

# Laboratórna diagnostika rezistencie na antibiotiká

metódou Real-Time PCR



Získanie **antibiotickej rezistencie** je spôsobené prítomnosťou genetického determinantu rezistencie. PCR diagnostické súpravy sú určené na detekciu týchto geneticky podmienených determinantov rezistencie mikroorganizmov na antibiotiká. Antibiotická rezistencia dnes presahuje rámec čisto medicínskeho problému, má veľký sociálno-ekonomický význam a vo vyspelých krajinách sa považuje za hrozbu pre národnú bezpečnosť.

Pri **bakteriálnych infekciách** sa dnes najčastejšie predpisujú  **$\beta$ -laktámové antibiotiká**, medzi ktorými sa rozlišujú penicilíny (ampicilín, amoxicilín), cefalosporíny (ceftriaxón, cefixím) a karbapenémy (imipeném, meropeném).

Majú dlhú históriu používania a sú bezpečné a účinné proti širokému spektru bakteriálnych patogénov. Rozsiahle a dlhodobé používanie tejto triedy antimikrobiálnych látok však viedlo k vzniku a rozšíreniu mikroorganizmov, ktoré realizujú antibiotickú rezistenciu prostredníctvom produkcie rôznych variantov  **$\beta$ -laktamáz** – enzýmov, ktoré ničia  $\beta$ -laktámové antibiotiká, resp. dochádza k modifikácii proteínov viažucich penicilín, ktoré sú cieľom pôsobenia  $\beta$ -laktámových antibiotík.



Výsledky vedeckých štúdií poukazujú na potrebu stanovenia citlivosti pred určením antimikrobiálnej terapie. Znalosť bakteriálnej rezistencie na antibiotiká je nevyhnutná pre úspešnú kontrolu ochorenia.

Predčasná a nedostatočná liečba nozokomiálnych a závažných infekcií zvyšuje pravdepodobnosť úmrtia. Preto je veľmi dôležité najprv identifikovať typ antibiotickej rezistencie v počiatočných štádiách infekcie s cieľom určenia najúčinnnejšej antimikrobiálnej terapie. V prípade závažných infekcií by sa to malo uskutočniť čo najskôr.

#### **Negatívne účinky rezistencie:**

- ✓ **Komplikácia priebehu ochorenia a zvýšenie úmrtnosti**
- ✓ **Šírenie infekcie po celom tele**
- ✓ **Pravdepodobnosť šírenia infekcie medzi príbuznými**
- ✓ **Zlyhanie liekovej terapie**
- ✓ **Sťaženie výberu antibiotík, obmedzený výber liekov**
- ✓ **Zložitá a nákladná liečba**
- ✓ **Zvýšenie frekvencie relapsov a prechod choroby na chronickú formu**
- ✓ **Riziko komplikácií po traume, operácii alebo terapeuticky navodenej imunosupresii**
- ✓ **Zvýšené riziko oportúnnych infekcií**
- ✓ **Zvýšené riziko superinfekcie**

Na rozdiel od **tradičných mikrobiologických metód** umožňuje **metóda PCR** identifikovať genetické determinanty rezistencie mikroorganizmov, vrátane ťažko kultivovateľných baktérií, do 4 hodín. Vyznačuje sa vysokou presnosťou a menšími požiadavkami na odber vzoriek materiálu, nevyžaduje živné médiá, antibiotické disky a ďalšie reagenty. Stanovenie antibiotickej rezistencie pomocou PCR umožňuje predpovedať vznik rezistencie na rôzne skupiny antimikrobiálnych liečiv, ako aj posúdiť šírenie rezistentných kmeňov na lokálnej a regionálnej úrovni.

### Mikrobiologické metódy

- ✓ Nedostatok štandardizovaných metód
- ✓ Časové náklady (24-72 hodín do získania výsledku)
- ✓ Ťažkosti s kultiváciou a identifikáciou niektorých mikroorganizmov
- ✓ Pravdepodobnosť nezistenia hlavného pôvodcu infekcie
- ✓ Ťažkosti pri posudzovaní citlivosti na nové antibiotiká
- ✓ Subjektivita hodnotenia citlivosti
- ✓ Používanie drahých médií, činidiel atď.

vs.

### PCR metóda

- ✓ Identifikácia genetických determinantov rezistencie mikroorganizmov, vrátane ťažko kultivovateľných, do 2-4 hodín
- ✓ Vysoká presnosť analýzy
- ✓ Predpovedanie vzniku rezistencie na rôzne skupiny antibiotík
- ✓ Hodnotenie šírenia rezistentných kmeňov

**Detekcia rezistencie na antibiotiká metódou PCR je vynikajúcim doplnkom k tradičnému mikrobiologickému testovaniu.**

### Hlavné skupiny antibiotík:

- ✓ **β-laktámové**
  - Penicilíny (ampicilín, oxacilín)
  - Cefalosporíny (cefotaxím, ceftriaxón, cefepim)
  - Karbapenémy (imipeném, meropeném, doripeném)
- ✓ **Makrolidy (erytromycín, azitromycín)**
- ✓ **Aminoglykozidy (streptomycín, kanamycín, amikacín)**
- ✓ **Glykopeptidy (vankomycín, teikoplanín)**
- ✓ **Fluorochinolóny (ciprofloxacín, levofloxacín, moxifloxacín)**

V modernej klinickej praxi možno rozlíšiť niekoľko variantov antibakteriálnej rezistencie, čo vedie k mimoriadne závažným sociálno-ekonomickým dôsledkom. Tieto možnosti zahŕňajú:

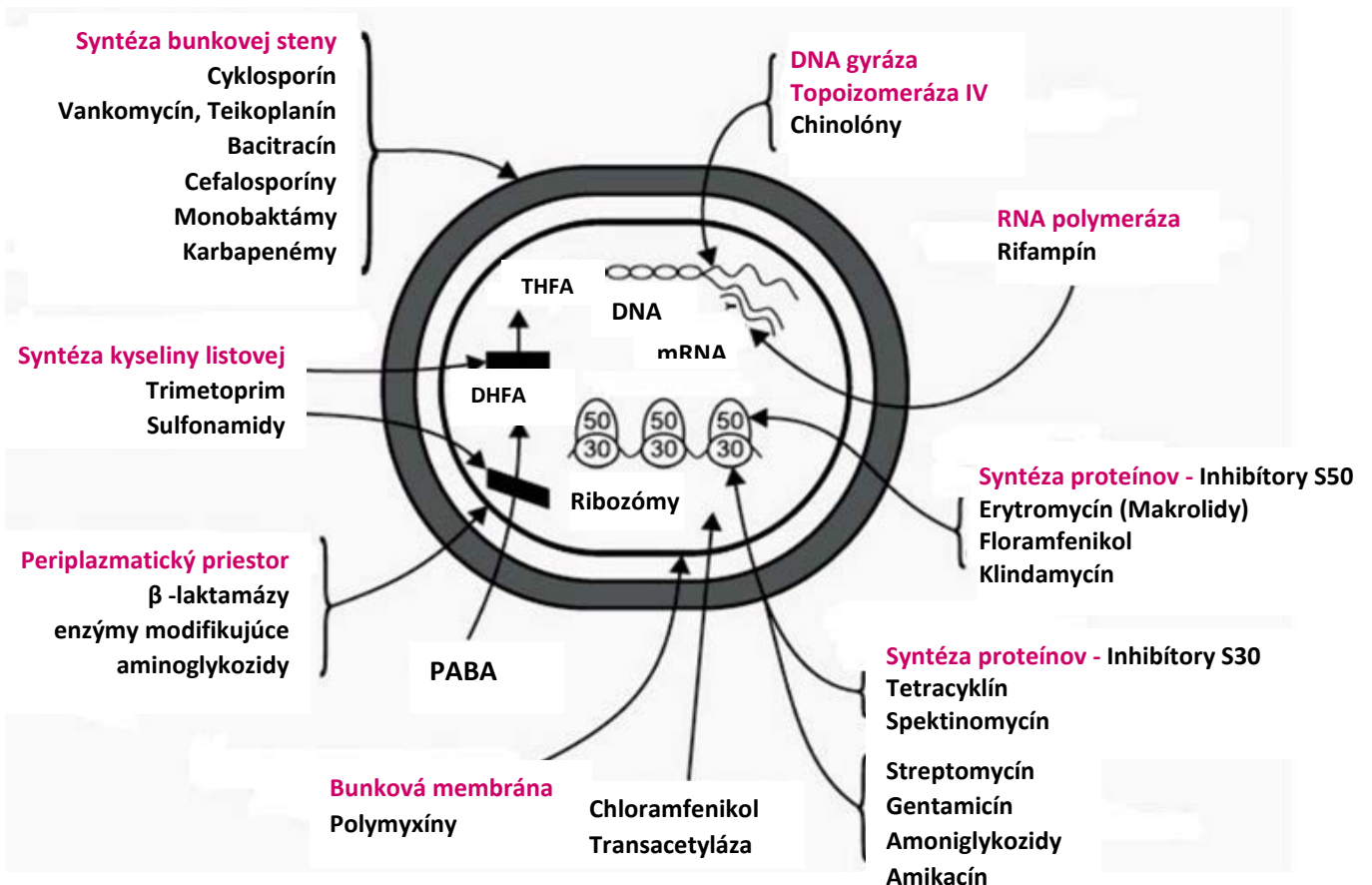
- ✓ rezistencia gramnegatívnych baktérií na **β-laktámové antibiotiká**, najmä baktérie rodu *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonas aeruginosa*, mechanizmus rezistencie je spojený s produkciou **β-laktamázy**;
- ✓ rezistencia voči **glykopeptidom** u baktérií *Enterococcus spp.*;
- ✓ rezistencia na **β-laktámové antibiotiká** u *Staphylococcus aureus*;
- ✓ rezistencia na **fluorochinolóny** medzi grampozitívnymi a gramnegatívnymi baktériami;
- ✓ rezistencia na **makrolidy** u baktérií *Streptococcus spp.*

Väčšina z uvedených rezistencií je spôsobená tým, že baktérie tejto skupiny získajú genetický determinant rezistencie (Tabuľka 1), ktorý je možné detegovať pomocou PCR.

Tabuľka 1:











Skupina	Typické lieky	Gén-marker rezistencie	Baktérie – nositelia genetickej rezistencie
<b>β-laktámové antibiotiká</b>			
penicilíny	ampicilín amoxicilín benzylpenicilín piperacilín	<i>blaTEM-1,2</i> <i>blaSHV-1.11</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> ( <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , <i>Shigella spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> ), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter spp.</i>
cefalosporíny	I. generácia: cefazolín cefalotín cefalexín	<i>blaCTX-M</i> <i>blaSHV-5.12</i> <i>blaOXA-10</i>	
	II. generácia: cefuroxím cefaclor		
	III. generácia: cefotaxím ceftriaxón ceftazidím cefixím		
	IV. generácia: cefepim	<i>AmpC</i> ( <i>blaDHA</i> , <i>blaMOX</i> , <i>blaCMY</i> , <i>blaFOX</i> , <i>blalat</i> , <i>blaact</i> , <i>blaMIR</i> )	
karbapenémy	meropenem imipeném doripeném	<i>blaVIM</i> <i>blaIMP</i> <i>blaNDM</i> <i>blaKPC</i> <i>blages</i> <i>blaOXA23-like</i> <i>blaOXA40-like</i> <i>blaOXA48-like</i> <i>blaOXA58-like</i>	
<b>β-laktámové antibiotiká</b>	oxacilín	<i>MecA</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
glykopeptidy	vankomycín	<i>VanA</i> <i>VanB</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
	teikoplanín	<i>VanA</i>	
makrolidy	erytromycín azitromycín klaritromycín	<i>Mef</i> <i>ErmB</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
<b>fluorochinolóny</b> (II., III. a IV. generácia chinolónov)	II. generácia: ciprofloxacín ofloxacín  III. generácia: levofloxacín  IV. generácia: moxifloxacín	GyrA ParC QnrA	<i>Streptococcus spp.</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>











## Hlavné mechanizmy účinku antibiotík na bunku






## Diagnostické súpravy REZISTOM

Kat. č.	Názov a popis súpravy	Počet testov
<b>Extrakčné súpravy na izoláciu nukleových kyselín</b>		
E0225	<b>DNA-EXPRESS</b> Súprava na rýchlu izoláciu DNA z rôzneho klinického materiálu	100
E0232	<b>NA Sorbent Base</b>	100
E0232-4	<b>NA Sorbent Blood</b> Izolácia nukleových kyselín z plnej krvi	100
E02104	<b>Súprava na rýchlu extrakciu DNA z hemokultúry</b>	100

Kat. č.	Gén-marker	Názov a popis súpravy	Variant	Počet testov
<b>Monoplexné súpravy</b>				
E01681-RT-120 E01781-RT-TS-96 E01781-RT-TS-60	<i>blaCTX-M</i>	<b>REZISTOM.CTX-M</b> Diagnostická súprava na detekciu <i>blaCTX-M</i> génov rezistencie na cefalosporíny u Gramnegatívnych baktérií	 •• 12x8 Strip •• P02	130 96 60
E01682-RT-120 E01782-RT-TS-96 E01782-RT-TS-60	<i>MecA</i>	<b>REZISTOM.MecA</b> Diagnostická súprava na detekciu <i>MecA</i> génu rezistencie na $\beta$ -laktámy u <i>Staphylococcus</i> spp.	 •• 12x8 Strip •• P02	130 96 60
E01865-RT-120 E01965-RT-TS-96 E01965-RT-TS-60	<i>blaOXA10</i>	<b>REZISTOM.OXA10</b> Diagnostická súprava na detekciu <i>blaOXA10</i> génov rezistencie na cefalosporíny u Gramnegatívnych baktérií	 •• 12x8 Strip •• P02	130 96 60
E01868-RT-120 E01968-RT-TS-96 E01968-RT-TS-60	<i>blaDHA</i>	<b>REZISTOM.DHA</b> Diagnostická súprava na detekciu <i>blaDHA</i> génov rezistencie na chránené penicilíny a cefalosporíny u Gramnegatívnych baktérií	 •• 12x8 Strip •• P02	130 96 60
E01684-RT-120 E01784-RT-TS-96 E01784-RT-TS-60	<i>blaVIM</i>	<b>REZISTOM.VIM</b> Diagnostická súprava na detekciu <i>blaVIM</i> génov rezistencie na karbapenémy u Gramnegatívnych baktérií	 •• 12x8 Strip •• P02	130 96 60
E01685-RT-120 E01785-RT-TS-96 E01785-RT-TS-60	<i>blaNDM</i>	<b>REZISTOM.NDM</b> Diagnostická súprava na detekciu <i>blaNDM</i> génov rezistencie na karbapenémy u Gramnegatívnych baktérií	 •• 12x8 Strip •• P02	130 96 60
E01686-RT-120 E01786-RT-TS-96 E01786-RT-TS-60	<i>blaOXA48-like</i>	<b>REZISTOM.OXA48-like</b> Diagnostická súprava na detekciu <i>blaOXA48-like</i> génov rezistencie na karbapenémy u Gramnegatívnych baktérií	 •• 12x8 Strip •• P02	130 96 60
E01646-RT-120 E01746-RT-TS-96 E01746-RT-TS-60	<i>blaKPC</i>	<b>REZISTOM.KPC</b> Diagnostická súprava na detekciu <i>blaKPC</i> génov rezistencie na karbapenémy u Gramnegatívnych baktérií	 •• 12x8 Strip •• P02	130 96 60
E01860-RT-120 E01960-RT-TS-96 E01960-RT-TS-60	<i>blaGES</i>	<b>REZISTOM.GES</b> Diagnostická súprava na detekciu <i>blaGES</i> génov rezistencie na karbapenémy u Gramnegatívnych baktérií	 •• 12x8 Strip •• P02	130 96 60
E01860-RT-120 E01960-RT-TS-96 E01960-RT-TS-60	<i>blaOXA23-like</i>	<b>REZISTOM.OXA23-like</b> Diagnostická súprava na detekciu <i>blaOXA23-like</i> génov rezistencie na karbapenémy u Gramnegatívnych baktérií	 •• 12x8 Strip •• P02	130 96 60

Kat. č.	Gén-marker	Názov a popis súpravy	Variant	Počet testov
E01862-RT-120 E01962-RT-TS-96 E01962-RT-TS-60	<i>blaOXA40-like</i>	<b>REZISTOM.OXA40-like</b> Diagnostická súprava na detekciu <i>blaOXA40-like</i> génov rezistencie na karbapenémy u Gramnegatívnych baktérií	 •• 12x8 Strip •• P02	130 96 60
E01687-RT-120 E01787-RT-TS-96 E01787-RT-TS-60	<i>VanA</i> <i>VanB</i>	<b>REZISTOM.Van</b> Diagnostická súprava na detekciu a diferenciaciu <i>VanA</i> a <i>VanB</i> génov rezistencie na glykopeptidy u <i>E.faecalis/E.faecium</i>	 •• 12x8 Strip •• P02	130 96 60
E01647-RT-120 E01747-RT-TS-96 E01747-RT-TS-60	<i>ErmB</i>	<b>REZISTOM.ErmB</b> Diagnostická súprava na detekciu <i>ErmB</i> génov rezistencie na makrolidy, linkozamidy a streptogramín B u <i>Streptococcus spp.</i> a <i>Staphylococcus spp.</i>	 •• 12x8 Strip •• P02	130 96 60
E01648-RT-120 E01748-RT-TS-96 E01748-RT-TS-60	<i>Mef</i>	<b>REZISTOM.Mef</b> Diagnostická súprava na detekciu <i>Mef</i> génov rezistencie na makrolidy u <i>Streptococcus spp.</i>	 •• 12x8 Strip •• P02	130 96 60
<b>Multiplexné súpravy</b>				
E01873-RT-120 E01973-RT-TS-96	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus spp.</i> <i>MecA</i>	<b>REZISTOM.MRSA</b> Diagnostická súprava na detekciu a diferenciaciu DNA <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> a <i>MecA</i> génu rezistencie na $\beta$ -laktámy u <i>Staphylococcus spp.</i>	 •• 12x8 Strip	130 96
E01874-RT-120 E01974-RT-TS-96	<i>Enterococcus faecalis/</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>VanA</i> <i>VanB</i>	<b>REZISTOM.VRE type V</b> Diagnostická súprava na detekciu DNA <i>Enterococcus faecalis/Enterococcus faecium</i> a diferenciaciu <i>VanA</i> a <i>VanB</i> génov rezistencie na glykopeptidy u <i>Enterococcus spp.</i>	 •• 12x8 Strip	130 96
E01875-RT-120 E01975-RT-TS-96	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>blaOXA23-like</i> <i>blaOXA40-like</i>	<b>REZISTOM.CRAB</b> Diagnostická súprava na detekciu DNA <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>blaOXA23-like</i> a <i>blaOXA40-like</i> génov rezistencie na karbapenémy u Gramnegatívnych baktérií	 •• 12x8 Strip	130 96
E01876-RT-120 E01976-RT-TS-96	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>blaVIM</i> <i>blaNDM</i>	<b>REZISTOM.MDR-Pseudomonas</b> Diagnostická súprava na detekciu DNA <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>blaOXA23-like</i> a <i>blaOXA40-like</i> génov rezistencie na karbapenémy u Gramnegatívnych baktérií	 •• 12x8 Strip	130 96
E01877-RT-120 E01977-RT-TS-96	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>blaKPC</i> <i>blaOXA48-like</i>	<b>REZISTOM.CRE-Klebsiella</b> Diagnostická súprava na detekciu DNA <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>blaKPC</i> a <i>blaOXA48-like</i> génov rezistencie na karbapenémy u Gramnegatívnych baktérií	 •• 12x8 Strip	130 96
E01878-RT-120 E01978-RT-TS-96	<i>Escherichia coli</i> <i>blaCTX-M</i> <i>blaOXA10</i>	<b>REZISTOM.ESBL-E.coli</b> Diagnostická súprava na detekciu DNA <i>Escherichia coli</i> , <i>blaCTX-M</i> a <i>blaOXA10</i> génov rezistencie na cefalosporíny u Gramnegatívnych baktérií	 •• 12x8 Strip	130 96

Kat. č.	Gén-marker	Názov a popis súpravy	Variant	Počet testov
E01879-RT-120 E01979-RT-TS-96	<i>Enterobacter species</i> blaGES blaDHA	<b>REZISTOM.CRE-Enterobacter</b> Diagnostická súprava na detekciu DNA <i>Enterobacter species</i> , blaGES génov rezistencie na karbapenémy u Gramnegatívnych baktérií a blaDHA gény rezistencie na chránené penicilíny a cefalosporíny u Gramnegatívnych baktérií	 •• 12x8 Strip	130 96
E01880-RT-120 E01980-RT-TS-96	<i>Streptococcus species</i> Mef ErmB	<b>REZISTOM.MLSB-Streptococcus</b> Diagnostická súprava na detekciu DNA <i>Streptococcus species</i> , Mef a ErmB génov rezistencie na makrolidy, linkozamidy a streptogramín B u Grampozitívnych kokov	 •• 12x8 Strip	130 96
E01867-RT-120 E01967-RT-TS-96	<i>Enterococcus faecalis/ Enterococcus faecium</i> VanA VanB	<b>RESISTOM.VRE type E</b> Diagnostic kit for detection and differentiation of DNA of <i>Enterococcus faecalis/ Enterococcus faecium</i> and VanA/VanB glycopeptide resistance genes in <i>Enterococcus spp.</i>	 •• 12x8 Strip	130 96

**Diagnostické centrum DNK, s.r.o.**

Brestová 14, 821 02 Bratislava

+421 911 299 324, +421 911 211 404

[dnk@pharma.sk](mailto:dnk@pharma.sk), [diagnostika@pharma.sk](mailto:diagnostika@pharma.sk)

[www.pcr.sk](http://www.pcr.sk)