infekcí (62 %) byla vyvolána gramnegativními bakteriemi, přičemž k nejčastějším původcům patřily enterobakterie a kmeny *Pseudomonas aeruginosa*, které často vykazovaly multirezistenci ke stávajícím antimikrobiálním léčivům (4).

Důležitým faktorem v šíření bakteriální rezistence je selekční tlak látek s antimikrobiální účinností. Následkem masivního používání širokospektrých penicilinů a cefalosporinů dochází k výraznému nárůstu bakteriální odolnosti k jejich účinku. Nejdůležitějším mechanismem rezistence je produkce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC (5). Vzhledem k jejich masivnímu rozšíření u enterobakterií způsobujících infekce, především u pacientů na JIP, se zvyšuje potřeba karbapenemů stále

dobře účinných na bakterie produkující uvedené enzymy. Negativním dopadem zvyšující se aplikace karbapenemů je však nárůst rezistence některých bakteriálních patogenů, například *Pseudomonas aeruginosa* (6).

Je nutné zdůraznit, že druh *Pseudomonas aeruginosa* patří k nejdůležitějším bakteriálním původcům nosokomiálních infekcí. Například Hanulík et al. za nejčastější etiologická agens nosokomiálních pneumonií ve Fakultní nemocnici Olomouc (FNOL) určili enterobakterie a kmeny *Pseudomonas aeruginosa*, které tvořily 75 % všech původců (7). Kmeny *Pseudomonas aeruginosa* se vyznačují vysokou rezistencí k antibiotikům a frekvence multirezistentních izolátů tohoto species se neustále zvyšuje. Tato skutečnost má důležitý klinický dopad ve stoupající morbiditě a mortalitě pseudomonádových infekcí. Téměř 90 % mortalita byla popsána u pacientů s těžce probíhající pneumonií způsobenou

Schéma 1. CD test k průkazu serinových karbapenemáz třídy A**Schéma 2.** Modifikovaný DDST pro detekci metalo-beta-laktamáz**Schéma 3.** Modifikovaný AmpC test pro detekci AmpC beta-laktamáz

Pseudomonas aeruginosa (8). Micek et al. uvádějí, že mortalita u pacientů s neadekvátní antibiotickou léčbou infekcí krevního řečiště vyvolanými kmeny *Pseudomonas aeruginosa* byla vyšší (31%) v porovnání s pacienty, u nichž antibioterapie byla adekvátní, resp. účinná (18%) (9). V práci Tumbarella et al., zaměřené na přežití pacientů s pseudomonádovou pneumonií na JIP, bylo potvrzeno, že inadekvátní iniciační antibioterapie

vedla k signifikantnímu prodloužení hospitalizace, délky umělé plicní ventilace a současně k vyšší mortalitě (10). Rovněž Giamarellos-Bourboulis et al. prokázali, že infekce multirezistentními kmeny *Pseudomonas aeruginosa* byly doprovázeny vyšší mortalitou než v případě infekcí způsobených citlivými izoláty (11).

Antibiotická léčba nozokomiálních infekcí, včetně pseudomonádových, musí být zahájena ihned po stanovení diagnózy. Základním zdrojem pro adekvátní volbu antibiotik je kvalifikovaný předpoklad dostatečné aktivity na nejčastější bakteriální původce podmíněný lokálními zdroji informací, především frekvencí bakteriálních patogenů a úrovní jejich rezistence k antibiotikům (12).

Cílem předložené práce bylo stanovení rezistence *Pseudomonas aeruginosa* k antibiotikům se zaměřením na rezistenci ke karbapenemům a definování možností antibiotické léčby pseudomonádových infekcí.

Metodika

V období od 1. 1. 2008 do 30. 6. 2013 byly z klinického materiálu (tracheální endosekret, bronchoalveolární laváž, sputum, krev, moč, hnis, punktát, sekret z rány, hemokultura) pacientů hospitalizovaných ve FNOL a Vojenské nemocnici Olomouc (VNOL) izolovány kmeny *Pseudomonas aeruginosa*.

Každý izolát byl identifikován standardními mikrobiologickými postupy, včetně využití systému MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics). Výběr kmenů byl realizován tak, že od jednoho pacienta byl zařazen vždy jen jeden kmen *Pseudomonas aeruginosa*, který byl izolován jako první.

Rezistence k antimikrobiálním přípravkům byla stanovena standardní diluční mikrometodou podle kritérií EUCAST (13). Referenční kmeny *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218 a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sloužily k protokolované kontrole kvality.

U kmenů *Pseudomonas aeruginosa* s minimální inhibiční koncentrací meropenemu přesahující 2 mg/l, izolovaných v průběhu tří měsíců (od 1. 11. 2012 do 31. 1. 2013), byla provedena analýza na průkaz metalo-beta-laktamáz, serinových karbapenemáz, AmpC enzymů a stanovení jejich klinická významnost. K fenotypovému průkazu produkce karbapenemáz byl použit modifikovaný Hodgeho test, CD test (schéma 1) pro detekci serinových karbapenemáz a mDDST k průkazu metalo-beta-laktamáz (schéma 2) za použití EDTA (14, 15). K průkazu AmpC byl použit modifikovaný AmpC test (schéma 3) (16).

K detekci genů kódujících produkci metalo-beta-laktamáz a serinových karbapenemáz

byla použita polymerázová řetězová reakce. Byla zvolena sada specifických oligonukleotidových primerů kódujících nejčastěji se vyskytující serinové karbapenemázy patřící do třídy A (NMC, SME, IMI, KPC a GES typy), třídy D (OXA-23 a OXA-48) a metalo-beta-laktamázy (IMP, VIM, SIM typy) (17–25). Jako pozitivní kontrola byl použit kmen se známým zastoupením karbapenemáz (produkující KPC-2 enzym) poskytnutý Ing. J. Hrabákem, Ph.D., z Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty UK v Plzni.

Výsledek

V uvedeném období bylo izolováno celkem 11 342 kmenů *Pseudomonas aeruginosa* z klinického materiálu pacientů hospitalizovaných ve FNOL a 1 341 kmenů v případě pacientů VNOL. Tabulky 1 a 2 dokumentují rezistenci k antimikrobiálním přípravkům.

Z výsledků je zřejmé, že prevalence kmenů rezistentních k beta-laktamovým antibiotikům ve FNOL se v roce 2013 pohybuje v rozmezí od 28 % (ceftazidim) do 43 % (meropenem), ve VNOL jsou tyto hodnoty ještě vyšší (38 %, 56 %). Neméně znepokojující je rezistence k dalším antimikrobiálním přípravkům, v případě ciprofloxacinu 45 % ve FNOL a 57 % ve VNOL; u gentamicinu 33 % v obou zdravotnických zařízeních.

Dalším alarmujícím faktem je vzrůstající trend rezistence, který je patrný zejména u meropenemu (ve FNOL z 30 % v roce 2008 na 43 % v roce 2013, ve VNOL ze 46 na 56 %) a piperacilinu s tazobaktamem (z 6 na 37 %, resp. ze 7 na 46 %). Dobrou citlivost si kmeny *Pseudomonas aeruginosa* zachovávají pouze k amikacinu a kolistinu (5 %, resp. 0 % v obou sledovaných nemocnicích v první polovině roku 2013).

V uvedeném tříměsíčním období bylo identifikováno celkem 57 meropenem-rezistentních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* od pacientů hospitalizovaných ve FNOL a VNOL. Produkce metalo-beta-laktamáz a serinových karbapenemáz nebyla prokázána a rezistence k meropenemu byla podmíněna především produkcí AmpC a ztrátou stěnových porinů.

Meropenem-rezistentní kmeny byly nejčastěji izolovány z endosekretu (30 %) a moči (20 %). V 32 případech (56 %) se jednalo o pacienty s pneumoniemi, u 8 pacientů (14 %) byla diagnostikována uroinfekce, u 3 (5 %) infekce v místě operačního výkonu, jiná diagnóza byla stanovena u 14 (25 %) nemocných.

Diskuze

Nezbytným předpokladem pro stanovení základních schémat antibiotické léčby nozoko-

Tabulka 1. Rezistence *Pseudomonas aeruginosa* k antimikrobiálním přípravkům ve FNOL (v procentech)

Antibiotikum	Rok (celkový počet testovaných kmenů)					
	2008 (2070)	2009 (2055)	2010 (1892)	2011 (1852)	2012 (2224)	2013 (1249)
meropenem	30	30	30	40	37	43
ceftazidim	21	23	23	20	16	28
piperacilin/tazobaktam	6	8	9	24	25	37
gentamicin	26	23	25	25	22	33
amikacin	6	4	1	5	4	5
ciprofloxacin	37	34	37	36	36	45
kolistin	3	3	0	0	0	0

Tabulka 2. Rezistence *Pseudomonas aeruginosa* k antimikrobiálním přípravkům ve VNOL (v procentech)

Antibiotikum	Rok (celkový počet testovaných kmenů)					
	2008 (256)	2009 (286)	2010 (226)	2011 (227)	2012 (208)	2013 (138)
meropenem	46	55	47	59	61	56
ceftazidim	34	39	37	29	28	38
piperacilin/tazobaktam	7	10	11	33	33	46
gentamicin	37	32	40	24	24	33
amikacin	7	4	2	4	4	5
ciprofloxacin	59	51	50	59	48	57
kolistin	4	8	0	0	0	0

Tabulka 3. Iniciální antibiotická léčba předpokládaných pseudomonádových infekcí

iniciální antibiotická léčba	imipenem + gentamicin meropenem + gentamicin piperacilin/tazobaktam + gentamicin ceftazidim + gentamicin
klinické a laboratorní markery infekce jsou zlepšeny v průběhu 72 hodin po zahájení iniciální antibioterapie	patogen nezjištěn: antimikrobiální přípravky ponechat beze změny patogen zjištěn: antimikrobiální přípravky aplikovat cíleně dle citlivosti (deeskalační antibiotická léčba)
klinické a laboratorní markery infekce bez odpovědi do 72 hodin od počátku iniciální antibioterapie	konzultovat příslušné Antibiotické středisko

miálních infekcí jsou údaje o nejčastějších bakteriálních patogenech a jejich rezistenci k antibiotikům, včetně jejího vývoje (12). V současné době je zřejmé, že antibiotická léčba v intenzivní péči musí být zahájena co nejdříve, například v případě sepsí do 1 hodiny (26). V tak krátkém časovém intervalu po stanovení diagnózy bakteriální infekce však ve většině případů není možné přesně určit etiologické agens a jeho citlivost k antibiotikům. Na druhé straně však nasazení adekvátní antibiotické léčby může významně přispět k přežití pacienta a je tedy nutné zajistit co nejvyšší pravděpodobnost účinku antibioterapie.

Z našich výsledků vyplývá stoupající četnost kmenů *Pseudomonas aeruginosa* rezistentních k meropenemu a piperacilinu s tazobaktamem. Narůstající spotřeba karbapenemů a antimikrobiálního přípravku piperacilin/tazobaktam pravděpodobně podmiňuje vzestup odolnosti *Pseudomonas aeruginosa* k jejich účinku (27). U infekcí vyvolaných těmito kmeny se pak markantně

zvyšují terapeutické možnosti a jedinou volbou často zůstávají pouze kolistin a amikacin. Tato skutečnost představuje u řady pacientů významnou limitaci antibiotické léčby z důvodu farmakokinetických vlastností uvedených antibiotik a jejich toxicity.

Při pohledu na rezistenci *Pseudomonas aeruginosa* je zřejmé, že v případě předpokladu etiologické role tohoto species je vhodné aplikovat terapii založenou na kombinaci vhodného beta-laktamového antibiotika (meropenemu, imipenemu, piperacilin/tazobaktamu, ceftazidimu) s gentamicinem. Samozřejmě po určení etiologického agens a event. potvrzení citlivosti je velmi vhodné aplikovat deeskalační princip, například vysazení gentamicinu a ponechání beta-laktamového antibiotika. Možnosti antibiotické léčby případných pseudomonádových infekcí jsou uvedeny v tabulce 3.

Zvyšující se četnost meropenem-rezistentních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* je velmi

znepokojivým faktem, který vyžaduje realizaci všech opatření s cílem omezit tuto rezistenci. Možným řešením, mimo racionální antibiotickou politiku, je aplikace ertapenemu v případě etiologické role enterobakterie s produkcí širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC, protože lze předpokládat nižší selekční tlak na vývoj rezistence k imipenemu a meropenemu (27).

Podpořeno grantem IGA NT/14398.

Literatura

- Viscoli C. EORTC International Antimicrobial Therapy Group. Management of infection in cancer patients. Studies of the EORTC International Antimicrobial Therapy Group (IATG). Eur J Cancer 2002; 38(Suppl.4):S: 82–87.
- Mikulka M, Del Bono V, Raiola AM, et al. Blood stream infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: reemergence of Gram-negative rods and increasing antibiotic resistance. Biol Blood Marrow Transplant 2009; 15: 47–53.
- Kolář M, Htoutou Sedláková M, Hanulík V. a pracovní skupina. Multirezistentní gramnegativní bakterie u hematologických nemocných. Postgrad Med 2012; 14(příl.5): 6–10.
- Vincent JL, Rello J, Marshall JC, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. JAMA 2009; 302: 2323–2329.
- Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. Antimicrob Agent Chemother 2010; 54: 969–976.
- Kolář M, Htoutou Sedláková M, Suchánková H, Hanulík V. Vliv selekčního tlaku karbapenemů na bakteriální rezistenci. Klin Mikrobiol Inf Lék 2013; 19: 4–7.
- Hanulík V, Uvzl R, Husičková V, Htoutou Sedláková M, Kolář M. Bakteriální původci pneumonií u pacientů v intenzivní péči. Klin Mikrobiol Inf Lék 2011; 17: 134–139.
- Khawaja A, Zubairi AB, Durrani FK, Zafar A. Etiology and outcome of severe community acquired pneumonia in immunocompetent adult. BMC Infect Dis 2013; 20: 13–94.
- Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 1306–1311.
- Tumbarello M, De Pascale G, Trecarichi EM, et al. Clinical outcomes of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in intensive care unit patients. Intensive Care Med 2013; 39: 682–692.
- Giamarellos-Bourboulis EJ, Papadimitriou E, Galanakis N, et al. Multidrug resistance to antimicrobials as a predominant factor influencing patient survival. Inter J Antimicrob Agents 2006; 27: 476–481.
- Kolář M. Volba antibiotik v intenzivní péči. Postgrad Med 2012; 14: 510–513
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) documents: Document version 2.0 2012–01–01; 2012. http://eucast.org/clinical_breakpoints.
- Htoutou Sedláková M, Hanulík V, Chromá M, et al. Rezistence enterobakterií ke karbapenemům. Klin Mikrobiol Inf Lék 2011; 17: 12–18.
- Lee K, Chong Y, Shin HB, et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 88–91.
- Htoutou Sedláková M, Hanulík V, Chroma M, et al. Phenotypic detection of broad-spectrum beta-lactamases in microbiological practice. Med Sci Monit 2011; 17: BR147–152.
- Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS, et al. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 3035–3039.
- Radice M, Power P, Gutkind G, et al. First class A carbapenemase isolated from *Enterobacteriaceae* in Argentina. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1068–1069.

19. Aubron C, Poirel L, Ash Ronald J, Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 260–264.
20. Bradford PA, Bratu S, Urban C, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 55–60.
21. Weldhagen GF, Prinsloo A. Molecular detection of GES-2 extended spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Pretoria, South Africa. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: 35–38.
22. Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, et al. Metallo- β -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2224–2228.
23. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4654–4661.
24. Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 196–199.
25. Poirel L, Heritier C, Toluen V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 15–22.
26. Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34: 1589–1596.
27. Kolář M, Htoutou Sedláková M, Suchánková H, Hanulík V. Vliv selektivního tlaku karbapenemů na bakteriální rezistenci. *Klin Mikrobiol Inf Lék* 2013; 19: 4–7.

Článek přijat redakcí: 23. 8. 2013
Článek přijat k publikaci: 19. 9. 2013

prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D.

Ústav mikrobiologie, LF UP a FN Olomouc
Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc
milan.kolar@fnol.cz
