

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



**Účinnost dezinfekčních prostředků určených
k hygienické dezinfekci rukou vůči klinicky
významným kmenům enterokoků**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Martina Malíková

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Irena Hanovcová, CSc.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2021

Poděkování

Ráda bych poděkovala své konzultantce, paní doktorce Hanovcové za trpělivost a cenné rady, dále pak vedoucímu mé diplomové práce panu doktoru Jand'ourkovi za jeho připomínky. Dále bych chtěla poděkovat členům Katedry epidemiologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany a své rodině za jejich podporu.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala pod vedením konzultanta. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 11.5.2021

Bc. Martina Malíková

OBSAH

1. ABSTRAKT.....	6
2. ABSTRACT	7
3. POUŽITÉ ZKRATKY.....	8
4. ÚVOD	10
5. CÍL PRÁCE.....	12
6. TEORETICKÁ ČÁST	13
6.1 Rod <i>Enterococcus</i>	13
6.1.1 Fyziologické a biochemické vlastnosti	13
6.1.2 Diagnostika.....	14
6.1.3 Klinický význam	17
6.1.4 Virulence	18
6.1.5 Epidemiologie a ekologie.....	20
6.1.6 Léčba.....	22
6.1.7 Vankomycin rezistentní enterokoky	23
6.2 Rezistence	27
6.2.1 Rezistence proti antimikrobiálním látkám	27
6.2.2 Bakteriální rezistence vůči antiseptikům a dezinfekčním prostředkům	36
6.3 Nozokomiální infekce	43
6.3.1 Úloha hygieny rukou ve spojení s nozokomiálními nákazami.....	44
6.3.2 Provedení hygieny rukou	46
6.4 Alkoholové dezinfekční prostředky.....	48
6.4.1 Vybrané chemické vlastnosti alkoholů	49
6.4.2 Mechanismus účinku na biologické systémy	49
7. PRAKTICKÁ ČÁST	50
7.1 Metoda testování.....	50
7.1.1 Reagencie	50

7.1.2 Dezinfekční prostředky	51
7.1.3 Testované mikroorganismy.....	53
7.1.4 Pracovní postup.....	55
8. VÝSLEDKY	61
8.1 Stanovení minimální inhibiční koncentrace k vankomycinu a teikoplaninu	61
8.2 Výsledky účinnosti dezinfekčních prostředků	62
8.2.1 Výsledky účinnosti u vankomycin citlivých enterokoků	62
8.2.2 Výsledky účinnosti u vankomycin rezistentních enterokoků	64
9. DISKUZE	66
10. ZÁVĚR.....	72
11. SEZNAM TABULEK	73
12. SEZNAM OBRÁZKŮ	74
13. SEZNAM GRAFŮ	75
14. POUŽITÁ LITERATURA.....	76

1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra lékařských a biologických věd

Studijní obor: Odborný pracovník v laboratorních metodách

Kandidát: Bc. Martina Malíková

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ondřej Jandourek, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Irena Hanovcová, CSc.

Název diplomové práce: Účinnost dezinfekčních prostředků určených k hygienické dezinfekci rukou vůči klinicky významným kmenům enterokoků

Alkoholové dezinfekční prostředky určené k hygienické dezinfekci rukou jsou celosvětově klíčovým nástrojem kontroly nozokomiálních infekcí. Cílem této práce bylo ověřit účinnost těchto prostředků, které jsou užívány ve zdravotnických zařízeních, vůči vankomycin citlivým a vankomycin rezistentním enterokokům, které byly izolovány z klinických materiálů.

Testování účinnosti dezinfekčních prostředků bylo provedeno podle české technické normy ČSN EN 1040 – Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika – Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení základního baktericidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik – Metoda zkoušení a požadavky (fáze 1). Pro naše testování jsme použili diluční metodu s neutralizátorem. Ke zjištění účinnosti jsme použili celkem 35 kmenů enterokoků, z toho 12 kmenů bylo vankomycin citlivých (4 kmeny *E. faecium* a 8 kmenů *E. faecalis*) a 23 kmenů bylo vankomycin rezistentních (všechny *E. faecium*).

Účinnost jsme ověřovali u 7 alkoholových dezinfekčních prostředků s různými typy alkoholů. U všech dezinfekčních přípravků jsme zaznamenali nižší redukci množství bakterií, než je dle normy požadováno pro potvrzení dostatečné účinnosti. Nepodařilo se tedy potvrdit baktericidní účinnost vybraných alkoholových dezinfekčních přípravků vůči klinicky významným kmenům enterokoků.

Hygienická dezinfekce rukou je podstatnou součástí prevence přenosu infekčního agens. V současné době se její užívání rozšířilo i mezi širokou veřejnost, je tedy důležité, aby alkoholové dezinfekční přípravky byly spolehlivé a s širokým spektrem účinnosti. Výzkum v oblasti účinnosti dezinfekčních prostředků vůči patogenům je tedy nezbytný a je třeba v něm pokračovat.

Klíčová slova: enterokoky, VRE, alkoholové dezinfekční prostředky, hygienická dezinfekce rukou

2. ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Study program: Bioanalytical laboratory diagnostics in health care

Candidate: Bc. Martina Malíková

Thesis supervisor: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Consultant: RNDr. Irena Hanovcová, CSc.

Title of diploma thesis: Effectiveness of disinfectants for hygienic hand disinfection against clinically important strains of enterococci

Alcohol-based hand disinfectants for hygienic hand disinfection are a key tool for the control of nosocomial infections worldwide. The aim of this study was to verify the effectiveness of these products, which are used in healthcare facilities, against vancomycin-sensitive and vancomycin-resistant enterococci isolated from clinical materials.

Testing of the efficacy of disinfectants was performed according to the Czech technical standard ČSN EN 1040 - Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative test using suspension to determine the basic bactericidal effect of chemical disinfectants and antiseptics - Test method and requirements (phase 1). We used the dilution method with a neutraliser for our testing. There were used a total of 35 strains of enterococci to determine efficacy, 12 of which were vancomycin sensitive (four *E. faecium* strains and eight *E. faecalis* strains) and 23 were vancomycin resistant *E. faecium* strains.

We tested the efficacy of seven alcohol disinfectants containing different types of alcohols. We observed a lower reduction in the amount of bacteria for all disinfectants than is required by the standard to confirm the sufficient effectiveness of the product. Thus, the bactericidal efficacy of the selected alcohol disinfectants against clinically relevant enterococcal strains was not confirmed.

Hygienic hand disinfection is an essential part of preventing the transmission of infectious agents. Nowadays, its use has spread to the general public, so it is important that alcohol disinfectants are reliable and with a broad spectrum of efficacy. Research of the efficacy of disinfectants against pathogens is therefore essential and needs to be continued.

Keywords: enterococci, VRE, alcohol disinfectants, hygienic hand disinfection

3. POUŽITÉ ZKRATKY

ABC – superrodina adenosintrifosfát vázajících kazet (ATP-Binding Cassette superfamily)

AME – enzym modifikující aminoglykosidy

ATP – adenosintrifosfát

CAT – chloramfenikol acetyltransferáza

CFU – jednotky tvořící kolonie (Colony Forming Units)

CNCTC – Česká národní sbírka typových kultur (Czech National Collection of Type Cultures)

CNS – centrální nervový systém

DNA – kyselina deoxyribonukleová

EARSS – Evropský systém sledování antimikrobiální rezistence (European Antimicrobial Resistance Surveillance system)

eDNA – extracelulární kyselina deoxyribonukleová

ESBL – širokospektré β -laktamázy (Extended-Spectrum β -Lactamases)

Esp – povrchový protein enterokoků (Enterococcal surface protein)

GIT – gastrointestinální trakt

GRE – glykopeptid rezistentní enterokok

GTPáza – guanosintrifosfatáza

HGT – horizontální přenos genetické informace

ITS – interní transkribovaný spacer (Internal Transcribed Spacer)

JIP – jednotka intenzivní péče

KAS – kvarterní amoniové sloučeniny

MALDI – hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)

MATE – rodina proteinů pro vytlačení léků a toxických sloučenin (Multidrug And Toxic compound Extrusion family)

MDR – multirezistence (Multi Drug Resistance)

MFS – superrodina hlavních facilitátorů (Major Facilitator Superfamily)

MGE – mobilní genetický element

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MRSA – meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

NCTC – Národní sbírka typových kultur (National Collection of Type Cultures)

NI – nozokomiální infekce

PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza

PBP – penicilin vázající protein (Penicillin-Binding Protein)

PCR – polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

Pel – exopolysacharid syntetizovaný lokusem s pleiotrofním účinkem

PFGE – pulzní gelová elektroforéza (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

Psl – exopolysacharid syntetizovaný lokusem pro syntézu polysacharidů

PVC – polyvinylchlorid

PYR – pyrrolidonylarylamidáza/ pyrrolidonyl peptidáza

REA – analýza fragmentů vzniklých působením restričních endonukleáz (Restriction Endonuclease Analysis)

RNA – ribonukleová kyselina

RND – rodina rezistence-nodulace-buněčné dělení (Resistance-Nodulation-cell-Division family)

rRNA – ribozomální ribonukleová kyselina

SDS – dodecylsírán sodný

SMR – rodina malých multirezistentních pump (Small Multidrug Resistance family)

tDNA – transferová kyselina deoxyribonukleová

TOF – detektor doby letu (Time Of Flight)

tRNA – transferová ribonukleová kyselina

VRE – vankomycin rezistentní enterokok

VRSA – vankomycin rezistentní *Staphylococcus aureus*

VSE – vankomycin citlivý enterokok

WHO – Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

4. ÚVOD

Nozokomiální nákazy představují celosvětový problém a každoročně postihnou stovky pacientů. Tyto infekce vedou k vážnějšímu průběhu onemocnění, prodlužují hospitalizaci, způsobují dlouhodobé nebo trvalé následky a zvyšují úmrtnost. Kromě zdravotních komplikací se nozokomiální nákazy podílí na zvýšení rezistence mikroorganismů vůči antimikrobiálním přípravkům a v neposlední řadě představují významnou dodatečnou finanční zátěž při jejich léčbě.

Enterokoky jsou přirozenou součástí lidské střevní mikroflóry a patří do pětice nejčastějších původců nozokomiálních nákaz. Jako oportunní patogeny nejčastěji způsobují nozokomiální infekce močových a dýchacích cest, infekce chirurgických ran a infekce krevního řečiště. Jako původci těchto infekcí jsou nejčastěji identifikováni *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis*. Léčba enterokokových infekcí je komplikovaná díky přirozené rezistenci enterokoků k širokému spektru antibiotik. Lékem poslední volby bylo glykopeptidové antibiotikum vankomycin, ovšem v druhé polovině 80. let 20. století byly izolovány první kmeny se získanou rezistencí k tomuto antibiotiku. V následujících letech došlo k celosvětovému rozšíření těchto vankomycin rezistentních enterokoků ve zdravotnických zařízeních. Šíření nejen těchto nozokomiálních multirezistentních bakterií bylo impulsem pro zpřísnění preventivních opatření přenosu infekčního agens v zařízeních zdravotní péče.

Hygienická dezinfekce rukou je jedním z účinných nástrojů v prevenci přenosu infekčního agens. Kontaminované ruce zdravotnických pracovníků jsou nejběžnější cestou šíření patogenních kmenů. Hygienickou dezinfekci rukou je třeba provádět opakovaně během pracovní směny, a to dostatečným množstvím dezinfekčního přípravku po dobu minimálně 30 sekund, eventuálně déle, dle návodu výrobce dezinfekčního prostředku a účelu použití.

Kromě správného provedení hygienické dezinfekce rukou je podstatná i účinnost používaných dezinfekčních prostředků. Ve zdravotnických zařízeních jsou k dezinfekci rukou používány alkoholové dezinfekční prostředky, které jsou nejen baktericidní, ale také virucidní a fungicidní. V rámci dezinfekčních plánů jednotlivých zařízení zdravotní péče jsou dezinfekční prostředky pravidelně střídány na základě typu účinné látky, aby se zabránilo vzniku odolnosti mikroorganismů na používané dezinfekční prostředky. U přípravků na ruce se jedná o přípravky s kombinací různých alkoholů a skupiny přípravků, kdy jsou alkoholy v kombinaci s kvarterními amoniiovými

sloučeninami (KAS) nebo kyselinou peroctovou. Při vytváření dezinfekčních plánů je třeba dbát na pravidelné střídání dezinfekčních prostředků a nepoužívat po sobě prostředky z jedné skupiny. Účinnosti alkoholových dezinfekčních prostředků by se tedy měla věnovat větší pozornost, pokud možno v podobě jejího pravidelného testování.

5. CÍL PRÁCE

V této práci jsme si dali za cíl ověřit účinnost alkoholových dezinfekčních prostředků, které jsou užívány ve zdravotnických zařízeních k hygienické dezinfekci rukou. Porovnávali jsme, jestli jsou tyto dezinfekční prostředky účinné vůči vankomycin citlivým a vankomycin rezistentním enterokokům, které byly izolovány z klinických materiálů. Kladli jsme si také otázku, zda je doporučená doba dezinfekce rukou 30 sekund dostatečná.

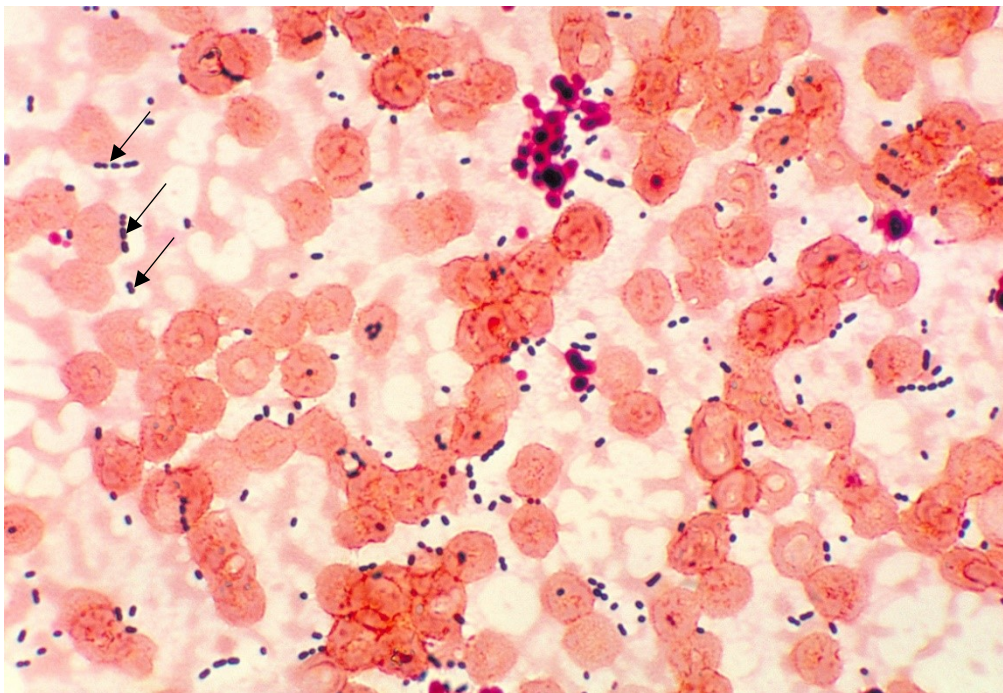
6. TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Rod *Enterococcus*

6.1.1 Fyziologické a biochemické vlastnosti

Jako samostatný druh byly enterokoky klasifikovány v roce 1984, do té doby se řadily mezi streptokoky, s nimiž mají společnou řadu vlastností. Zástupce rodu *Enterococcus* lze v obarveném nátěru pozorovat jako grampozitivní koky oválného tvaru, které mohou tvořit krátké řetězky, drobné shluky nebo se vyskytují ve dvojicích či samostatně (Obrázek 1). Jsou kataláza negativní, u některých kmenů dochází k produkci pseudokatalázy. Většina enterokoků reaguje s antiséry skupiny D a některé kmeny i s antiséry skupiny Q v klasifikaci dle Lancefieldové. Enterokoky produkují rovněž enzymy pyrrolidonylarylamidázu (PYR) a leucinaminopeptidázu, jejichž enzymatická aktivita je využívána k jejich diagnostice (Murray, 1990; Facklam, 2001).

Enterokoky patří mezi mezofilní bakterie, jejichž teplotní optimum je 30–35 °C, ale jsou schopny růstu i v teplotním rozmezí 10–45 °C. Mohou také růst v širokém rozmezí pH s rozpětím 4,4–9,6 a v prostředí se zvýšenou koncentrací soli – médium s 6,5 % chloridu sodného. Na rozdíl od streptokoků jsou enterokoky schopné přežít po dobu 30 minut při teplotě 60 °C. Enterokoky rostou i v bujónu obohaceném o 40 % žlučových solí a rovněž hydrolyzují eskulin (Braňek *et al.*, 2019).



Obrázek 1 *Enterococcus* spp. ve tkáni pacienta s pneumonií (tmavě modrofialové oválné koky – viz šipky), Gramovo barvení, zvětšení 1000x

Zdroj obrázku: CDC, dostupné na: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=2898>

6.1.2 Diagnostika

Kultivace

Kultivace enterokoků nevyžaduje žádné zvláštní podmínky, řadí se mezi fakultativně anaerobní mikroorganismy. Pouze druhy *E. cecorum* a *E. columbae* potřebují při kultivaci zvýšenou tenzi CO₂ (Devriese *et al.*, 1993). Enterokoky tvoří na krevním agaru šedobílé kolonie o velikosti 1–3 mm, které mají často ve svém okolí zónu viridace, pouze výjimečně β-hemolýzu a u některých kmenů se hemolýza nevyskytuje vůbec (Obrázek 2) (Votava *et al.*, 2003). U druhů *E. casseliflavus*, *E. mundtii* a *E. flavescens* byla zaznamenána i produkce žlutého pigmentu (Devriese *et al.*, 1993).



Obrázek 2 *Enterococcus faecium* na krevním agaru

Zdroj obrázku: vlastní fotografie

Lze použít i selektivní diagnostické půdy, které obsahují azid sodný, glukózu a trifenyltetrazoliumchlorid jako je např. Slanetz-Bartley agar, kolonie enterokoků mají na této půdě růžovou až červenou barvu (Votava *et al.*, 2003). Pro kultivaci enterokoků z vody, půdy nebo z potravin je používán také Kanamycin Aesculin Azid agar. K odlišení od viridujících streptokoků se používá žluč-eskulinový agar, enterokoky jsou schopné růstu i v přítomnosti vyššího procenta žluče, a navíc hydrolyzují eskulin, což se projeví jako tmavě hnědé až černé zbarvení kultivačního média. Rovněž jsou k dispozici speciální půdy s chromogenními substráty (Domig *et al.*, 2003a).

Serotypizace

K základnímu odlišení enterokoků od streptokoků lze použít serotypizaci dle Lancefieldové, která na základě typu povrchových antigenů zařadila streptokoky a enterokoky do antigenních tříd A–Z. Dříve se ke zjištění povrchových antigenů používala antiséra, v dnešní době je protilátka proti jednotlivým povrchovým antigenům navázána na latexové částice. Enterokoky jsou podle této klasifikace zařazeny do skupiny D (Murray, 1990). U některých druhů enterokoků však nebyl antigen skupiny D prokázán (*E. avium*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar* a *E. saccharolyticus*) (Devriese *et al.*, 1993).

Biochemické testy

Mezi základní biochemické testy pro odlišení enterokoků od streptokoků patří PYR test, který je založen na hydrolýze pyrrolidonyl- β -naftylamidu enzymem pyrrolidonylarylamidázou, kterou produkují právě enterokoky (s výjimkou *E. saccharolyticus*, *E. cecorum* a *E. columbae*). Tento enzym však produkují také streptokoky skupiny A a některé kmeny pneumokoků. Při pozitivním PYR testu se dále provádí i latexová aglutinace na přítomnost antigenu skupiny A, čímž se při negativním výsledku vyloučí, že by se mohlo jednat o *Streptococcus pyogenes* (Murray, 1990).

Využívá se taky biotypizace, tedy identifikace na základě schopnosti mikroorganismů fermentovat sacharidy a přeměňovat určitý substrát pomocí enzymů, které produkují. V minulosti se tyto testy prováděly ve zkumavkách, v současné době se užívají plastové destičky s jamkami, ve kterých jsou lyofilizované jednotlivé reagenty. Jde například o testy API[®] 20 STREP – výrobce BioMérieux (Francie), RapID[™] STR Systém – výrobce Thermo Scientific[™] (USA) nebo STREPTOtest 24 – výrobce Erba Lachema (Česká republika) (Obrázek 3).



Obrázek 3 Výsledky testu API® 20 STREP u *Enterococcus faecium*

Zdroj obrázku: Hijazi, N., Elmanama, A.A., Al-Hindi, A. Vancomycin-resistant Enterococci in fecal samples from hospitalized patients and non-hospitalized individuals in Gaza City. *Journal of Public Health*. 2009, 17(4), 243-249.

K druhové identifikaci enterokoků lze také využít stanovení jejich proteinového profilu pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE), kdy dochází k rozdělení proteinů na základě jejich elektroforetické pohyblivosti (Domig *et al.*, 2003b).

Hmotnostní spektrometrie

V mikrobiologické druhové diagnostice se rovněž využívá metody hmotnostní spektrometrie, a to konkrétně MALDI-TOF (Matrix Assisted Desorption Ionization/Time of Flight). U této techniky dochází k desorpci a ionizaci v přítomnosti matrice za následné detekce v analyzátoru doby letu. Hodnotí se hmotnostní spektra, která zobrazují proteiny a peptidy bakteriálních buněk (Murray, 2010).

Molekulárně biologické metody

Pro genotypizaci enterokoků se využívá řada molekulárně biologických metod. Jednou z technik je analýza fragmentů vzniklých působením restričních endonukleáz na chromozomální DNA (REA) v kombinaci s pulzní gelovou elektroforézou (PFGE). K identifikaci bakterií se používá také ribotypizace, tedy srovnávání restričních fragmentů genů pro rRNA, pomocí sondy 16S rRNA lze získat unikátní restriční profil pro jednotlivé druhy bakterií.

Následující metody jsou založené na polymerázové řetězové reakci (PCR). Využívá se např. rep-PCR, která je založena na amplifikaci fragmentů mezi repetitivními sekvencemi. Tyto sekvence jsou u jednotlivých bakteriálních druhů v různých polohách a přerušovány různě dlouhými fragmenty.

Další možnou metodou je tDNA-PCR, při které dochází k analýze polymorfismů v délkách intergenních spacerů tRNA s následnou separací ampliconů různých délek metodou kapilární elektroforézy. V rámci druhu jsou délky těchto intergenních spacerů identické, liší se však mezi jednotlivými druhy enterokoků.

K druhové identifikaci lze také použít ITS-PCR, tedy amplifikaci oblastí ITS (Internal Transcribed Spacer), které se nacházejí mezi 16S a 23S rRNA, získané amplikony se dále rozdělují pomocí gelové elektroforézy. Odlišné amplikony v rámci rodu *Enterococcus* byly zaznamenány u druhů *E. faecalis* a *E. faecium*, lze tedy tuto metodu použít na jejich rozlišení (Domig *et al.*, 2003b).

6.1.3 Klinický význam

Enterokoky jsou podstatnou součástí lidského mikrobiomu, najdeme je ve střevech, v urogenitálním traktu a také v dutině ústní. V lidské populaci se nejčastěji jedná o *E. faecalis* a *E. faecium* (Fisher a Phillips, 2009).

Enterokoky mohou mít na lidský organismus pozitivní účinky, některé druhy se používají jako probiotika a jsou součástí některých doplňků stravy. Lze je použít při léčbě či prevenci syndromu dráždivého tračníku, při průjmu vyvolaném užíváním antibiotik, ale také na různá funkční nebo chronická střevní onemocnění. Navíc enterokoky vykazují antimutagenní, antikarcinogenní, hypocholesterolemické účinky a mohou mít i vliv na regulaci imunitního systému (Braňek *et al.*, 2019).

Negativně pak enterokoky působí na lidský organismus jako původci různých infekcí, především jde o druh *E. faecalis*, ale onemocnění mohou způsobit i jiné druhy (*E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus* a *E. faecium*). Enterokoky jsou také častým zdrojem nozokomiálních nákaz, a to až v jedné třetině případů (Murray, 1990).

Nejběžnějšími typy enterokokových infekcí jsou infekce močových cest. U starších mužů se vyskytují cystitida, prostatitida a epididymitida. V případě cystitidy u mladých žen je jen vzácně nekomplikovaný průběh. Nejvíce se tyto infekce vyskytují v zařízeních dlouhodobé péče a v nemocnicích, tam zvláště na jednotkách intenzivní péče (JIP), kde se vankomycin rezistentní enterokoky (VRE) staly hlavními patogeny, které způsobují infekce močových cest (Gilmore *et al.*, 2014).

Přibližně v 5–15 % mohou enterokoky zapříčinit infekční endokarditidu, a to většinou u osob starších 65 let, u dětí se naopak objevuje jen zřídka. U zhruba poloviny mužů dochází před rozvojem endokarditidy k zavedení močového katétru nebo k infekci močových cest, u třetiny žen může být příčinou onemocnění genitourinární zákrok, a to včetně potratu. Enterokoky mohou způsobit endokarditidu také u drogově závislých (Murray, 1990). Mnohem častěji je původcem tohoto onemocnění *E. faecalis* než *E. faecium* (Gilmore *et al.*, 2014).

Dalším onemocněním je enterokoková bakteriémie, která je mnohem častější než enterokoková endokarditida. V průběhu let se zvyšuje podíl enterokokových bakteriemií způsobených nozokomiálními kmeny enterokoků. Podíl na rozvoji enterokokové bakteriémie mají infekce močových cest a s nimi spojené zavedení močového katétru, dále také popáleniny či otevřené rány a rovněž intravenózní katétr (Murray, 1990). U enterokokových bakteriemií je poměrně vysoké riziko úmrtí, zvláště pokud se jedná o polymorbidní pacienty, kde může být riziko až 75 %. V případě *E. faecium* byla zaznamenána vyšší úmrtnost než u *E. faecalis* (Gilmore *et al.*, 2014).

U nedonošených novorozenců na jednotkách intenzivní péče byla zaznamenána i novorozenecká enterokoková seps, původcem byl *E. faecium*. K přenosu infekce nejspíše přispěly nasogastrické sondy a intravaskulární vstupy, které jsou na tomto oddělení nezbytné. Možné jsou i enterokokové infekce centrálního nervového systému (CNS). K těm ovšem přispívá primární onemocnění, které může oslabit imunitu, užívání antibiotik a invazivní zákroky spojené s CNS. U imunosuprimovaných jedinců může dojít také k infekcím břicha, jako například k peritonitidě, a k infekcím pánve (Murray, 1990).

Další onemocnění mohou enterokoky vyvolat v dutině ústní, u 80–90 % endodontických infekcí je původcem *E. faecalis*. Tyto infekce postihují kořenové kanálky zubů (Fisher a Phillips, 2009).

6.1.4 Virulence

Mezi klinickými izoláty byly zaznamenány druhy *Enterococcus* s vyšší virulencí než u izolátů z potravin. Mezi faktory, které ovlivňují virulenci enterokoků, patří i jejich schopnost kolonizovat gastrointestinální trakt (GIT), který je jejich přirozeným prostředím. Většina enterokokových infekcí je považována za endogenní, kdy se enterokoky dostanou přes epiteliální buňky střeva až do lymfatických uzlin, odkud se rozšíří do celého těla (Fisher a Phillips, 2009). Ovšem enterokoky a enterokokové plazmidy se přenášejí i mezi pacienty a enterokoky tak mohou být příčinou vzniku ohnisek infekce a také endemického šíření v rámci zdravotnického zařízení, a to po měsíce i roky. Některé komunitní enterokokové kmeny mají ve srovnání s endogenní enterokokovou flórou zvýšené schopnosti kolonizovat, pomnožit se, napadnout tkáň hostitele a přetrvávat.

Důležitým mechanismem pro počátek infekčního procesu je adheze bakterií na hostitelskou buňku. Enterokoky mají na svém povrchu adheziny, které zajišťují vazbu enterokoků na povrchy epiteliálních a endotelových buněk, dále na leukocyty nebo na

proteiny mezibuněčné hmoty. Ukázalo se, že tyto adheziny hrají různé role jako efektorové molekuly, které mohou podnítit nebo naopak snížit lokální zánětlivé reakce, a mají svou roli v procesu fagocytózy (Jett *et al.*, 1994).

Jedním z adhezínů je agregační substance, jde o povrchově vázaný protein, který je kódován feromonovými plazmidy *E. faecalis*. Agregační substance reaguje na indukci feromonů v buňkách, které feromonové plazmidy nemají, a je následně exprimována. Díky agregační substanci dojde k modifikaci buněčného povrchu donorové bakterie, aby lépe přilnula k potencionální recipientní hostitelské buňce. Tímto mechanismem dochází k agregaci buněk, čímž se usnadní přenos plazmidů (Dunny, 1990). Agregační substance také zvyšuje enterokokovou adhezenci k buňkám střevního a ledvinového epitelu, ale také k chlopnovému či nástěnnému endokardu (Jett *et al.*, 1994).

Extracelulární povrchový protein (Esp) je součástí buněčné stěny některých enterokoků. Kromě adheze a kolonizace se podílí také na vyhýbání se imunitnímu systému a má určitou roli při vzniku antibiotické rezistence. Esp přispívá i k tvorbě enterokokového biofilmu, díky kterému jsou enterokoky odolné vůči okolnímu prostředí. Další funkcí enterokokového biofilmu je adheze k eukaryotickým buňkám, jako jsou například buňky močových cest. Při narušení genu *esp* ztrácí *E. faecalis* schopnost vytvářet biofilm. Gen *esp* je pravděpodobně spojen s patogenitou, byl prokázán i u klinických izolátů *E. faecium*, u mléčných izolátů však zaznamenán nebyl (Fisher a Phillips, 2009).

Součástí povrchu buněčné stěny enterokoků je i kyselina lipoteichoová, která může také sloužit jako faktor virulence. Kyselina lipoteichoová usnadňuje přenos plazmidů a také moduluje zánětlivou odpověď v podobě produkce některých interleukinů. Je také možné, že poškození tkáně v místech infekce může vzniknout aktivací komplementu bakteriální lipoteichoovou kyselinou, která je navázána na plazmatické membráně hostitelské buňky (Jett *et al.*, 1994).

Enterokoky také produkují bakteriální toxin cytolysin, geny pro jeho produkci jsou součástí feromonových plazmidů. Cytolysin vykazuje β -hemolytickou aktivitu a působí baktericidně proti jiným grampozitivním bakteriím (Fisher a Phillips, 2009). Po expozici ultrafialovému záření může být hemolytická i baktericidní aktivita potlačena, ale pouze dočasně (Gilmore *et al.*, 2014). Podíl cytolytických kmenů *E. faecalis* je mnohem vyšší u klinických izolátů než u izolátů z jiných zdrojů. Vyšší je i riziko úmrtí při bakteriémii způsobené cytolytickými kmeny (Jett *et al.*, 1994).

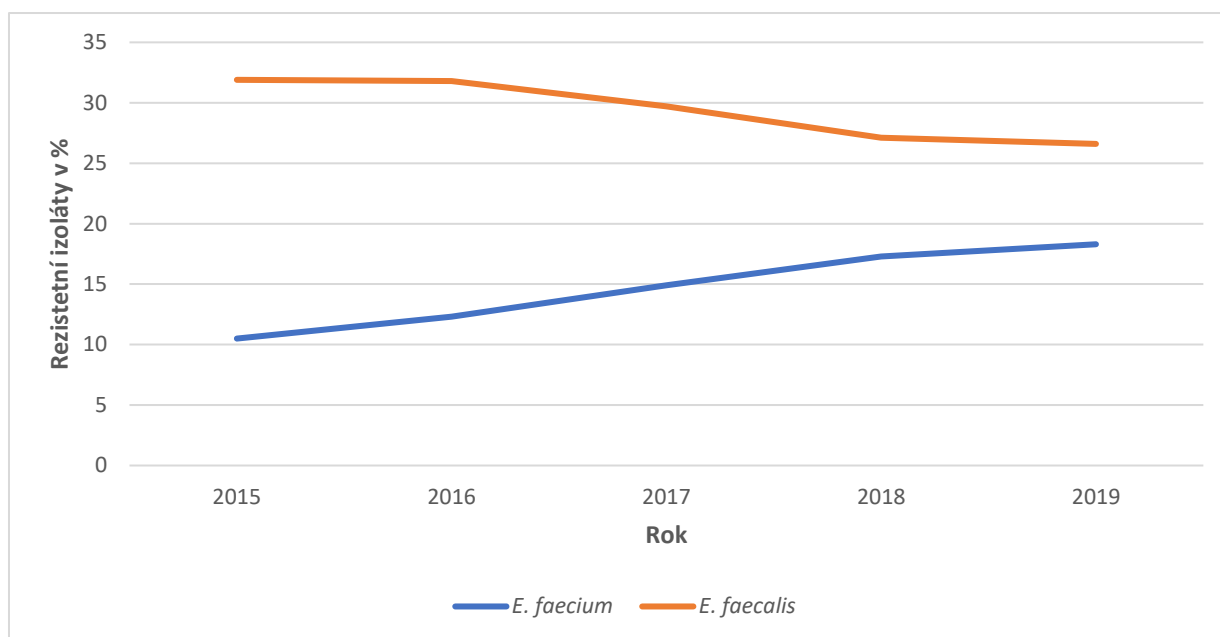
Na virulenci enterokoků se podílí také hydrolytické enzymy jako je hyaluronidáza, želatináza a serinová proteáza. Hyaluronidáza je degradační enzym, který působí na kyselinu hyaluronovou a může způsobit poškození tkání, čímž usnadňuje šíření enterokoků v hostitelské tkáni. Hlavní úlohou želatinázy a serinové proteázy je poskytování živin bakteriím pomocí degradace hostitelské tkáně a částečně se podílí i na tvorbě biofilmu (Fisher a Phillips, 2009). Vyšší frekvence výskytu kmenů *E. faecalis* s produkcí hydrolytických enzymů (hlavně želatinázy) byla zaznamenána u klinických izolátů v porovnání s izoláty z prostředí (Gilmore *et al.*, 2014).

6.1.5 Epidemiologie a ekologie

Hlavními původci humánních enterokokových infekčních onemocnění jsou *E. faecalis* a *E. faecium*. V 70. letech minulého století se enterokoky zařadily mezi hlavní infekční agens, která způsobují nozokomiální nákazy. V roce 2000 se v Evropě objevily nozokomiální infekce vyvolané *E. faecium* rezistentním na ampicilin, které nahradily infekce způsobené *E. faecalis*. V posledních dvou desetiletích se *E. faecium* rychle stal celosvětovým nozokomiálním patogenem, který se úspěšně přizpůsobil podmínkám v nozokomiálním prostředí a snadno získal rezistenci proti glykopeptidovým antibiotikům. Ve skutečnosti údaje z Evropského systému pro sledování antimikrobiální rezistence (EARSS – European Antimicrobial Resistance Surveillance System) z let 2002–2008 ukázaly největší nárůst (v průměru ročně o 19,3 %) počtu pozitivních hemokultur s nálezem *E. faecium* ve srovnání s nárůstem jiných patogenů jako *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* a *Enterococcus faecalis* (Zhou *et al.*, 2020).

Rozdílná je i distribuce druhů rodu *Enterococcus* v Evropě, *E. faecalis* a *E. faecium* jsou nejčastěji zachycovanými druhy ve Španělsku a Velké Británii. Ve Švédsku je výskyt *E. faecium* nižší, naopak tam stoupá počet izolátů *E. hirae*, ten je v Dánsku dokonce dominantním druhem (Kühn *et al.*, 2003).

Podle dat z EARSS se v Evropě podíl zachycených rezistentních izolátů *E. faecalis* v letech 2015–2019 postupně snižuje, naopak u rezistentních izolátů *E. faecium* byla zaznamenána vzestupná tendence (Graf 1) (ECDC, 2020).



Graf 1 Procentuální zastoupení izolátů s rezistentním fenotypem v letech 2015–2019

Zdroj dat: ECDC, EARS-Net, Surveillance Atlas of Infectious Diseases

Enterokoky najdeme také v gastrointestinálním traktu zvířat, nejčastěji jde o druhy *E. faecium* a *E. faecalis*, které byly izolovány z fekálních vzorků od hospodářských zvířat. V porovnání s lidskými fekálními vzorky je však u zvířat záchyt těchto druhů enterokoků nižší. Pravidelně jsou *E. faecalis* a *E. faecium* izolovány z uzenin, sýra, ryb, mletého vepřového a hovězího masa (Fisher a Phillips, 2009). Jednou z příčin této kontaminace může být proces odstraňování vnitřností na jatkách, kdy mohou fekální enterokoky kontaminovat potravinářské výrobky živočišného původu, k čemuž dochází až u 90 % vzorků a většinou se jedná o *E. faecalis*, následovaný *E. faecium* (Toress *et al.*, 2018).

Enterokoky jsou také přirozenou součástí povrchu rostlin, nejčastěji se jedná o druhy *E. mundtii* a *E. casseliflavus*, ale byly izolovány i druhy *E. faecalis*, *E. faecium* a *E. sulfureus*. Rostliny, u kterých byl záchyt zaznamenán, nebyly součástí pastvin ani zemědělské půdy, byla tedy vyloučena kontaminace zvířecími výkaly (Fisher a Phillips, 2009; Müller *et al.*, 2001).

Na přítomnost enterokoků byly testovány i vzorky zemědělských půd, a to nejen těch ošetřených živočišnými hnojivy, ale i těch, které nebyly hnojeny vůbec. Vyšší záchyt enterokoků (přibližně v 50 %) byl dle očekávání ve vzorcích z hnojených polí a pastvin, ale i u nehnojených zemědělských půd byly zaznamenány zástupci rodu *Enterococcus*, a to přibližně u 30 % vzorků (Kühn *et al.*, 2003).

Dalším prostředím, kde lze enterokoky zachytit, je voda. Vzhledem k jejich přítomnosti v lidských a zvířecích výkalech a jejich odolnosti v okolním prostředí jsou enterokoky považovány za indikátory fekálního znečištění ve vodě (Torres *et al.*, 2018). Kromě sladkovodních zdrojů byly enterokoky nalezeny také ve slané vodě, v mořských sedimentech a řasách, což potvrzuje jejich schopnost růstu a přežití ve slaném prostředí (Byappanahalli, 2012).

6.1.6 Léčba

Ve srovnání se streptokoky jsou enterokoky přirozeně rezistentní na mnoho běžně používaných antimikrobiálních látek. V případě penicilinu a ampicilinu byla zjištěna nízká citlivost, a to u všech druhů enterokoků. U všech semisyntetických penicilinů a cefalosporinů byla zaznamenána vysoká rezistence, a to v důsledku exprese nízkoafinitních proteinů vázajících penicilin. Enterokoky jsou přirozeně rezistentní také k aminoglykosidům v nižších koncentracích, které lze použít jako terapeutické dávky antibiotik (Gilmore *et al.*, 2014). Přirozeně rezistentní jsou enterokoky dále k linkosamidům a sulfonamidům. Získaná rezistence je u enterokoků zprostředkována prostřednictvím přenosu plazmidů nebo transpozonů z jiných mikroorganismů. Tímto způsobem získávají enterokoky rezistenci vůči chloramfenikolu, erytromycinu, fluorochinolonům, tetracyklinům, penicilinu, ampicilinu, aminoglykosidům (gentamicin, kanamycin a streptomycin) a glykopeptidům, zejména vankomycinu.

Lékem volby je ampicilin a aminoglykosidy, ty lze ovšem použít pouze u kmenů citlivých k těmto antibiotikům. U infekcí, které jsou způsobeny kmeny enterokoků rezistentních k aminoglykosidům, jsou alternativními antibiotiky glykopeptidy, tedy vankomycin a teikoplanin. Tato antibiotika se používají i u pacientů s alergií na penicilin, ampicilin a aminoglykosidy. Výjimkou jsou glykopeptid rezistentní enterokoky (GRE), kde bylo třeba najít nová antibiotika nebo vhodnou kombinaci těch stávajících (Braňek *et al.*, 2019).

Kombinovaná terapie byla použita u infekční endokarditidy, kdy bylo využito synergického působení gentamicinu a ceftriaxonu, tato antibiotika jsou při samostatném použití na GRE neúčinná (Faron *et al.*, 2016). Po roce 2000 byla pro léčbu pacientů s GRE zavedena nová antibiotika: linezolid (oxazolidinon), daptomycin (lipopeptid), tigecyklin (glycylcyklin – 3. generace tetracyklinů) a chinupristin-dalfopristin (streptograminy) (Willems a Bonten, 2007; Braňek *et al.*, 2019).

Rezistence vůči linezolidu byla zaznamenána krátce po jeho užití v praxi a byl také izolován nozokomiální kmen GRE (*E. faecium*) rezistentní k linezolidu (Willems a Bonten, 2007). I přesto se prevalence linezolid rezistentních enterokoků pohybuje pod hranicí 1 % a linezolid je účinný jak proti *E. faecium*, tak i proti *E. faecalis* (Bender *et al.*, 2018).

Většina enterokokových izolátů (> 99,8 %) je citlivých k daptomycinu. Toto antibiotikum má nízký potenciál pro rozvoj rezistence *in vitro*. Výskyt enterokoků rezistentních k daptomycinu je nejčastěji spojen s předchozím užíváním tohoto antibiotika nebo je neúčinnost zapříčiněna podáním v nízké dávce. Daptomycin se používá i v kombinované terapii enterokokových infekcí, např. s ampicilinem (Bender *et al.*, 2018; Willems a Bonten, 2007).

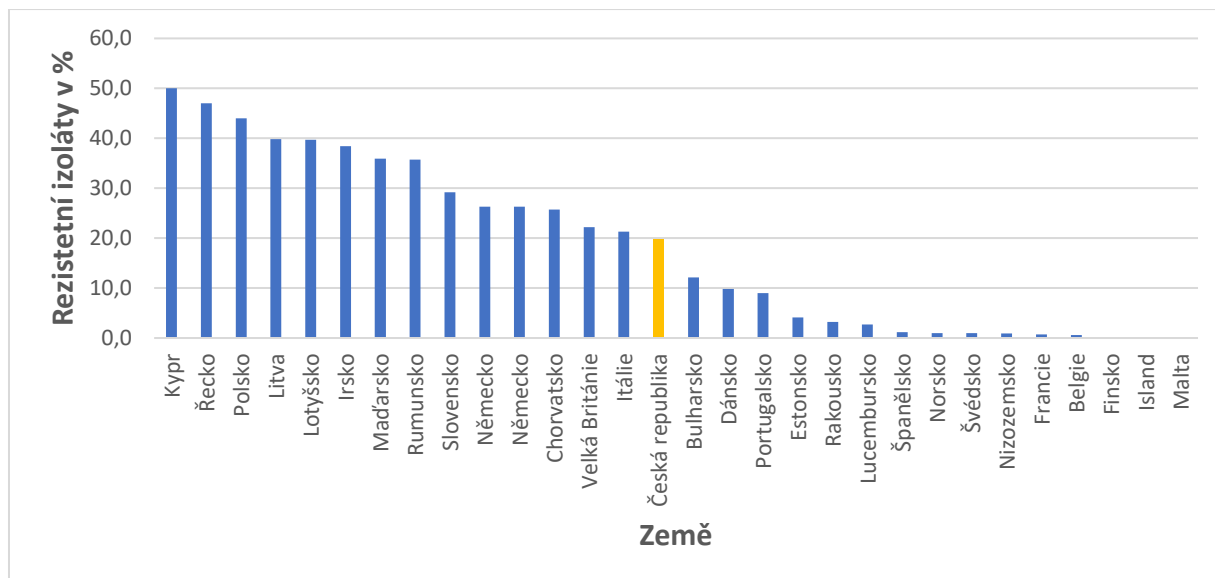
V případě tigecyklinu byla zjištěna vysoká úroveň citlivosti k tomuto antibiotiku, a to u klinických izolátů enterokoků z celého světa (> 99,7 %, *E. faecalis* a *E. faecium*). V průběhu času nebylo zaznamenáno zvyšování rezistence, která se pohybuje pod 1 % (Bender *et al.*, 2018).

Antibiotika chinupristin-dalfopristin lze použít při léčbě infekcí způsobených rezistentním kmenem *E. faecium*, v případě *E. faecalis* jsou neúčinná. Léčba vyššími dávkami těchto antibiotik může způsobit bolesti svalů a kloubů. Úspěšnost terapie různých infekcí GRE je pouze okolo 66 %. Kvůli nežádoucím účinkům a selhání terapie jsou chinupristin-dalfopristin považovány za alternativní terapii, která je využita až po neúspěšném podání linezolidu nebo daptomycinu (O'Driscoll a Crank, 2015).

6.1.7 Vankomycin rezistentní enterokoky

První vankomycin rezistentní enterokok byl izolován v roce 1986 v Anglii a ve Francii, jednalo se o druh *E. faecium*. O rok později byl v USA zachycen první vankomycin rezistentní *E. faecalis* (O'Driscoll a Crank, 2015). V 90. letech 20. století bylo v USA téměř 18 % nozokomiálních VRE příčinou infekcí krevního řečiště a 25,2 % VRE bylo zachyceno u pacientů na jednotkách intenzivní péče (Gold, 2001). Naopak v Evropě docházelo spíše ke komunitnímu přenosu VRE, kdy častým zdrojem infekce byly kontaminované živočišné produkty. Po roce 2000 se VRE rozšířily i v evropských nemocnicích a následně došlo i k celosvětovému šíření. V roce 2002 pak byl nahlášen první případ přenosu genu rezistence na vankomycin z VRE na meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA). Tyto nové vankomycin rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus* jsou označovány jako VRSA (O'Driscoll a Crank, 2015). V roce 2019 byl v Evropě nejvyšší záchyt VRE na Kypru, v Řecku a v Polsku (Graf 2) a to více

než 40 % z celkového počtu rezistentních klinických izolátů enterokoků (ECDC, EARS-Net, 2020).



Graf 2 Záchyt VRE izolátů v Evropě v roce 2019

Zdroj dat: ECDC, EARS-Net, Surveillance Atlas of Infectious Diseases

Rozdíl v šíření mezi Severní Amerikou a Evropou se stal zajímavým aspektem epidemiologie VRE. Jednou z možných příčin bylo veterinární použití velkého množství glykopeptidového antibiotika avoparcinu (Gold, 2001). Avoparcin jako účinný růstový stimulant byl v roce 1975 používán nejen v Evropě, ale také v Austrálii a několika dalších zemích, zatímco v USA a Kanadě nebyl povolen. Následně byl v evropských chovech zvířat pozorován zvýšený výskyt VRE, ovšem na zvířecích farmách v USA byla situace jiná, žádné izoláty VRE nebyly zachyceny. Proto bylo používání glykopeptidu avoparcinu pro podporu růstu zvířat v Evropě zakázáno a dle očekávání došlo k rychlému poklesu VRE na evropských farmách, ovšem k úplnému vymizení VRE nedošlo (Braïek *et al.*, 2019).

U evropských zemědělců byly zachyceny VRE stejného typu jako u hospodářských zvířat a masných výrobků dostupných spotřebitelům. I přesto jsou počty nozokomiálních infekcí způsobených VRE v Evropě relativně nízké. Naproti tomu v Severní Americe jsou tyto nozokomiální nákazy vážným problémem, ovšem mimo nemocniční prostředí je záchyt VRE naprosto minimální. Je také možné, že k tomuto paradoxu mohou přispívat rozdíly v předepisování antibiotik v Evropě a ve Spojených státech (Gold, 2001).

Pacientům v USA je podáváno mnohonásobně větší množství vankomycinu než v Evropě. V řadě studií bylo prokázáno jasné spojení mezi užíváním vankomycinu a následným záchytem VRE. Předchozí léčba vankomycinem je tedy důležitým rizikovým faktorem pro kolonizaci VRE s možným následným rozvojem enterokokové infekce. K šíření VRE ve zdravotnických zařízeních přispívají i zdravotničtí pracovníci, u nichž v průběhu 90. let 20. století výrazně stoupla kolonizace VRE a byly zaznamenány i pozitivní izoláty z rukou zdravotnického personálu (Malathum a Murray, 1999). Dalšími rizikovými faktory pro kolonizaci VRE či vznik infekce způsobené VRE je i délka pobytu pacienta v nemocnici, jeho základní onemocnění, hlavně jeho závažnost, a rovněž zavedené katétry. Díky odolnosti enterokoků a jejich schopnosti přežít na površích lze za riziková pokládat nemocniční lůžka a další vybavení nemocničních pokojů, ale také předměty jako např. teploměry nebo fyzioterapeutické pomůcky (Gold, 2001).

U enterokoků byla do současné doby získaná glykopeptidová rezistence zaznamenána v osmi fenotypových variantách (VanA, VanB, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM a VanN), popsán byl i jeden typ přirozené rezistence (VanC), který se vyskytuje u *E. gallinarum* a *E. casseliflavus* (Tabulka 1) (O'Driscoll a Crank, 2015).

Tabulka 1 Charakteristika fenotypů rezistence ke glykopeptidům u rodu *Enterococcus*

Rezistence	Získaná								Přirozená
	Vysoká		Variabilní	Střední	Nízká				Nízká
Fenotyp	vanA	vanM	vanB	vanD	vanE	vanG	vanL	vanN	vanC
Vancomycin MIC (mg/l)	64-1024	>256	4-1024	64-128	8-32	≤16	8	16	2-32
Teikoplanin MIC (mg/l)	16-512	96	0,5-1	4-64	0,5	citlivý	≤0,5	≤0,5	0,5-1
Modifikace	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser
Umístění	Plazmid nebo chromozom	Plazmid nebo chromozom	Plazmid nebo chromozom	Plazmid nebo chromozom	Chromozom	Chromozom	Chromozom	Plazmid	Chromozom
Možnost přenosu	Ano	Ano	Ano	Ne	Ne	Ano	Ne	Ano	Ne
Expese	Inducibilní	Inducibilní	Inducibilní	Konstitutivní nebo inducibilní	Inducibilní	Inducibilní	Inducibilní	Konstitutivní	Konstitutivní nebo inducibilní
Výskyt u druhu	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>

Zdroj: O'Driscoll, T., Crank, C.W. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infection and Drug Resistance*. 2015, 8, 217–230.

Tyto fenotypové varianty kódují stejnojmenné geny rezistence na glykopeptidy. Vysokou úroveň rezistence na vankomycin a teikoplanin indukuje gen rezistence *vanA*, který naležeme u *E. faecium*. Zatímco gen *vanB* indukuje sice několik úrovní rezistence

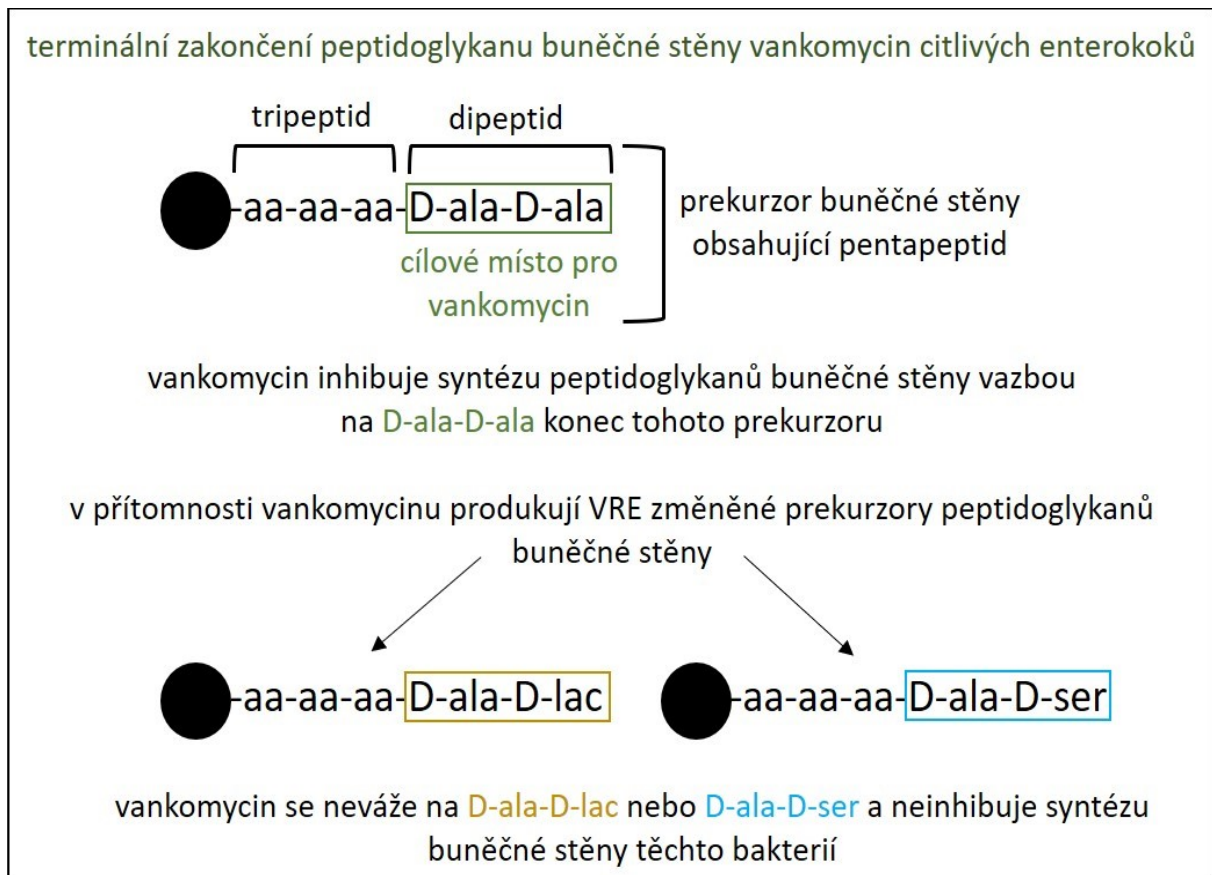
na vankomycin, ale nikoli rezistenci na teikoplanin. Pouze geny *vanA* a *vanB* mohou být přeneseny jak horizontálním, tak i vertikálním přenosem genetické informace. Gen *vanM* stejně jako *vanA* indukuje vysokou úroveň rezistence. Gen *vanC* indukuje nízkou hladinu rezistence vůči vankomycinu, zatímco zůstává kmen nesoucí tento gen citlivý na teikoplanin. Nízkou až střední rezistenci vůči vankomycinu kódují geny *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL* a *vanN* (Braňek *et al.*, 2019; O'Driscoll a Crank, 2015).

Součástí bakteriální stěny grampozitivních bakterií jsou peptidoglykany, jejichž prekurzory pentapeptidy jsou syntetizovány v cytoplazmě a následně přesunuty na povrch buňky. C-terminální konce těchto pentapeptidů obsahují D-alanyl-D-alanin (D-ala-D-ala). Následnou transglykosylací se tyto prekurzory začlení do vznikajícího peptidoglykanu, zpevnění buněčné stěny pak zajišťuje transpeptidace tvorbou příčných vazeb. Vankomycin a teikoplanin mají vysokou afinitu k C-terminálnímu zakončení pentapeptidových prekurzorů D-ala-D-ala, po navázání pak inhibují další syntézu peptidoglykanu. Tato jejich vlastnost je podstatou antimikrobiálního účinku na grampozitivní bakterie.

V přítomnosti vankomycinu začnou VRE syntetizovat místo prekurzorů pentapeptidů D-ala-D-ala nízkoafinitní D-ala-D-laktát (D-ala-D-lac) nebo D-ala-D-serin (D-ala-D-ser). Tím dojde ke změně cílového místa pro vankomycin, což následně vede ke glykopeptidové rezistenci (Obrázek 4). Až 1000násobné snížení afinity k vankomycinu nastává změnou prekurzoru na D-ala-D-lac (u fenotypových variant VanA, VanB, VanD, VanM), pouze 7násobné snížení afinity k vankomycinu způsobí D-ala-D-ser (u fenotypových variant VanC, VanE, VanG, VanL, VanN) (O'Driscoll a Crank, 2015).

Klinicky nejvýznamnější jsou izoláty VRE s genotypem *vanA* a *vanB*, a to právě díky možnosti horizontálního i vertikálního přenosu genu rezistence. Izoláty VanA jsou obvykle vysoce rezistentní k vankomycinu (MIC \geq 64 mg/l) a teikoplaninu (MIC \geq 8 mg/l). Genový klastř *vanA*, který kóduje tuto rezistenci, je často umístěn na transpozonu Tn1546, ale lze ho najít i na transpozonu Tn5482 a některých dalších. Tyto transpozibilní elementy jsou součástí bakteriálních chromozomů, ale také je najdeme jak na přenosných, tak i na nepřenosných plazmidech. Gen *vanA* byl zaznamenán především u *E. faecium*, ale také u *E. faecalis*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. mundtii*, *E. casseliflavus* a *E. raffinosus*. V případě izolátů VanB byla zjištěna variabilní hladina rezistence k vankomycinu (MIC 4-1024 mg/l), ale jsou zpravidla citlivé k teikoplaninu (MIC \leq 1 mg/l). Genový klastř *vanB* je součástí

bakteriálního chromozomu, ojediněle byl nalezen na transpozonu Tn1547 a také na plazmidech, kde byl spojen s genem rezistence vůči gentamicinu. Nedávno byla objevena genetická vazba mezi transpozonem Tn5382 obsahujícím *vanB* a genem *pbp5*, který kóduje rezistenci k ampicilinu. Klastř genů *vanB* byl identifikován především u *E. faecalis* a *E. faecium*, ale tyto geny nesou i vzácně izoláty *E. casseliflavus* a *E. gallinarum* (Malathum a Murray, 1999).



Obrázek 4 Rozdíly v prekurzorech peptidoglykanu buněčné stěny citlivých a rezistentních enterokoků

Zdroj obrázku: Murray, B.E. Vancomycin-resistant enterococci. *American Journal of Medicine*. 1997, 102(3), 284–293. Vysvětlivky: aa – aminokyseliny, ala – alanyl, lac – laktát, ser – serin

6.2 Rezistence

6.2.1 Rezistence proti antimikrobiálním látkám

Díky objevu a následnému rutinnímu užívání antimikrobiálních látek došlo ke změně lékařských postupů a léčba infekčních onemocnění se stala účinnější. Antibiotika se rychle stala součástí mnoha komplexních lékařských postupů jako jsou chirurgické zásahy, transplantace solidních orgánů nebo při léčbě pacientů

s rakovinou (Munita a Arias, 2016). Nárůst rezistence vůči antibiotikům tak může mít dopad na lidské zdraví, a to nejen v případě léčby infekcí, ale v ohrožení jsou i pacienti, u kterých se antibiotika užívají jako prevence nebo k léčbě přidružených infekcí (Martinez, 2014).

Při srovnání infekcí způsobených citlivými bakteriemi jsou infekce způsobené multirezistentními mikroorganismy spojeny se zvýšenou úmrtností a roli hraje i vyšší ekonomická zátěž při léčbě. Příčinou je omezený výběr účinných antibiotik, následkem jsou pak těžko léčitelné infekce s omezeným množstvím alternativních postupů. Na základě těchto zkušeností označila Světová zdravotnická organizace antibiotickou rezistenci za jednu ze tří nejvýznamnějších hrozeb pro veřejné zdraví 21. století (Munita a Arias, 2016).

6.2.1.1 Rezistence primární (přirozená)

Už od pradávna docházelo mezi organismy a okolním prostředím k vzájemnému působení, antimikrobiální rezistence je tedy odvěkým nástrojem obrany těchto organismů (Munita a Arias, 2016). Primární (přirozená) rezistence existovala i před použitím antibiotik v podobě snížené propustnosti buněčné stěny nebo nedostatečné citlivosti cílové struktury pro danou látku (Martinez, 2014). Bakterie jsou geneticky variabilní, mohou reagovat na podněty z okolního prostředí, tedy i na molekuly antibiotik, které je mohou ohrozit. Přirozená rezistence tedy umožňuje bakteriím odolávat škodlivému účinku antibiotik a v jejich přítomnosti dokonce nadále prosperovat (Munita a Arias, 2016).

Primární (přirozená) rezistence je nezávislá na horizontálním přenosu genů (HGT) a rovněž nepodléhá selekčnímu tlaku antibiotik (Cox a Wright, 2013). Fenotyp rezistence může být kódován r geny, které jsou součástí bakteriálního genomu a jejich populace v přírodě je nazývána jako environmentální antibiotický rezistom. Genová amplifikace je pak častou genetickou cestou ke zvýšené rezistenci na antibiotika, například pokud jde o rezistenci na sulfonamidy a trimetoprim (Davies a Davies, 2010).

Fenotyp multirezistence (MDR) je jedním z příkladů vnitřní rezistence k antibiotikům a můžeme ho najít hlavně u gramnegativních bakterií. Ty jsou necitlivé k mnoha klinicky účinným antibiotikům na grampozitivní bakterie. Vnější membrána gramnegativních bakterií je nepropustná pro mnoho molekul a obsahuje řadu MDR efluxních pump, které účinně snižují intracelulární koncentraci řady látek (Cox a Wright, 2013).

6.2.1.2 Rezistence sekundární (získaná)

Pro klinickou praxi je větším problémem sekundární (získaná) rezistence, kdy původně citlivá bakteriální populace získá rezistenci k antimikrobiálním látkám. Bakterie mají dvě hlavní genetické strategie, mohou reagovat na mechanismus účinku dané látky mutací ve vlastním genu (genech) nebo získají cizí DNA, která již změněné geny obsahuje, a to prostřednictvím HGT (Munita a Arias, 2016).

Na mutacích vedoucích k rezistenci na antibiotika se obvykle podílí tři typy genů. První typ kóduje cílová místa pro antibiotika, druhý typ kóduje přenašeče antibiotik a třetí typ kóduje regulátory, které potlačují expresi přenašečů, chromozomálně kódovaných enzymů nebo víceúčelových efluxních pump (Martinez, 2014).

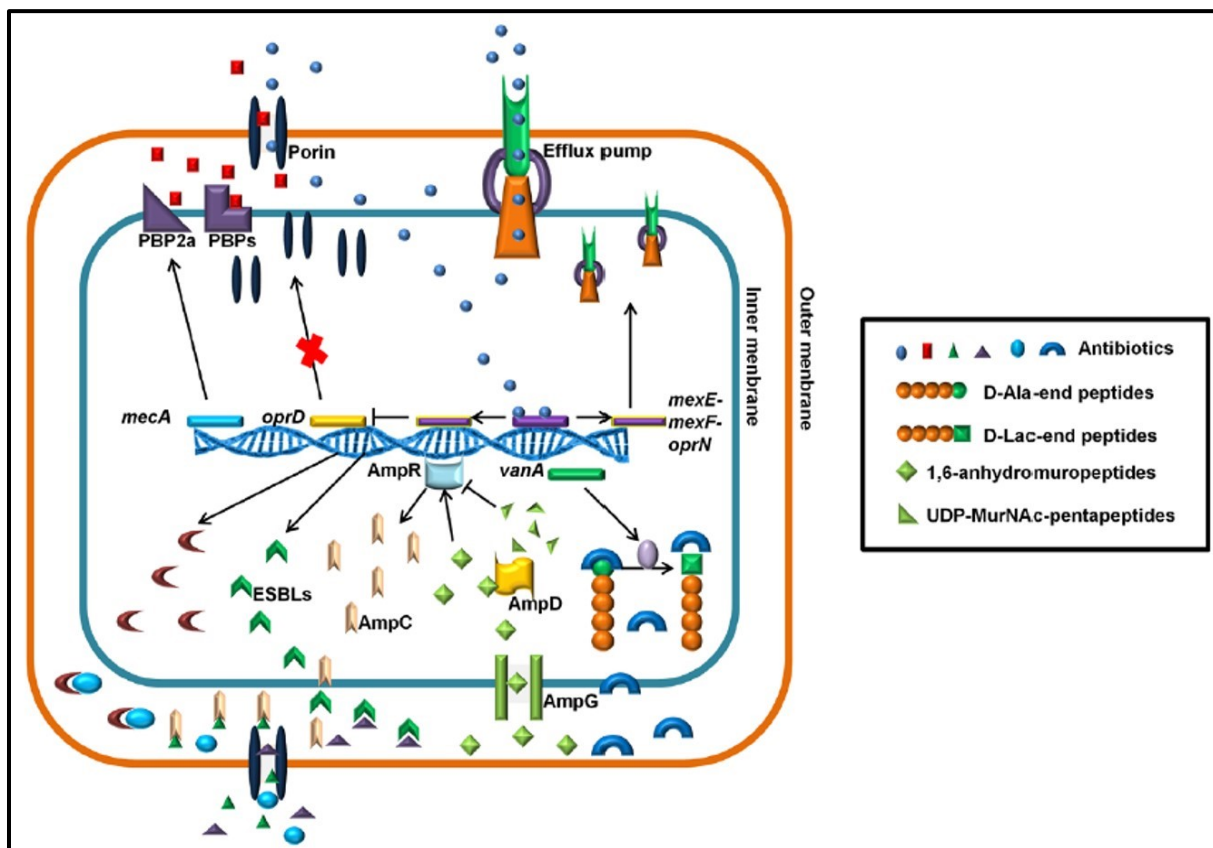
Bakterie získávají externí genetický materiál třemi způsoby. První možností je transformace, tedy začlenění cizí DNA, další možností je transdukce, která je zprostředkována fágem, a poslední možností je konjugace, kdy dochází k vzájemnému spojení bakterií a přenosu genetické informace. Nejjednodušším způsobem HGT je transformace, ovšem té jsou schopny jen některé bakteriální druhy. V nemocničním prostředí se při vzniku rezistence uplatňuje konjugace, kdy dochází ke kontaktu bakterií. Děje se tak pravděpodobně při léčbě antibiotiky, přenos genů je rychlý a probíhá hlavně v GIT.

Na konjugaci se zpravidla podílí mobilní genetické prvky (MGE), ale byl popsán i přímý přenos z chromozomu na chromozom. Klíčovou roli v šíření antimikrobiální rezistence tedy hrají mobilní genetické elementy jako jsou plazmidy a transpozony. Pro akumulaci genů antimikrobiální rezistence existují účinné mechanismy v podobě integronů. Jedná se o specifické rekombinační systémy, které jsou schopny přijímat otevřené čtecí rámce, a to ve formě mobilních genových kazet. Tento jednoduchý mechanismus zajišťuje přidání nových genů do bakteriálního chromozomu včetně aparátu pro jejich expresi. Tyto genetické výměny jsou jedním z hlavních faktorů přispívajících k evoluci bakterií (Munita a Arias, 2016).

6.2.1.3 Mechanismy rezistence

Aby byla antibiotika účinná, usmrcovala bakterie nebo inhibovala jejich růst, musí nejdříve překonat buněčné obaly. V případě některých antibiotik musí pak dojít k jejich aktivaci. Ovšem všechny antimikrobiální látky musí dosáhnout své cílové struktury v dostatečně vysoké koncentraci, aby byl zachován jejich účinek. Tyto kroky jsou základem klasických mechanismů rezistence. Z biochemického hlediska lze

rozdělit mechanismy na ty, které buď pozmění cílovou strukturu pro antibiotika, nebo sníží koncentraci samotného antibiotika, a to buď cestou inaktivace pomocí enzymů nebo zamezením průniku antibiotika do bakterie (Martinez, 2014). Tyto vlastnosti umožňující antibiotickou rezistenci, mají např. β -laktamázy s rozšířeným spektrem (ESBL), AmpC β -laktamázy, karbapenemázy, stafylokokový kazetový chromozom *mec* (SCC*mec*), VanA ligáza, dalšími důležitými mechanismy antibiotické rezistence jsou také změny struktury porinů a aktivní efluxní pumpy (Obrázek 5) (Xia *et al.*, 2016).



Obrázek 5 Molekulární mechanismy antibiotické rezistence

Zdroj obrázku: Xia, J., Gao, J., Tang, W. Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Bioscience Trends*. 2016, 10(1), 14–21.

Změny cílové struktury pro antibiotika

Při vývoji antimikrobiální rezistence je nejběžnějším postupem bakterií modifikovat cílové struktury pro antibiotikum, čímž dojde k eliminaci jeho účinku. Tohoto výsledku lze dosáhnout různými mechanismy, ať už jde o ochranu cílové struktury, kdy antibiotikum nemůže dosáhnout své cílové struktury, nebo dojde ke změně struktury cílového místa, která vede ke snížení afinity k molekule antibiotika.

Ochranu cílové struktury zajišťují např. proteiny rezistence k tetracyklinům Tet(M) a Tet(O), které patří mezi GTPázy (guanosintrifosfatáza). Tet(M) byl původně popsán u *Streptococcus* spp. a Tet(O) u *Campylobacter jejuni*, ale nyní jsou oba rozšířeny mezi různými bakteriálními druhy. K tomuto rozšíření nejspíše přispěl fakt, že byly nalezeny v několika plazmidech a v konjugativních transpozonech širokého dosahu. Tet(O) a Tet(M) vytěsňují tetracyklin z jeho vazebného místa, a to díky jejich interakci s ribozomem.

Schopnost ochrany cílové struktury má i protein rezistence k chinolonům Qnr, který je exprimován plazmidy a často se vyskytuje v klinických izolátech, např. u *Klebsiella pneumoniae*. Qnr patří mezi proteiny s pentapeptidovými repeticemi a působí jako homolog DNA, který soutěží o vazebné místo DNA gyrázy a topoizomerázy IV. Právě díky tomuto snížení interakce mezi DNA gyrázou a DNA dochází také ke snížení možnosti molekuly chinolonu vytvořit a stabilizovat komplex DNA-chinolonu s gyrázou, který by jinak způsobil smrt buňky (Munita a Arias, 2016).

Modifikace cílové struktury je jedním z nejčastějších mechanismů antibiotické rezistence. Schopnost této modifikace má např. mobilní genetický element SCC*mec*, přítomný u rezistentních kmenů *Staphylococcus*. Tato genetická sekvence obsahuje gen *mecA*, který kóduje rezistentní proteiny vůči meticilinu. U stafylokoků je tento gen jako jediný, který se šíří v přírodě pomocí HGT. Po přijetí do bakterie je *mecA* integrován do chromozomu *Staphylococcus aureus*, jeho působení pak vede k rezistenci vůči meticilinu a dalším β -laktamovým antibiotikům, a to prostřednictvím penicilin vázajícího proteinu 2a (PBP2a), který je kódován právě genem *mecA* a značně se liší od dřívějších penicilin vázajících proteinů, protože mutace změnily jeho konformaci tak, aby bylo pro meticilin nebo jiná β -laktamová antibiotika obtížné navázat se na jeho cílovou strukturu. PBP2a tak může nepřetržitě podporovat transpeptidaci potřebnou k zesíťování peptidoglykanu, aby mohla probíhat syntéza buněčné stěny, a to i v přítomnosti antibiotik (Xia *et al.*, 2016).

K modifikaci cílové struktury dochází i v případě glykopeptidové rezistence. Glykopeptidy se vážou na C-terminální dipeptid D-Ala-D-Ala v pentapeptidové části prekursoru peptidoglykanu buněčné stěny, čímž znemožní tvorbu transpeptidové vazby s dalšími složkami buněčné stěny, to způsobí snížení integrity, a nakonec vede k buněčné smrti. Rezistence ke glykopeptidům je u *Enterococcus* spp. zprostředkována operonem rezistence k vankomycinu (Van), který může být přenášen chromozomálně nebo extrachromozomálně pomocí plazmidu. Operon Van obsahuje

regulační systém *vanS-vanR*, gen *vanH* pro D-laktátdehydrogenázu, gen *vanX* pro D-Ala-D-Ala dipeptidázu, a variabilní ligázy, u níž bylo identifikováno 9 genových variant (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* a *vanN*). Jejich exprese zajišťuje dvousložkový systém VanS/R, který zaznamená poškození buněčné membrány, a to nejen působením glykopeptidů, ale i bacitracinu nebo polymyxinu B. Právě tato variabilita ligázového genu je zásadní při určování úrovně rezistence k vankomycinu, zda bude nízká, střední nebo vysoká. Nejčastěji byly identifikovanými geny *vanA*, *vanB* a *vanC* (Faron *et al.*, 2016).

Inaktivace antibiotik působením enzymů

Produkce antibiotikum inhibujícího enzymu je další možností, jak se bakterie mohou vypořádat s přítomností antibiotika. Tyto enzymy jsou schopné inaktivovat antibiotikum navázáním specifických chemických prvků k jejich molekule nebo úplným poškozením jejich molekuly, čímž znemožní interakci antibiotika s jeho cílovou strukturou. Existuje mnoho typů modifikujících enzymů, které katalyzují různé biochemické reakce. Mezi ty nejčastější patří acetylace (aminoglykosidy, chloramfenikol, streptograminy), fosforylace (aminoglykosidy, chloramfenikol) a adenylace (aminoglykosidy, linkosamidy). Nezávisle na typu biochemické reakce je výsledným účinkem snížení schopnosti antibiotik navázat se na cílovou strukturu bakterií.

Rezistence prostřednictvím chemické změny antibiotik je zprostředkována např. pomocí enzymu modifikujícího aminoglykosidy (AME), který působí na hydroxylové nebo aminoskupiny molekuly aminoglykosidu. Celosvětově bylo popsáno více typů AME, tyto enzymy jsou považovány za hlavní příčinu rezistence vůči aminoglykosidům. Geny kódující AME jsou obvykle uloženy v MGE, ale byly nalezeny také jako součást chromozomu u některých bakteriálních druhů, jako např. u *Providencia stuartii*, *Enterococcus faecium* a *Serratia marcescens*.

Enzymaticky katalyzovaná změna antibiotika je i podstatou chemické modifikace chloramfenikolu. Toto antibiotikum inhibuje syntézu proteinů, a to ve spolupráci s peptidyl-transferovým centrem 50S ribozomální podjednotky bakterií. Chemická modifikace chloramfenikolu je zprostředkována především expesí chloramfenikol acetyltransferáz (CAT). U gram pozitivních i gram negativních bakterií bylo popsáno více genů pro CAT, některé vedou k vysoké úrovni rezistence vůči chloramfenikolu, jiné naopak k nízké úrovni této rezistence. Nositeli těchto genů jsou

obvykle MGE, a to konkrétně plazmidy a transpozony, tyto geny však byly zaznamenány i jako součásti chromozomů některých bakterií (Munita a Arias, 2016).

Skupinou enzymů, které jsou schopné eliminovat amidovou vazbu β -laktamového kruhu, čímž se antimikrobiální látka stává neúčinnou, jsou β -laktamázy. Do této skupiny patří hlavně širokospektré β -laktamázy (ESBL), což jsou plazmidy kódované laktamázy, které jsou schopny hydrolyzovat širokospektré cefalosporiny. Různé ESBL jsou produkovány gramnegativními bakteriemi, jako jsou *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* a *Pseudomonas aeruginosa*. Bakterie produkující ESBL tedy získávají rezistenci díky schopnosti ESBL hydrolyzovat velké množství β -laktamových antibiotik, což komplikuje léčbu infekcí způsobených těmito bakteriemi. Léčbu komplikuje i skutečnost, že plazmidy, které nesou geny kódující ESBL obvykle obsahují také geny způsobující rezistenci k aminoglykosidům a trimetoprimu/sulfamethoxazolu.

Dále je třeba zmínit AmpC β -laktamázy, které jsou produkovány u mnoha gramnegativních bakterií, a podporují vznik rezistence vůči cefalosporinům např. u *Enterobacter cloacae*, u této bakterie jsou příslušné geny součástí bakteriálního chromozomu. AmpC β -laktamázy, jejichž kódující geny jsou součástí plazmidů, najdeme u *Escherichia coli* a také u klebsiel a salmonel. Zatím je známo více než dvacet AmpC β -laktamáz, jejichž kódující geny jsou umístěny na plazmidech. V pravidelném procesu recyklace buněčné stěny dochází ke vzniku peptidů, které vytvářejí struktury, ty inhibují expresi AmpC β -laktamáz, což vede k nízkým hladinám AmpC β -laktamáz v periplazmatickém prostoru. Po průniku antibiotik jako např. cefoxitinu a imipenemu do periplazmatického prostoru, dojde k jejich navázání na β -laktamovou cílovou strukturu penicilin vázajícího proteinu (PBP), což v několika krocích zvýší expresi AmpC β -laktamázy, která začne hydrolyzovat příslušná antibiotika. V momentě, kdy dojde k poklesu koncentrace antibiotika pod jistou úroveň, tak se exprese AmpC β -laktamázy opět sníží (jedná se o tzv. inducibilní rezistenci).

Karbapenemázy jsou druhem β -laktamáz, které hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny a karbapenemy. Bakterie, které produkují karbapenemázu, často způsobují nozokomiální infekce. Karbapenemázy jsou kódovány geny na plazmidech u *Klebsiella pneumoniae*, najdeme je také u *Acinetobacter baumannii* a *Pseudomonas aeruginosa*, v současné době se celosvětově zvyšuje produkce této třídy β -laktamáz u enterobakterií (Xia *et al.*, 2016).

Omezení průniku ATB do buňky nebo jeho eflux ven z buňky

U mnoha antibiotik používaných v klinické praxi se jejich cílová struktura nachází buď intracelulárně nebo v periplazmatickém prostoru. Molekuly antibiotik proto musí proniknout přes vnější membránu a/nebo vnitřní cytoplazmatickou membránu, aby mohly uplatnit svůj antimikrobiální účinek. Vnější membrána totiž funguje jako první linie obrany proti průniku mnoha toxických sloučenin, včetně několika antimikrobiálních látek. Změny v propustnosti vnější membrány ovlivňují zvláště antibiotika s hydrofilními molekulami, jako jsou β -laktamy, tetracykliny a některé fluorochinolony. Tato antibiotika se přes vnější membránu dostávají difúzí pomocí porinů, což jsou vodou naplněné kanály, které jsou součástí vnější membrány (Munita a Arias, 2016).

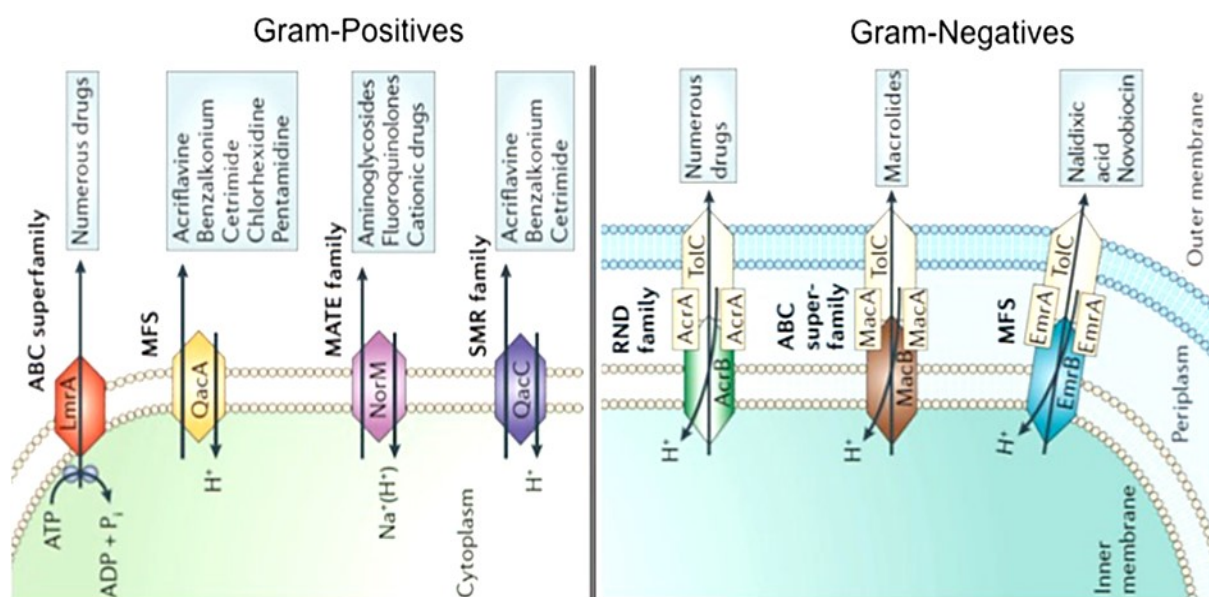
Vnější membrána gramnegativních bakterií obsahuje porin D (OprD, Outer membrane porin D). Najdeme ho např. u *Pseudomonas aeruginosa*, u které byla zaznamenána rezistence k imipenemu, která souvisí se změnami porinu OprD. Tato rezistence je způsobena snížením transkripce genu *oprD* a/nebo jeho mutací, což vede k přerušení produkce normálního porinu (Xia *et al.*, 2016). Změna porinu byla zaznamenána také u *Klebsiella pneumoniae*, a to porovnáním klinických izolátů před antibiotickou terapií a po ní. Před terapií docházelo k expresi porinu OmpK35, po terapii došlo k posunu exprese na porin OmpK36, který má menší velikost kanálu. Touto změnou došlo k několikanásobnému snížení citlivosti *Klebsiella pneumoniae* na β -laktamová antibiotika.

K mikrobiální rezistenci může vést i produkce složitých bakteriálních systémů schopných vytlačit toxickou sloučeninu z buňky. Už na počátku 80. let 20. století byly popsány efluxní pumpy schopné odčerpávat tetracyklin z cytoplazmy *Escherichia coli*. Od té doby bylo u gramnegativních i grampozitivních patogenů charakterizováno mnoho tříd efluxních pump. U multirezistentních bakterií se jedná o systémy s širokou substrátovou specifitou, ale efluxní pumpy mohou být také zaměřeny jen na konkrétní antibiotikum, jako např. gen *tet* kóduje efluxní pumpu pro tetracyklin a *mef* geny pro makrolidy u pneumokoků.

Tento mechanismus rezistence se uplatňuje u fluorochinolonů, β -laktamů, karbapenemů, polymyxinů a dalších tříd antimikrobiálních látek včetně inhibitorů syntézy proteinů. Geny kódující efluxní pumpy mohou být součástí chromozomu nebo jsou umístěny na MGE jako např. u genu *tet*. Efluxní pumpy se rozdělují do 5 hlavních rodin, superrodina hlavních facilitátorů (MFS), rodina malých multirezistentních pump

(SMR), rodina rezistence-nodulace-buněčné dělení (RND), superrodina adenosintrifosfát (ATP) vázajících kazet (ABC) a rodina extruze léků s více účinky a toxických sloučenin (MATE) (Obrázek 6). Tyto rodiny se liší rozsahem substrátů, které jsou schopny vytlačovat, dále strukturní konformací, zdrojem energie a typem bakteriálních organismů, u kterých se nacházejí (Munita a Arias, 2016).

Jeden z nejdůležitějších regulačních mechanismů je součinnost nadprodukce efluxní pumpy MexEF-OprN a zvýšená či snížená produkce porinu OprD. U divokého kmenu *Pseudomonas aeruginosa* je pozitivní regulátor exprese této efluxní pumpy MexT neaktivní, to vede k nízké expresi *mexEF-oprN*, exprese *oprD* zůstává na základní úrovni, což zajišťuje správné množství OprD ve vnější membráně, které je dostatečné pro normální buněčný příjem. Prostřednictvím mutace v genu *mexT* dochází k aktivaci MexT, což způsobuje nadměrnou expresi efluxního operonu, a tedy i nadprodukcí efluxní pumpy MexEF-OprN. Zároveň MexT sníží expresi *oprD*, což vede ke snížení množství porinu OprD. Tento mechanismus významně přispívá k rezistenci k imipenemu (Xia *et al.*, 2016).



Obrázek 6 Zastoupení různých typů efluxních pump u grampozitivních a gramnegativních bakterií

Zdroj obrázku: Munita, J.M., Arias, C.A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*. 2016, 4(2).

Biofilm

Biofilmy jsou mikrobiální společenstva, která přiléhají k biotickým nebo abiotickým povrchům, a buňky v biofilmu jsou uzavřeny v matici extracelulárních polymerních látek, kterou si samy vytvářejí. Biofilmy se podílejí na patogenezi mnoha

bakteriálních infekcí, které je pak obtížné úspěšně léčit pomocí antibiotik. Například biofilmy *Staphylococcus aureus* mohou kolonizovat lékařské přístroje, jako jsou kardiostimulátory, v případě tvorby biofilmů *Pseudomonas aeruginosa* v plicích dochází k rozvoji chronické infekce u pacientů s cystickou fibrózou. Tvorba biofilmu je iniciována jako odpověď na různé signály a vlivy z okolního prostředí. Bakterie se nejprve přichytí k vhodnému povrchu, začnou se dělit, a produkovat hydratovanou matici složenou z exopolysacharidů, extracelulární DNA (eDNA), proteinů a lipidů. Postupem času se v nich vytvářejí shluky přisedlých buněk v mikrokoloních, které dozrávají v makrokolonie. Buňky mohou ze zralých biofilmů unikát a následně kolonizovat nové povrchy (Hall a Mah, 2017).

Specifická antibiotická rezistence biofilmu není výsledkem mutací. Samotná matrice může sloužit jako bariéra proti antimikrobiálním látkám, tyto látky mohou být na matici navázány a složkami matrice spotřebovány. Tento mechanismus se však liší podle typu matrice, typu antimikrobiální látky a stáří biofilmu. Součástí matrice jsou u *Pseudomonas aeruginosa* exopolysacharidy Psl, Pel a alginát. Pokud bakterie produkují jen alginát, ale v nedostatečném množství Psl a Pel, pak nejsou schopny tvořit biofilmy. Studie rovněž prokázaly, že Pel významně přispívá k antibiotické rezistenci. Další součástí matrice může být extracelulární DNA (eDNA), která indukuje expresi operonu, který je zodpovědný za rezistenci vůči kationtovým antimikrobiálním peptidům a aminoglykosidům. K přetrvávání biofilmu přispívají také perzistující buňky. Jejich buněčný metabolismus je zpomalen nebo úplně zastaven, což brání působení antibiotik, protože jejich cílové struktury v těchto buňkách nejsou aktivní. Perzistující buňky v reakci na baktericidní antibiotikum také neprodukuje hydroxylové radikály, což je další důvod snížení jejich citlivosti k antimikrobiálním látkám. Rezistence vůči antibiotikům v biofilmech je komplexní proces, který je výsledkem součinnosti více mechanismů rezistence a je výsledkem reakce rezistentních buněk biofilmu na stres (Mah, 2012).

6.2.2 Bakteriální rezistence vůči antiseptikům a dezinfekčním prostředkům

Díky odlišné buněčné struktuře, složení a fyziologii různého typu mikroorganismů dochází i k různým reakcím na antiseptika a dezinfekční prostředky. Vzhledem k těmto rozdílům je nutné uvažovat o bakteriích, plísních, virech, prvocích a prionech zvlášť. V posledních letech bylo dosaženo značného pokroku v úplnějším pochopení reakcí na dezinfekční látky u různých typů bakterií (mykobakterií, nesporelujících bakterií a bakteriálních spor). Bylo prokázáno, že rezistence

k dezinfekčním látkám a antiseptikům může být buď přirozenou vlastností mikroorganismu, nebo je získaná mutací či přenosem plazmidů nebo transpozonů stejně jako u rezistence na antimikrobiální látky (McDonnell a Russell, 1999). Ovšem i porozumění mechanismu účinku dezinfekčních látek se stalo důležitým aspektem v souvislosti s nárůstem bakteriální necitlivosti vůči dezinfekčním látkám a předpokladem, že rezistence bakterií vůči těmto látkám a antibiotikům by mohla být propojena (Morente *et al.*, 2013).

6.2.2.1 Primární (přirozená) rezistence vůči antiseptikům a dezinfekčním prostředkům

Stejně jako v případě antibiotik musí dezinfekční látky překonat vnější vrstvy buňky, aby se jejich molekuly dostaly k cílové struktuře. U různých organismů se může složení vnějších vrstev lišit, mohou tedy na působení dezinfekčních látek reagovat jinak. Degradaci sloučenin mohou způsobit také buňkou syntetizované enzymy, ovšem tento způsob obrany proti dezinfekčním látkám je méně častý. Přirozená rezistence k dezinfekčním látkám umožňující zamezit jejich působení je v bakteriálních buňkách řízena chromozomálně. Gramnegativní bakterie, bakteriální spory a mykobakterie bývají odolnější než grampozitivní mikroorganismy (McDonnell a Russell, 1999).

Nejodolnější ze všech typů bakterií vůči antiseptikům a dezinfekčním látkám jsou spory rodů *Bacillus* a *Clostridium*. Sporocidní dezinfekční přípravky musí tedy obsahovat vysokou koncentraci účinné látky (Morente *et al.*, 2013). Druhy rodu *Bacillus* nejsou obecně patogenní, detekce jejich spor funguje jako kontrola účinné sterilizace. Naopak druhy rodu *Clostridium* patří mezi významné patogeny, hlavně *Clostridioides difficile* je významným původcem nozokomiálních/postantibiotických průjmů. Pro rezistenci vůči antiseptikům a dezinfekčním prostředkům je důležité, v jakém stádiu sporulace se buňka nachází, plnou odolnost mají spory až po vytvoření kortexu (koncentrická vrstva peptidoglykanů) a následně dalších obalů (McDonnell a Russell, 1999).

U mykobakterií je míra rezistence na antiseptika a dezinfekční látky nižší než u bakteriálních spor, přesto je vyšší než u nesporulujících bakterií. To souvisí se stavbou buněčné stěny, která obsahuje kyselinu mykolovou a vysoké množství dalších lipidů. Tento hydrofobní charakter buněčné stěny představuje významnou překážku pro většinu dezinfekčních látek (Morente *et al.*, 2013). V případě mykobakterií nebylo zaznamenáno enzymatické působení na molekuly dezinfekčních látek. Nebyl prokázán ani přenos tohoto typu rezistence prostřednictvím plazmidů a transpozonů.

Obecně jsou gramnegativní bakterie odolnější vůči antiseptikům a dezinfekčním látkám oproti grampozitivním bakteriím s výjimkou spor grampozitivních bakterií a mykobakterií. Jako bariéra zde funguje vnější membrána, která svým charakterem brání vstupu širokému rozmezí chemických látek (McDonnell a Russell, 1999). Přes poriny snadno vstupují do grampozitivních buněk nízkomolekulární hydrofilní látky, zatímco hydrofobní molekuly volně difundují přes dvojvrstvu vnější membrány. V případě kationtových baktericidů, jako jsou kvarterní amoniové sloučeniny (KAS) nebo chlorhexidin, byl popsán třetí způsob překonání membrány, tyto látky membránu narušují, čímž zvyšují svoji absorpci. Zvláště odolné k některým dezinfekčním látkám jsou *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Proteus* spp. a další (Morente *et al.*, 2013).

U grampozitivních bakterií obsahuje buněčná stěna peptidoglykany a kyselinu teichoovou, jak se ukázalo, ani jedna z těchto součástí buněčné stěny není účinnou bariérou pro zabránění vstupu antiseptik a dezinfekčních prostředků do buňky (McDonnell a Russell, 1999). Buněčnou stěnou tak mohou procházet i látky s vysokou molekulovou hmotností, to je nejspíš důvodem citlivosti stafylokoků a vegetativních buněk *Bacillus* spp. na většinu dezinfekčních látek, jako jsou KAS a chlorhexidin (Morente *et al.*, 2013). Ovšem buněčná stěna se neustále mění v závislosti na fyziologickém stavu buňky, ale i v reakci na vnější okolí. V případě ohrožení buňky pak dochází ke změně tloušťky buněčné stěny a zvýší se i zesíťování peptidoglykanu. Některé grampozitivní bakterie (např. *Staphylococcus aureus*) mohou mít na svém povrchu vrstvu slizu, který rovněž hraje ochrannou roli jako bariéra proti proniknutí dezinfekčních prostředků, ale také může tato vrstva interagovat s molekulami dezinfekční látky a ovlivnit tak její možnou absorpci. V případě enterokoků nebyl prokázán vliv antibiotické rezistence k aminoglykosidům a vankomycinu na zvýšení odolnosti vůči dezinfekčním látkám v porovnání s citlivými kmeny. Enterokoky jsou však obecně méně citlivé k účinkům dezinfekčních látek než stafylokoky (McDonnell a Russell, 1999).

K primární rezistenci přispívá i fyziologická (fenotypová) adaptace, kterou je tvorba biofilmu. Ten je tvořený mikro a makrokoloniemi bakterií, které jsou obklopené exopolysacharidovým exopolymerem. Bakterie v biofilmu vykazují sníženou citlivost k dezinfekčním látkám, což může mít několik příčin. Zaprvé je tu snížený přístup dezinfekčního prostředku k buňkám uvnitř biofilmu, může docházet k vzájemnému působení biofilmu a dezinfekčního prostředku, dále k produkci degradačních enzymů

nebo neutralizačních látek, ale také k modulaci mikroprostředí a ke genetickému přenosu u buněk v biofilmu. Účinnost dezinfekčních látek na biofilm je důležitá hlavně při ošetření vody, protože bakterie *Legionella pneumophila* je schopná tvořit biofilm uvnitř vodovodních potrubí a dochází tak ke sníženému účinku chlorace vody (McDonnell a Russell, 1999).

6.2.2.2 Sekundární (získaná) rezistence vůči antiseptikům a dezinfekčním prostředkům

Sekundární rezistence vůči antiseptikům a dezinfekčním látkám může vzniknout jako následek mutací, amplifikací chromozomálního genu nebo získáním genetických determinant prostřednictvím jejich přenosu na plasmidech a transpozonech. Získaná rezistence, která není spojena s přenosem plazmidů, je pravděpodobně následek postupně se zvyšující koncentrace dezinfekční látky okolo bakterie. Tento typ rezistence byl zaznamenán u *Serratia marcescens*, která je vysoce rezistentní k působení KAS, a *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus marcescens*, kde byla zjištěna rezistence k chlorhexidinu. Příčinami tohoto typu získané rezistence mohou být také nízké či subinhibiční koncentrace dezinfekční látky, kdy může dojít k omezení počtu cílových míst pro tuto dezinfekční látku na jedno a v rámci adaptace buňky je přístup k tomuto místu zablokován (Morente *et al.*, 2013; Braoudaki a Hilton, 2004). Přenosem plazmidů zprostředkovaná sekundární rezistence je nejčastěji spojená s dezinfekčními látkami, které obsahují sloučeniny rtuti a jiné kovové soli, ovšem v poslední době byla pozorována i v souvislosti s dalšími typy dezinfekčních látek.

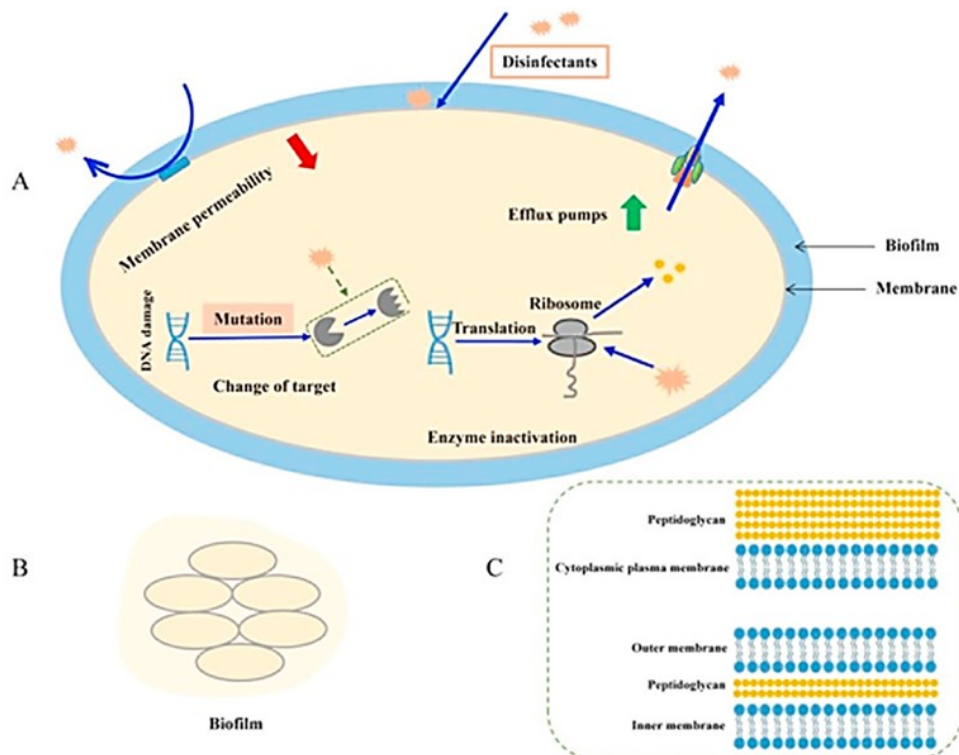
V případě gramnegativních bakterií byl u *Escherichia coli* nalezen plazmid R124, který může změnit vnější membránový protein OmpF, čímž zvyšuje rezistenci této bakterie ke KAS a dalším látkám. Enzymy degradující toluen a fenol byly u *Burkholderia cepacia* kódovány prostřednictvím plazmidu TOM. U *Pseudomonas aeruginosa* byl zaznamenán plazmid RP1, který zvyšoval rezistenci vůči hexachlorofenu, ale neměl vliv na účinek jiných dezinfekčních látek. Nebylo prokázáno, že by rezistence k antibiotikům u *Proteus* spp. a pseudomonád souvisela s jejich rezistencí k dezinfekčním prostředkům. Byly zaznamenány vysoké úrovně rezistence vůči dezinfekčním prostředkům u dalších nemocničních kmenů, nebyla však prokázána jednoznačná úloha přenosu této rezistence prostřednictvím plazmidů.

U grampozitivních bakterií byla zaznamenána rezistence zprostředkovaná plasmidy. Například *Staphylococcus aureus*, který obsahuje plasmidy nesoucí geny

antibiotické rezistence ke gentamicinu, vykazoval vyšší rezistenci k chlorhexidinu, diamidinu a KAS. Kmeny MRSA byly až 5000krát odolnější vůči jodovanému povidonu. Tato zvýšená rezistence je kódována dvěma rodinami genu *qacAB* a *qacCD*. Stafylokoky patří mezi bakterie, u nichž byl potvrzen geneticky podmíněný mechanismus rezistence vůči antiseptickým a dezinfekčním prostředkům, který je zprostředkován plazmidy. U ostatních grampozitivních bakterií, jako je např. i *E. faecium* nebyla prokázána plazmidy zprostředkovaná rezistence vůči antiseptickým a dezinfekčním prostředkům (McDonnell a Russell, 1999).

6.2.2.3 Mechanismus rezistence vůči antiseptikům a dezinfekčním prostředkům

Bakterie vyvinuly různé obranné mechanismy proti působení dezinfekčních látek jako výsledek stresové reakce na jejich přítomnost v okolí (Obrázek 7). Cílem těchto mechanismů je snížit koncentraci dezinfekčních látek pod účinnou úroveň a vyhnout se tak poškození buňky, které by mohlo vést až k buněčné smrti. V posledních letech se těmto mechanismům věnuje větší pozornost než v minulosti, jejich pochopení je důležité i ve vztahu ke zkřížené rezistenci u antimikrobiálních látek (Maillard, 2018).



Obrázek 7 Mechanismy rezistence bakterií vůči dezinfekčním prostředkům (A), tvorba biofilmu (B), a struktura membrán grampozitivních a gramnegativních bakterií (C)

Zdroj obrázku: Tong, C., Hu, H., Chen, G., et al. Disinfectant resistance in bacteria: Mechanisms, spread, and resolution strategies. *Environmental Research*. 2021, 195:110897.

Snížení permeability

Jak již bylo řečeno, je snížení propustnosti buněčné stěny klíčovou složkou rezistence vůči dezinfekčním látkám. Hlavními obrannými mechanismy jsou změny struktur a změna povrchové hydrofobicity vnější membrány, také složení proteinů a mastných kyselin vnější membrány a v neposlední řadě i potlačení syntézy porinů. Všechny tyto mechanismy mají vliv na snížení citlivosti k dezinfekčním látkám (Morente *et al.*, 2013). Účinným mechanismem se u *Pseudomonas aeruginosa* ukázala změna membránového potenciálu, která rovněž vedla ke snížení citlivosti k dezinfekčním látkám. Změny bakteriální membrány mají genetický základ např. formou transpozonové mutageneze (Maillard, 2018).

Změna cílové struktury

Dezinfekční látky mají na rozdíl od antibiotik v bakteriální buňce více cílových míst, proto je mutace těchto struktur v případě rezistence k biocidům spíše vzácná. Jednou z výjimek je mutace v genu *fabI*, který kóduje enoyl-acylovou nosnou proteinovou reduktázu, ta je součástí biosyntézy mastných kyselin. Tato mutace se nachází u *Escherichia coli* a zajišťuje rezistenci k triklosanu (Morente *et al.*, 2013).

Enzymatická degradace

U některých bakterií dochází k produkci katalázy a superoxid dismutázy, tyto enzymy působí na oxidační činidla a napomáhají tak snížení citlivosti k těmto dezinfekčním látkám. Ovšem je diskutabilní, zda samotná produkce enzymů zajišťuje rezistenci k dezinfekčním látkám. Produkce detoxikačních enzymů je spíše součástí souboru mechanismů, které mají bakterie k dispozici k eliminaci buněčného poškození dezinfekčními látkami. Enzymatická aktivita byla zaznamenána také v případě parabenů, aldehydů a kovových iontů, kdy přispěla ke snížení citlivosti bakterií k těmto typům látek.

Efluxní pumpy

Efluxní pumpy jsou u bakterií velmi rozšířené a jejich hlavní úlohou je snižování koncentrace antimikrobiálních látek. Jejich role v rezistenci vůči dezinfekčním látkám je sporná, ale je pravděpodobné, že se podílí na obraně buňky při expozici dezinfekční látkou (Maillard, 2018). V současné době je známo velké množství integrálních membránových a s membránou spojených proteinů, které zajišťují odčerpávání nejen antimikrobiálních látek, ale i těch dezinfekčních a dalších. Tyto efluxní pumpy mohou mít různou strukturu a mohou být tvořené třeba i jen jedním proteinem, který je schopen plnit efluxní funkci. Efluxní pumpy využívají k transportu chemických molekul

energii získanou hydrolýzou ATP (např. systém LmrA u *Lactococcus lactis*), protonový gradient (např. proteiny Qac, které propůjčují rezistenci vůči KAS), případně antiport se sodnými ionty (efluxní pumpy rodiny MATE) (Morente *et al.*, 2013).

Podle některých studií stojí eflux za vysokou rezistencí k bisfenolu. Byla provedena i studie na bakteriálních izolátech, které byly vystaveny intenzivní expozici dezinfekčních látek jako jsou biguanidy a KAS. Následně byla zjištěna vysoká četnost efluxních genů (např. *qacA/B*, *norA*, *norB*, *smr*) a to u izolátů se sníženou citlivostí k dezinfekčním látkám (Maillard, 2018). Mezi chromozomálně kódované efluxní pumpy patří např. zástupci superrodiny MFS, které přispívají k rezistenci na KAS. U grampozitivních bakterií, konkrétně u *Staphylococcus aureus*, najdeme exportéry MdeA, NorA a jeho analog NorB. Další analogy byly zaznamenány u *Bacillus subtilis* (exportéry Bmr a Blt), *Streptococcus pneumoniae* (exportér PmrA), *Lactococcus lactis* (exportér LmrP) nebo *Enterococcus faecalis* (exportér EmeA). U všech těchto příkladů se jedná o MDR efluxní pumpy, což znamená, že mohou přispět k rezistenci vůči různým typům chemických molekul.

Plazmidy kódované efluxní pumpy byly zaznamenány převážně u *Staphylococcus aureus*, a to včetně kmenů MRSA. Opět šlo o zástupce superrodiny MFS, konkrétně o exportéry QacA/B a SMR, které přispívají k rezistenci na KAS. Hlavními geny, jež odpovídají za tuto rezistenci, jsou *qacA*, *qacB* a *qacC* (*smr*) a byly identifikovány u klinických izolátů *Staphylococcus aureus*. Gen *qacA* propůjčuje rezistenci k řadě strukturně odlišných organických kationtů, jako jsou ethidium, benzalkonium a cetrimid (monovalentní kationty) a chlorhexidin a pentamidin (bivalentní kationty). Tento gen najdeme nejen na plazmidech rodiny pSK1, ale i na chromozomech. Gen *qacB* je úzce příbuzný s genem *qacA* a nachází se na různých plazmidech jako je např. plazmid pSK23, který je odolný vůči těžkým kovům. *qacB* poskytuje rezistenci především proti monovalentním organickým kationtům a v menší míře proti některým dvojmocným sloučeninám (Morente *et al.*, 2013).

Znalosti o přítomnosti efluxních pump u bakterií a jejich úloze nejen v rezistenci k dezinfekčním látkám se neustále vyvíjejí (Maillard, 2018).

6.2.2.4 Vliv používání antiseptik a dezinfekčních prostředků na rezistenci k antibiotikům

V posledních letech se řada prací zabývá problematikou možnosti vlivu používání subinhibičních koncentrací dezinfekčních látek na rezistenci k antibiotikům. Maertens *et al.* v testech *in vitro* prokázali, že vystavení kmenů *Escherichia coli*

subinhibičním koncentracím KAS vyústilo ve snížení baktericidního efektu ciprofloxacinu. Podobně Nasr *et al.* použil subinhibiční koncentrace chlornanu sodného a didecyldimonium chloridu při *in vitro* kultivaci 50 klinických kmenů rodu *Pseudomonas* a zjistil statisticky významný nárůst MIC u colistinu, ceftazidimu amikacinu, meropenemu, gentamicinu, piperacilin-tazobactamu a ciprofloxacinu u chlornanu sodného, zatímco u didecyldimonium chloridu došlo k statistickému zvýšení MIC jen u amikacinu, gentamicinu, meropenemu a ciprofloxacinu. Zhang *et al.* v pokusech *in vitro* prokázali vliv použití subinhibičních koncentrací volného chlóru, chloraminu a peroxidu vodíku na zvýšení horizontálního přenosu genů rezistence na antibiotika jak intradruhového u *Escherichia coli*, tak mezidruhového z *Escherichia coli* na *Salmonella typhimurium*, a to různými mechanismy (Maertens *et al.*, 2020; Nasr *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2017).

6.3 Nozokomiální infekce

Nozokomiální infekce (NI) jsou infekce spojené se zdravotní péčí a jsou významným problémem nejen pro pacienty a jejich zdraví, ale i pro zdravotnická zařízení, která kladou důraz na poskytování bezpečnější zdravotní péče (WHO, 2009). NI se mohou rozvinout během poskytování zdravotní péče, ale i po propuštění pacientů do domácí péče. Do této skupiny onemocnění jsou zahrnuty i profesionální infekce zdravotnických pracovníků (Khan *et al.*, 2017). V souvislosti s NI může dojít nejen k prodloužení hospitalizace, ale i k dlouhodobým trvalým následkům, případně smrti. Vážným problémem je i zvýšení rezistence mikroorganismů k antimikrobiálním přípravkům, což může značně ztížit léčbu pacienta, a šíření těchto rezistentních kmenů v rámci zdravotnického zařízení tak představuje velký problém. Kromě zdravotních komplikací pro pacienty představují tyto nákazy i významnou dodatečnou finanční zátěž, což vede ke zvýšeným nákladům na zdravotní péči.

Rizikových faktorů pro rozvoj NI je mnoho, v případě infekčního agens záleží na jeho virulenci, odolnosti vůči okolnímu prostředí a s tím spojenou schopností přežití, a antimikrobiální rezistenci. U pacientů hraje roli pokročilý věk, nízká porodní váha, stávající či skrytá onemocnění, imunosuprese či podvýživa. Vliv má také prostředí ať už jde o kontaminaci nemocničních ploch a povrchů infekčním agens nebo přímo o charakter pracoviště jako je např. JIP, kde je větší pravděpodobnost použití invazivních zdravotnických pomůcek a postupů jako jsou např. katétrů nebo ventilátory, ale záleží i na postupu a volbě léčiv při antibiotické terapii (WHO, 2009).

Mezi původce NI patří bakterie, viry, plísně a kvasinky. Bakterie jsou nejčastějšími patogeny zodpovědnými za NI. Některé jsou součástí přirozené mikroflóry pacienta a způsobují infekce až v případě oslabení jeho imunitního systému. Můžeme se setkat s infekcemi způsobenými kmeny *Acinetobacter* spp., *Clostridioides difficile*, *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (MRSA) a *Enterococcus faecium*. Viry způsobují okolo 5 % NI a mezi hlavní původce patří viry hepatitidy B a C, ale také chřipkové viry, HIV, rotaviry a herpes-simplex virus. Plísně a kvasinky jsou oportunní patogeny a způsobují NI u osob s oslabeným imunitním systémem. Nejčastěji se jedná o *Aspergillus* spp., *Candida albicans* a *Cryptococcus neoformans*. Nejčastějšími typy NI jsou katérové infekce krevního řečiště, infekce močových cest související se zavedeným močovým katétrem, infekce v místě chirurgického výkonu a ventilátorové pneumonie.

NI postihují obrovské množství pacientů po celém světě, dle odhadu WHO se jedná až o 15 % všech infekčních onemocnění jen v rámci Evropy (Khan *et al.*, 2017). Proto je kladen čím dál tím větší důraz na kvalitu a bezpečnost ve zdravotnictví. Komplexnost lékařské péče, nadužívání antimikrobiálních látek a vysoký výskyt multirezistentních mikroorganismů, které se přenášejí v rámci nemocničního prostředí, ale i prostřednictvím zdravotnických pracovníků, vedlo ke zvýšené pozornosti zaměřené na zlepšení řízení a prevenci NI (Fernando *et al.*, 2017).

6.3.1 Úloha hygieny rukou ve spojení s nozokomiálními nákazami

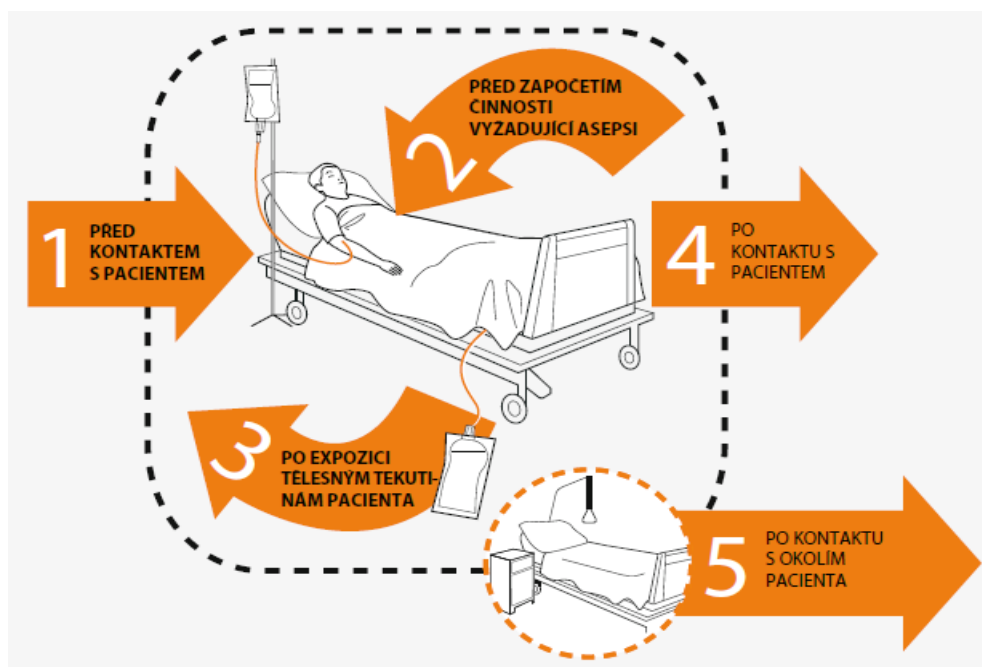
Nozokomiální patogeny se mohou šířit vzduchem, kapénkami, přímým i nepřímým kontaktem a užíváním společných předmětů. Nejběžnější cestou přenosu jsou kontaminované ruce zdravotnických pracovníků. Ke kontaminaci rukou dochází následujícím způsobem. Nejprve jsou mikroorganismy z pacientovi pokožky přeneseny na předměty v bezprostřední blízkosti pacienta, následně pak z těchto předmětů na ruce zdravotnických pracovníků. Organismy musí být odolné, aby vydržely na rukách zdravotníků několik minut. Pokud pak dochází k nedostatečnému mytí rukou nebo dezinfekci rukou zdravotnických pracovníků nebo je užívaný prostředek k hygieně rukou nevhodný, může dojít k přenosu mikroorganismu na dalšího pacienta nebo předměty, které tento pacient užívá (Pittet *et al.*, 2006).

K přenosu patogenů může dojít nejen z infikovaných a drénovaných ran, ale i z kolonizované nepoškozené pokožky pacienta, a to prostřednictvím mikrobiálně kontaminovaných šupinek kůže, které se mohou uvolnit na oděv pacienta, na ložní

prádlo, na lůžko, nábytek a další předměty v jeho okolí. V mnoha studiích byl prokázán přenos patogenů po kontaktu rukou zdravotníků s neporušenými oblastmi pokožky pacienta. Zachyceny byly např. *Staphylococcus aureus*, *Clostridioides difficile* a enterokoky.

Přežití patogenů na rukách zdravotnických pracovníků po kontaktu s pacientem nebo kontaminovanými předměty je různé (2–60 minut). Pokud není v průběhu péče o pacienty pravidelně prováděna hygiena rukou, jejich kontaminace se zvyšuje. Je také důležité provádět hygienu rukou správně, je třeba použít dostatečné množství vhodného přípravku, a to po dostatečnou dobu. Následek zanedbání hygieny rukou během péče o jednoho pacienta nebo při kontaktu s více pacienty logicky vede k jejich mikrobiální kontaminaci. Endemický až epidemický výskyt NI je tedy dáván do souvislosti právě s kontaminací rukou zdravotnických pracovníků.

Hygiena rukou je primárním opatřením, jehož účinnost byla v prevenci NI a šíření antimikrobiální rezistence prokázána. Na základě těchto poznatků vydala WHO Směrnici pro hygienu rukou ve zdravotnictví, kde definovala 5 základních situací, kdy je důležité provést hygienu rukou – před kontaktem s pacientem, před započítím činností vyžadujících asepsi, po expozici tělesnými tekutinami pacienta, po kontaktu s pacientem a po kontaktu s okolím pacienta (Obrázek 8) (WHO, 2009).



Obrázek 8 Hygiena rukou ve zdravotní péči v pěti situacích

Zdroj obrázku: WHO 2009 WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care: a Summary (český překlad
Ministerstvo zdravotnictví ČR)

6.3.2 Provedení hygieny rukou

Hygieny rukou zahrnuje dva postupy – mytí rukou a dezinfekci rukou. Mytí rukou můžeme rozdělit na běžné mytí a předoperační mytí, dezinfekci pak dělíme na hygienickou dezinfekci rukou a chirurgickou dezinfekci rukou.

Během běžného mytí rukou dochází k odstranění nečistot pomocí vody a tekutého mýdla, a to po dobu 40–60 sekund. Poté se ruce opláchnou pitnou vodou a osuší jednorázovým papírovým ručníkem (Obrázek 9).

Předoperační mytí rukou má stejný postup, ovšem je důkladnější, protože kromě rukou se umývají i předloktí a dochází k odstranění nejen nečistot, ale i přechodné kožní flóry z rukou. Tento způsob mytí rukou se používá před chirurgickou dezinfekcí rukou. Na nehtová lůžka se použije sterilní kartáček, ruce i předloktí se pak opláchnou pitnou vodou a osuší sterilním ručníkem.



Obrázek 9 Technika hygieny rukou s použitím mýdla a vody

Zdroj obrázku: WHO 2009 WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care: a Summary
(český překlad Ministerstvo zdravotnictví ČR)

Hygienická dezinfekce rukou se provádí dostatečným množstvím alkoholového přípravku, který se vtírá do suchých rukou po určenou dobu (min. 30 sekund). Ruce už se vodou neoplachují. Jako prevenci vysušení kůže po opakované dezinfekci lze ruce ošetřit regeneračním krémem (Obrázek 10).



Obrázek 10 Technika hygieny rukou s použitím alkoholového dezinfekčního přípravku

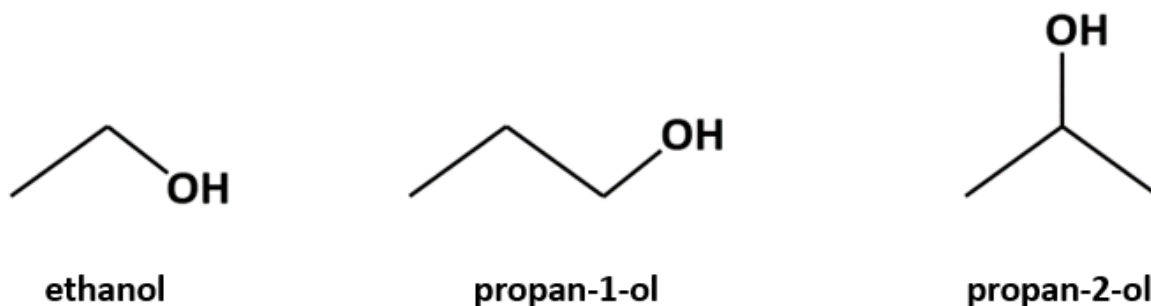
Zdroj obrázku: WHO 2009 WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care: a Summary
(český překlad Ministerstvo zdravotnictví ČR)

Chirurgická dezinfekce rukou je zaměřena nejen na přechodnou kožní mikroflóru, ale i na tu ve vnitřních vrstvách pokožky rukou. Nejprve je třeba dokonale vysušit ruce po předoperačním mytí. Pak následuje vtírání alkoholového dezinfekčního přípravku do pokožky rukou a předloktí dle stanoveného postupu. Nejprve se

dezinfikují ruce až po loket, poté znovu, ale jen do poloviny předloktí a v třetí kole se dezinfikují jen samotné ruce. Je třeba dostatečné množství dezinfekčního přípravku, aby byly ruce během celého procesu stále vlhké (Hedlová, 2010).

6.4 Alkoholové dezinfekční prostředky

Alkoholové dezinfekční prostředky nejčastěji obsahují ethanol, propan-1-ol a propan-2-ol, příp. jejich směsi (Obrázek 11). Optimální účinnosti dosahují v koncentraci 70 % ± 5 %. V případě vlhkého materiálu nebo po mytí rukou vodou a mýdlem je vhodné použít 80–95% alkohol. Alkoholy poskytují vynikající antibakteriální, antimykotické a antivirové účinky a snižují počet mikrobů na kůži (Katz, 2004; Svoboda a Bolek *et al.*, 1975). Nejsou však sporicidní, sice inhibují sporulaci, ale tento účinek není trvalý. Alkoholy tedy nejsou vhodné k chemické sterilizaci, ale jsou široce používány k dezinfekci povrchů a antisepsi kůže. V nižších koncentracích mohou být použity jako konzervační látky a mohou také zvyšovat účinek jiných biocidních látek. V alkoholových přípravcích mohou být v menším množství i jiné účinné látky (např. chlorhexidin), ty zůstávají na kůži po odpaření alkoholu a mohou prodloužit účinek přípravku. Různé pomocné látky (včetně změkčovadel) snižují odpařování alkoholu a mohou tak výrazně zvýšit účinnost přípravku.



Obrázek 11 Strukturní vzorce ethanolu, propan-1-olu a propan-2-olu

Zdroj obrázku: vlastní obrázek

Obecně lze říci, že ethanol je účinnější proti virům, propan-2-ol zase mírně účinnější proti bakteriím, ovšem záleží nejen na druhu mikroorganismu, ale i na koncentraci účinné látky (McDonnell a Russell, 1999). Alkoholové přípravky vysušují pokožku, což je jejich hlavní nevýhoda, proto komerčně vyráběné přípravky obsahují zvláčňující a zvlhčující látky, které zmírňují tento efekt a minimalizují tak poškození pokožky (Katz, 2004).

6.4.1 Vybrané chemické vlastnosti alkoholů

Ethanol, propan-1-ol a propan-2-ol jsou neomezeně mísitelné s vodou. Ethanol vykazuje jen mírný zápach, zatímco propan-2-ol má silnější chemický zápach. Rychlost jejich odpařování omezuje kontaktní dobu jejich dezinfekčního působení, u těchto tří alkoholů je velmi podobná. Čím vyšší je jejich koncentrace, tím rychleji se odpařují. Všechny alkoholy, které se používají ve zdravotnictví, jsou hořlavé. Jejich hořlavost se vyjadřuje jako bod vzplanutí, což je nejnižší teplota, při které hořlavá látka vytváří páry a může se vznítit. Při vyšší koncentraci alkoholu je teplota bodu vzplanutí nižší (Boyce, 2018).

6.4.2 Mechanismus účinku na biologické systémy

Většina účinků alkoholů na biologické systémy souvisí s ovlivněním hydrofobních vazeb, není zde tedy zapotřebí žádný specifický receptor. V případě výše zmíněných alkoholů jde o poměrně malé molekuly, které volně prochází bakteriálními membránami. Alkoholy tedy ovlivňují kromě povrchových membránových funkcí a enzymů i ty cytoplazmatické. Aby mohlo dojít k zablokování glykolýzy a metabolismu, k inhibici růstu nebo usmrcení buňky, je zapotřebí vysoká molární koncentrace alkoholu. Právě díky vysoké koncentraci alkoholu pak dochází ke změně vodního prostředí a centrálního hydrofobního jádra plazmatické membrány. V případě vodného prostředí snižuje jeho polaritu, zatímco v hydrofobním jádře membrány polaritu zvyšuje. Mění se tak propustnost plazmatické membrány pro molární a nabitě molekuly (Ingram, 1990). Hlavním účinkem alkoholů vůči mikroorganismům je denaturace bílkovin, ta vyžaduje i přítomnost vody, proto je absolutní alkohol méně baktericidní. Podle nedávných studií byl u *Escherichia coli* zaznamenán další účinek alkoholu v podobě inhibice syntézy RNA a proteinů, a to přímým působením alkoholu na ribozomy a RNA polymerázu.

Alkoholové dezinfekční prostředky mají rychlou baktericidní aktivitu vůči všem vegetativním bakteriím, a to včetně mykobakterií. U ethanolu bylo zjištěno, že při poklesu jeho koncentrace pod 50 % dojde ke snížení baktericidní aktivity. Alkoholy nejsou sporocidní, ale jejich aktivitu proti sporám lze zvýšit jeho kombinací s alkáliemi, minerálními kyselinami, peroxidem vodíku a některými povrchově aktivními látkami. Alkoholy jsou fungicidní i virucidní, působí na lipofilní viry jako např. viry chřipky, herpes viry, viry hepatitidy B a C a hydrofilní viry jako např. adenovirus, rhinovirus, enterovirus a rotaviry. Slabou aktivitu vykazují u viru hepatitidy A a polioviru (Boyce, 2018).

7. PRAKTICKÁ ČÁST

7.1 Metoda testování

Testování účinnosti dezinfekčních prostředků se provádí podle české technické normy ČSN EN 1040 – Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika – Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení základního baktericidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik – Metoda zkoušení a požadavky (fáze 1). Lze použít diluční metodu s použitím neutralizátoru nebo metodu membránové filtrace. Pro naše testování jsme použili metodu diluční s neutralizátorem.

7.1.1 Reagencie

Sterilizovaná destilovaná voda

Používali jsme destilovanou vodu z úpravny vody metodou reverzní osmózy od firmy Goro (Brandýs nad Labem, Česká republika). Destilovanou vodu jsme sterilizovali při 121 °C po dobu 15 minut.

Neutralizátor

Na základě předchozí zkušenosti s testováním alkoholového dezinfekčního prostředku Sterillium® jsme se rozhodli jako neutralizátor použít 5% roztok vaječného žloutku a sterilizované destilované vody. Vyzkoušeli jsme tento neutralizátor i na ostatní testované alkoholové dezinfekční prostředky, abychom ověřili, že účinně potlačuje jejich dezinfekční účinek (Tabulka 2). Pro každou dezinfekci jsme provedli test v duplikátu a u všech jsme zaznamenali růst kolonií, což potvrdilo, že je neutralizátor účinný a můžeme ho použít.

Tabulka 2 Testování neutralizátoru

Název dezinfekce	5% roztok vaječného žloutku s destilovanou vodou	
	1. plotna	2. plotna
Manusept® basic	růst kolonií	růst kolonií
Promanum® pure	růst kolonií	růst kolonií
Skinman® soft N	růst kolonií	růst kolonií
Sterillium® med	růst kolonií	růst kolonií
Septoderm®	růst kolonií	růst kolonií
Sterillium®	růst kolonií	růst kolonií
75% propan-2-ol	růst kolonií	růst kolonií

Diluent

Jako diluent jsme použili fyziologický roztok, který jsme si sami připravili a následně sterilizovali při 121 °C po dobu 15 minut.

7.1.2 Dezinfekční prostředky

Testovali jsme 6 komerčně dodávaných alkoholových prostředků určených k hygienické dezinfekci rukou – Manusept® basic, Promanum® pure, Skinman® soft N, Sterillium® med, Septoderm®, Sterillium®. Všechny tyto přípravky jsou určeny k přímému použití, není tedy potřeba je ředit. Navíc jsme do testování zařadili 75% propan-2-ol, který jsme si naředili z čistého propan-2-olu (isopropylalkoholu) (Obrázek 12). Pro samotné testování jsme si kromě základní koncentrace 1 (účinná) připravili ještě dvě, a to ředěním přípravků v poměrech 1:1 (intermediární) a 1:10 (neúčinná).



Obrázek 12 Testované dezinfekční prostředky – komerčně vyráběné a čistý propan-2-ol

Zdroj obrázku: vlastní fotografie

V Tabulce 3 uvádíme podrobnosti o komerčně dodávaných přípravcích, tedy výrobce, hlavní účinné látky a podrobné složení včetně procentuálního zastoupení jednotlivých látek v přípravku.

Tabulka 3 Testované dezinfekční prostředky – výrobce, účinné látky a složení

Manusept® basic	
Výrobce	BODE Chemie GmbH, Hamburg, Německo
Účinné látky	ethanol
Složení	ethanol, procentuální zastoupení ve výrobku ≥ 70 a < 90 %
Promanum® pure	
Výrobce	B. Braun Medical AG, Sempach, Švýcarsko
Účinné látky	ethanol, propan-2-ol
Složení	ethanol, procentuální zastoupení ve výrobku < 80 %
	propan-2-ol, procentuální zastoupení ve výrobku < 15 %
Skinman® soft N	
Výrobce	Ecolab Hygiene s.r.o., Brno, Česká republika
Účinné látky	propan-2-ol
Složení	propan-2-ol procentuální zastoupení ve výrobku ≥ 50 a ≤ 90 %
	myristyl alkohol, procentuální zastoupení ve výrobku ≥ 1 a $< 2,50$ %
	alkyldimethylbenzylamonium-chlorid, procentuální zastoupení ve výrobku $\geq 0,10$ a $< 0,25$ %
	kyselina peroctová, procentuální zastoupení ve výrobku $\geq 0,10$ a $< 0,25$ %
Sterillium® med	
Výrobce	BODE Chemie GmbH, Hamburg, Německo
Účinné látky	ethanol, propan-1-ol
Složení	ethanol, procentuální zastoupení ve výrobku ≥ 70 a < 90 %
	propan-1-ol, procentuální zastoupení ve výrobku ≥ 1 a < 3 %
	tetradecanol, procentuální zastoupení ve výrobku $\geq 0,25$ a < 1 %
Septoderm®	
Výrobce	Schulke CZ, s.r.o., Bohumín, Česká republika
Účinné látky	ethanol, propan-2-ol
Složení	ethanol, procentuální zastoupení ve výrobku 45 %
	propan-2-ol, procentuální zastoupení ve výrobku 30 %
	didecyldimethyl-amonium chlorid, procentuální zastoupení ve výrobku 0,50 %
Sterillium®	
Výrobce	BODE Chemie GmbH, Hamburg, Německo
Účinné látky	propan-2-ol, propan-1-ol
Složení	propan-2-ol, procentuální zastoupení ve výrobku ≥ 30 a < 50 %
	propan-1-ol, procentuální zastoupení ve výrobku ≥ 30 a < 50 %
	tetradecanol, procentuální zastoupení ve výrobku $\geq 0,25$ a < 1 %
	ethyl(hexadecyl)dimethylamonium-ethyl-sulfát, procentuální zastoupení ve výrobku $\geq 0,1$ a $< 0,25$ %

7.1.3 Testované mikroorganismy

Testované klinické izoláty byly zachyceny v Nemocnici Na Homolce v Praze, a to v rozmezí leden–srpen 2019. Do testování byly zařazeny i dva sbírkové kmeny *E. faecium*, jeden rezistentní (CNCTC 7460) k vankomycinu a jeden citlivý k vankomycinu (CNCTC 5773) (Tabulka 4).

Tabulka 4 Testované izoláty enterokoků

Označení izolátu	Pohlaví	Věk	Druh	Měsíc záchytu 2019	Lokalizace	Původ	Oddělení
VRE 1	M	79	<i>E. faecium</i>	1	výtěr stolice	GIT	kardiochirurgie
VRE 2	M	56	<i>E. faecium</i>	1	BAL	DCD	interna
VRE 3	M	76	<i>E. faecium</i>	1	výtěr stolice	GIT	neurochirurgie
VRE 4	M	63	<i>E. faecium</i>	2	výtěr stolice	GIT	ARO
VRE 5	M	77	<i>E. faecium</i>	2	výtěr stolice	GIT	ARO
VRE 6	Ž	76	<i>E. faecium</i>	3	výtěr stolice	GIT	ARO
VRE 7	M	74	<i>E. faecium</i>	3	hemokultura	KREV	interna
VRE 8	M	69	<i>E. faecium</i>	3	výtěr stolice	GIT	interna
VRE 9	Ž	83	<i>E. faecium</i>	3	punktát cysta	GIT	ARO
VRE 10	Ž	64	<i>E. faecium</i>	3	výtěr chirurgická rána	RÁNY	cévní chirurgie
VRE 11	M	85	<i>E. faecium</i>	4	žluč	GIT	interna
VRE 12	M	55	<i>E. faecium</i>	4	výtěr chirurgická rána	RÁNY	ARO
VRE 13	Ž	60	<i>E. faecium</i>	4	výtěr dekubit	RÁNY	cévní chirurgie
VRE 14	M	77	<i>E. faecium</i>	4	výtěr stolice	GIT	ARO
VRE 15	M	89	<i>E. faecium</i>	4	výtěr stolice	GIT	interna
VRE 16	M	77	<i>E. faecium</i>	5	výtěr stolice	GIT	ARO
VRE 17	M	72	<i>E. faecium</i>	5	kultivace moč	URO	kardiochirurgie
VRE 18	M	79	<i>E. faecium</i>	5	výtěr stolice	GIT	kardiochirurgie
VRE 19	Ž	82	<i>E. faecium</i>	6	výtěr stolice	GIT	cévní chirurgie
VRE 20	M	79	<i>E. faecium</i>	6	výtěr stolice	GIT	cévní chirurgie
VRE 21	M	73	<i>E. faecium</i>	7	výtěr stolice	GIT	kardiochirurgie
VRE 22	M	73	<i>E. faecium</i>	8	hemokultura	KREV	ARO
VRE Sb. CNCTC 7460			<i>E. faecium</i>				
VSE 1	M	71	<i>E. faecalis</i>	1	hemokultura	KREV	interna
VSE 2	M	41	<i>E. faecalis</i>	2	hemokultura	KREV	kardiologie
VSE 3	M	69	<i>E. faecium</i>	3	tkáň	TKÁNĚ	interna
VSE 4	M	69	<i>E. faecalis</i>	3	tkáň	TKÁNĚ	interna
VSE 5	M	79	<i>E. faecalis</i>	3	hemokultura	KREV	cévní chirurgie
VSE 6	M	69	<i>E. faecalis</i>	5	hemokultura	KREV	kardiologie
VSE 7	M	69	<i>E. faecalis</i>	5	hemokultura	KREV	neurologie
VSE 8	Ž	65	<i>E. faecalis</i>	6	hemokultura	KREV	neurologie
VSE 9	Ž	72	<i>E. faecalis</i>	6	hemokultura	KREV	cévní chirurgie
VSE 10	M	71	<i>E. faecium</i>	1	hemokultura	KREV	interna
VSE 11	M	82	<i>E. faecium</i>	7	hemokultura	KREV	interna
VSE Sb. CNCTC 5773			<i>E. faecium</i>				

Vysvětlivky: VRE – vankomycin rezistentní enterokoky, VSE – vankomycin citlivé enterokoky, CNCTC – Česká národní sbírka typových kultur, Sb. – sbírkový kmen, BAL – bronchoalveolární laváž, DCD – dolní cesty dýchací, URO – urogenitální trakt, GIT – gastrointestinální trakt, ARO – anesteziologicko-resuscitační oddělení

Izoláty enterokoků pocházejí z různých klinických materiálů. Z hemokultur bylo zachyceno 7 kmenů *E. faecalis* a 4 kmeny *E. faecium*, ze stolice 13 kmenů *E. faecium*, z ran 3 kmeny *E. faecium*, z kůže pak 1 kmen *E. faecalis* a 1 kmen *E. faecium* a po 1 kmenu *E. faecium* z bronchoalveolární laváže, žluče, moče a punktátu cysty.

Izoláty pocházely i z různých nemocničních oddělení. Na anesteziologicko-resuscitačním oddělení bylo zachyceno 8 kmenů *E. faecium* a na kardiochirurgii 4 kmeny *E. faecium*, na kardiologii a neurologii po 2 kmenech *E. faecalis*, na interním oddělení 2 kmeny *E. faecalis* a 8 kmenů *E. faecium*, na oddělení cévní chirurgie 2 kmeny *E. faecalis* a 4 kmeny *E. faecium*, na neurochirurgii 1 kmen *E. faecium*.

U dvou kmenů VRE 21 a VRE 22 se jedná o izoláty od jednoho pacienta, kterého přeložili z jiné nemocnice, první záchyt VRE byl zaznamenán při přijetí a druhý o měsíc později, kdy se zdravotní stav pacienta zhoršil. Oba tyto izoláty jsou navíc rezistentní i k linezolidu.

U testovaných izolátů enterokoků jsme stanovili minimální inhibiční koncentraci pro antibiotika vankomycin a teikoplanin, a to pomocí E-testů. Použili jsme diagnostické proužky Vankomycin M.I.C.Evaluator Strips a Teicoplanin M.I.C.Evaluator Strips od firmy Thermo Fisher™ Oxoid™ (USA). Připravili jsme suspenze z jednotlivých izolátů, jejichž zákal odpovídal 0,5 stupni McFarlandovy stupnice. Napipetovali jsme 1 ml suspenze na Mueller-Hintonův agar, pohybem plotny jsme rozprostřeli suspenzi po celé ploše. Poté jsme sterilní pinzetou umístili na plotnu dva diagnostické proužky, jeden s vankomycinem a jeden s teikoplaninem. Bylo třeba dbát na to, aby pod proužky nebyly žádné bublinky. Následovala inkubace při 37 °C 16–18 hodin. Při odečítání jsme u každého kmene zaznamenali koncentraci na stupnici, která byla součástí diagnostického proužku a u které končila špička inhibiční zóny vejčitého tvaru.

Testované kmeny jsme z kryozkumavek vyočkovali na krevní agar Columbia s ovčí krví (Thermo Fisher™ Oxoid™ – USA). Abychom ověřili, zda je kmen citlivý nebo rezistentní, umístili jsme na plotnu také antibiotický disk s vankomycinem. Následovala inkubace při 37 °C po dobu 24 hodin. První subkulturu jsme přeočkovali včetně následného umístění nového vankomycinového disku a znovu inkubovali 24 hodin při 37 °C. Pro přípravu suspenze jsme pak použili až druhou subkulturu.

7.1.4 Pracovní postup

Všechny níže uvedené pracovní postupy jsme prováděli při teplotě 20 °C. Na promíchání jednotlivých složek během všech pracovních postupů jsme použili vortex pro jednu zkumavku. Dobu expozice jsme stanovili dle doporučení na hygienickou dezinfekci rukou na 30 sekund.

Příprava suspenze „N“

Pro přípravu suspenze jsme si připravili zkumavku s 10 ml fyziologického roztoku. Sterilní kličkou jsme postupně nabírali kolonie, které jsme na stěně zkumavky pečlivě rozetřeli a pak kličkou spojili s fyziologickým roztokem. Pomocí denzitometru jsme po promíchání obsahu zkumavky změřili stupeň zákalu dle McFarlanda. Počet bakterií by měl být dle normy v rozmezí $1,5 \times 10^8$ – 5×10^8 CFU/ml, což v našem případě odpovídalo 2,00–2,50 stupně McFarlandovy stupnice. Po dosažení odpovídajícího zákalu jsme suspenzi desítkovým ředěním postupně naředili na počítatelné koncentrace 10^2 CFU/ml a 10^1 CFU/ml. Z obou suspenzí jsme odebrali 2×1 ml a vyočkovali v duplikátu na krevní agary, na každou plotnu po 1 ml a nechali inkubovat při 37 °C po dobu 20–24 hodin.

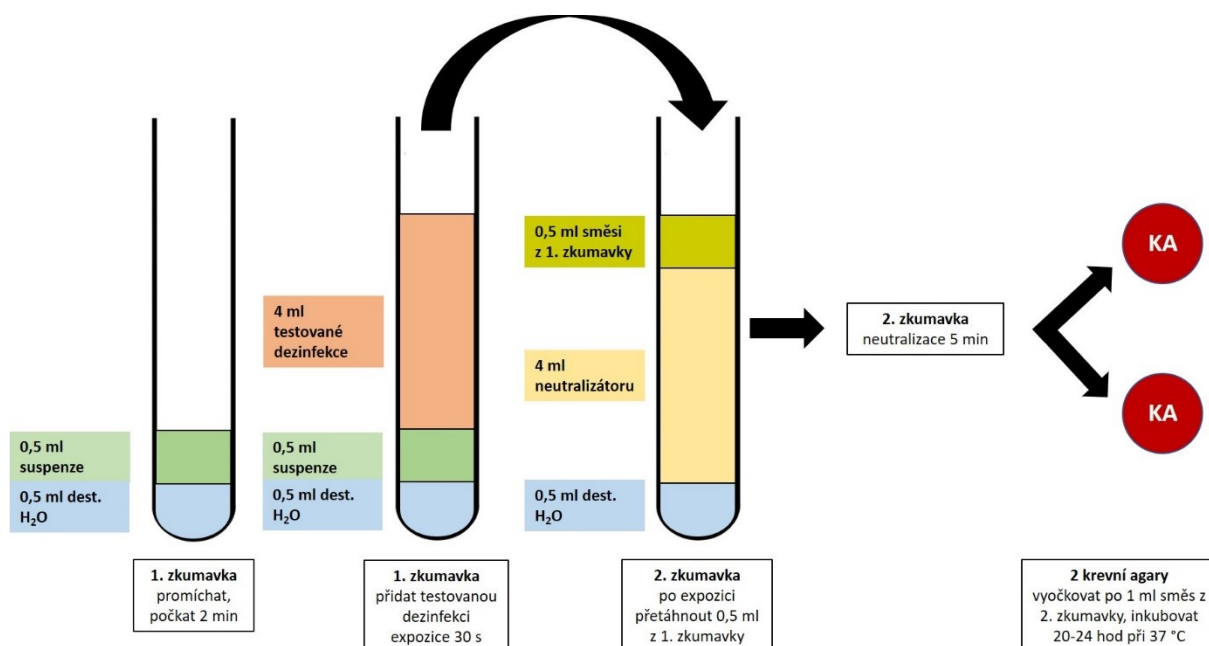
Příprava validační suspenze „Nv“

Pro přípravu validační suspenze je stejný postup jako u testovací suspenze, ovšem k dalšímu testování je potřeba pouze jedna koncentrace, a to 10^1 CFU/ml. Opět jsme odebrali ze zkumavky 2×1 ml suspenze a vyočkovali po 1 ml na dva krevní agary a nechali inkubovat při 37 °C po dobu 20–24 hodin.

Test „Na“ – stanovení baktericidní koncentrace

V tomto stanovení jsou použity obě koncentrace suspenze, tedy 10^2 a 10^1 CFU/ml, provádí se tedy dvojmo. Uvedený postup se pak opakuje pro všechny tři koncentrace testovaného dezinfekčního přípravku.

Do první zkumavky jsme napipetovali 0,5 ml destilované vody a 0,5 ml suspenze, promíchali jsme a 2 minuty nechali stát. Poté jsme přidali 4 ml dezinfekčního prostředku, promíchali jsme a nechali působit po dobu 30 sekund. Po uplynutí této doby jsme první zkumavku promíchali a odebrali z ní 0,5 ml směsi a napipetovali jsme ji do druhé zkumavky, kam jsme pak přidali 4 ml neutralizátoru. Opět jsme promíchali a nechali působit 5 minut. Poté jsme vyočkovali po 1 ml směsi na dva krevní agary a nechali inkubovat při 37 °C po dobu 20–24 hodin (Obrázek 13).

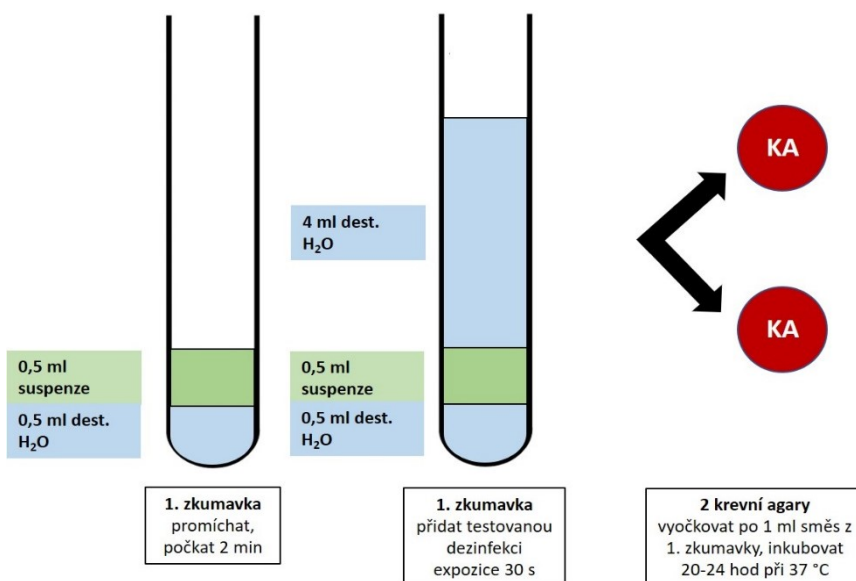


Obrázek 13 Pracovní postup – stanovení baktericidní koncentrace

Kontrola experimentálních podmínek „A“

Abychom ověřili, že nedochází k ovlivnění testu vlivem experimentálních podmínek, provádí se tato kontrola.

Do zkumavky jsme k 0,5 ml destilované vody přidali 0,5 ml validační suspenze, promíchali jsme, po 2 minutách jsme přidali 4 ml destilované vody, opět jsme promíchali a nechali působit 30 sekund. Znovu jsme promíchali a vyočkovali po 1 ml na dva krevní agary, které jsme inkubovali při 37 °C po dobu 20–24 hodin (Obrázek 14).

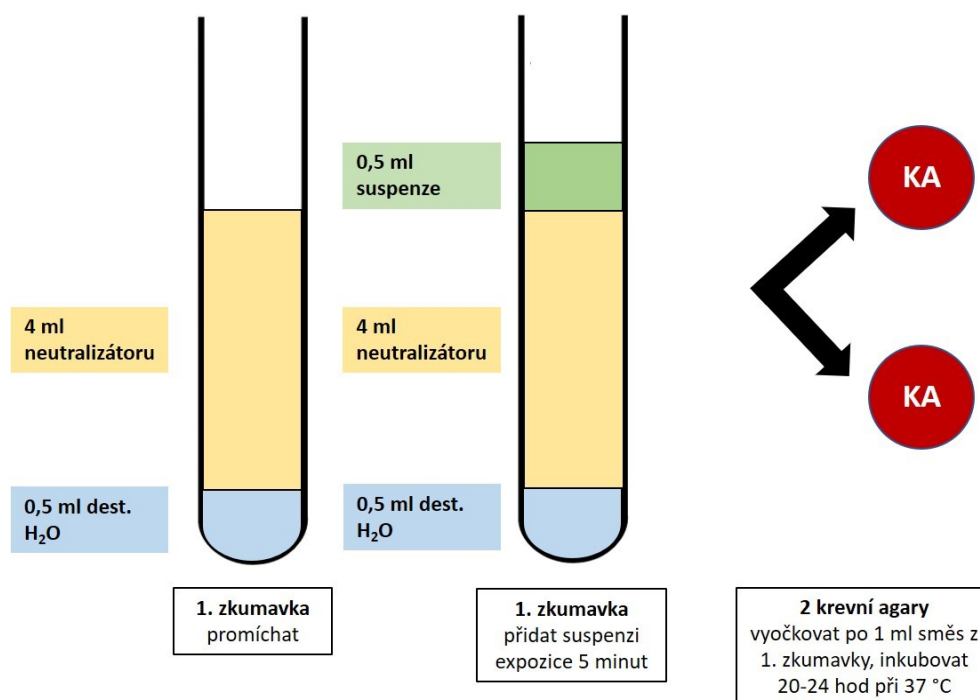


Obrázek 14 Pracovní postup – kontrola experimentálních podmínek

Kontrola toxicity neutralizátoru „B“

Prostřednictvím této kontroly jsme vyloučili možný toxický vliv neutralizátoru na testované bakterie.

Do zkumavky jsme napipetovali 0,5 ml destilované vody, 4 ml neutralizátoru a 0,5 ml validační suspenze, promíchali jsme a po 5 minutách jsme vyočkovali po 1 ml na dva krevní agary, které jsme inkubovali při 37 °C po dobu 20–24 hodin (Obrázek 15).

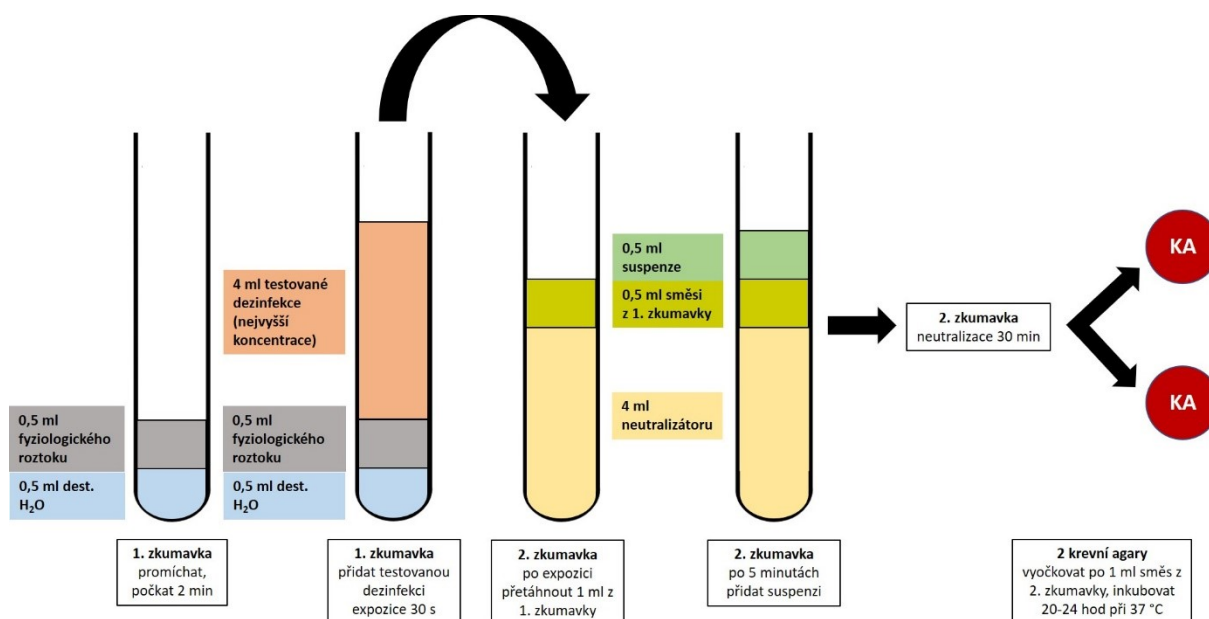


Obrázek 15 Pracovní postup – kontrola toxicity neutralizátoru

Validace metody „C“

Tímto postupem jsme ověřili, jestli neutralizátor eliminuje účinek dezinfekční látky, tedy jestli je naše metoda správná.

V první zkumavce jsme smíchali 0,5 ml fyziologického roztoku, 0,5 ml destilované vody a 4 ml dezinfekčního přípravku (nejvyšší koncentrace), promíchali jsme a nechali působit 30 sekund. Pak jsme odebrali z první zkumavky 0,5 ml směsi a přenesli do druhé zkumavky, kam jsme přidali 4 ml neutralizátoru, po promíchání jsme nechali působit 5 minut. Poté jsme přidali 0,5 ml validační suspenze, znovu jsme promíchali a nechali působit 30 minut. Následně jsme vyočkovali po 1 ml na dva krevní agary a inkubovali 20–24 hodin (Obrázek 16).



Obrázek 16 Pracovní postup – validace metody

Počítání kolonií

Po 24hodinové inkubaci jsme spočítali kolonie na plotnách a dali jsme je znovu inkubovat na dalších 24 hodin. Poté jsme je znovu spočítali, do výpočtů jsme použili eventuální vyšší počty kolonií. Limit pro počet kolonií byl 15–300, přípustná odchylka byla 10 %, tedy 14–330 kolonií na 1 ml. Pokud byly počty vyšší, zapsali jsme > 330, pokud byl počet nižší, pak jsme zapsali < 14.

Zpracování dat a výpočty

Veškeré výpočty u této metody vycházejí z počtu narostlých kolonií v 1 ml vzorku, a to u testované suspenze „N“ a validační suspenze „N_v“.

Výpočet „N“

„N“ udává počet buněk v 1 ml testované suspenze. Do výpočtu jsou zahrnuty počty kolonií z obou ředění suspenzí, tedy 10² a 10¹ CFU/ml.

$$N = \frac{C}{(n_1 + 0,1n_2)10^{-6}}$$

C – součet hodnot, tedy počtů kolonií z vyočkovaných suspenzí

n₁ – počet hodnot, které jsme zahrnuli do C u suspenze 10¹ CFU/ml

n₂ – počet hodnot, které jsme zahrnuli do C u suspenze 10² CFU/ml

10⁻⁶ – faktor zředění, který odpovídá nižšímu zředění

Hodnoty „N“ by se měly pohybovat v rozmezí 1,5 × 10⁸ až 5,0 × 10⁸ CFU/ml.

Výpočet „N₀“

Tato hodnota udává počet buněk v 1 ml suspenze na začátku testování, tedy v čase 0, a zohledňuje naředění suspenze destilovanou vodou a testovaným dezinfekčním přípravkem.

$$N_0 = \frac{N}{10}$$

Limit pro tuto hodnotu je tedy 10x nižší než pro „N“ – $1,5 \times 10^7$ až $5,0 \times 10^7$ CFU/ml.

Výpočet „N_a“

„N_a“ vyjadřuje počet přeživších bakterií v 1 ml po uplynutí doby expozice a použití neutralizátoru.

$$N_a = \frac{10c}{n}$$

c – součet hodnot, tedy počtů přeživších kolonií

n – počet hodnot, které jsme zahrnuli do výpočtu

Výpočet redukce počtu bakterií „R“

Redukce počtu bakterií je vyjádřena pomocí dekadického logaritmu, který udává o kolik řádů se snížil počet bakterií.

$$\log R = \log N_0 - \log N_a$$

Dezinfekční látka se považuje za účinnou, pokud dojde ke snížení počtu bakterií o více než 5 řádů, tedy hodnota $\log R \geq 5$. Pokud je hodnota $\log R < 5$ je dezinfekce neúčinná.

Výpočet „N_v“

„N_v“ udává počet buněk v 1 ml validační suspenze, jejíž koncentrace je 10^1 CFU/ml.

$$N_v = \frac{10c}{n}$$

Limit pro „N_v“ je v rozmezí $3,0 \times 10^2$ až $1,6 \times 10^3$ CFU/ml.

Výpočet „Nv₀“

Tato hodnota udává počet buněk v 1 ml na začátku testování, tedy v čase 0, a zohledňuje naředění validační suspenze destilovanou vodou a testovaným dezinfekčním přípravkem.

$$Nv_0 = \frac{c}{n}$$

Hodnoty „Nv₀“ by se měly pohybovat v rozmezí 30–160, což odpovídá $3,0 \times 10^1$ až $1,6 \times 10^2$ CFU/ml.

Výpočet „A“, „B“ a „C“

Hodnoty „A“, „B“ a „C“ vyjadřují počet přeživších bakterií v závislosti na experimentálních podmínkách (A), vlivu možné toxicity neutralizátoru (B) a v samotné validaci metody (C).

$$A, B, C = \frac{c}{n}$$

c – součet hodnot, tedy počtů přeživších kolonií

n – počet hodnot, které jsme zahrnuli do výpočtu

Hodnoty těchto kontrol by měly být $\geq Nv_0 \times 0,5$.

8. VÝSLEDKY

8.1 Stanovení minimální inhibiční koncentrace k vankomycinu a teikoplaninu

K ověření účinnosti dezinfekčních prostředků jsme použili celkem 35 kmenů enterokoků, z čehož 33 byly klinické izoláty a 2 sbírkové kmeny. V případě vankomycin citlivých enterokoků se jednalo o 11 klinických izolátů a jeden sbírkový kmen (*E. faecium*), u klinických izolátů byly 3 kmeny *E. faecium* a 8 kmenů *E. faecalis*. Vankomycin rezistentních kmenů bylo 22 klinických izolátů a 1 sbírkový kmen, všechny druhu *E. faecium* (Tabulka 5).

Tabulka 5 Stanovení MIC k vankomycinu a teikoplaninu

Označení izolátu	Druh	MIC mg/l	
		Vankomycin	Teikoplanin
VRE 1	<i>E. faecium</i>	256	32
VRE 2	<i>E. faecium</i>	> 256	64
VRE 3	<i>E. faecium</i>	> 256	64
VRE 4	<i>E. faecium</i>	128	32
VRE 5	<i>E. faecium</i>	256	32
VRE 6	<i>E. faecium</i>	128	32
VRE 7	<i>E. faecium</i>	128	64
VRE 8	<i>E. faecium</i>	128	64
VRE 9	<i>E. faecium</i>	> 256	128
VRE 10	<i>E. faecium</i>	256	64
VRE 11	<i>E. faecium</i>	128	64
VRE 12	<i>E. faecium</i>	128	1
VRE 13	<i>E. faecium</i>	128	64
VRE 14	<i>E. faecium</i>	256	16
VRE 15	<i>E. faecium</i>	256	32
VRE 16	<i>E. faecium</i>	> 256	128
VRE 17	<i>E. faecium</i>	256	1
VRE 18	<i>E. faecium</i>	256	16
VRE 19	<i>E. faecium</i>	128	32
VRE 20	<i>E. faecium</i>	> 256	128
VRE 21	<i>E. faecium</i>	128	64
VRE 22	<i>E. faecium</i>	128	64
VRE Sb. CNCTC 7460	<i>E. faecium</i>	256	32
VSE 1	<i>E. faecalis</i>	0,5	0,25
VSE 2	<i>E. faecalis</i>	1	0,25
VSE 3	<i>E. faecium</i>	2	0,5
VSE 4	<i>E. faecalis</i>	1	0,125
VSE 5	<i>E. faecalis</i>	0,5	0,25
VSE 6	<i>E. faecalis</i>	0,5	0,125
VSE 7	<i>E. faecalis</i>	1	0,25
VSE 8	<i>E. faecalis</i>	1	0,25
VSE 9	<i>E. faecalis</i>	0,5	0,25
VSE 10	<i>E. faecium</i>	2	0,5
VSE 11	<i>E. faecium</i>	1	0,25
VSE Sb. CNCTC 5773	<i>E. faecium</i>	0,5	0,5

Vysvětlivky: VRE – vankomycin rezistentní enterokoky, VSE – vankomycin citlivé enterokoky, CNCTC – Česká národní sbírka typových kultur, Sb. – sbírkový kmen, MIC – minimální inhibiční koncentrace

Z VRE bylo celkem 8 kmenů zachyceno na anesteziologicko-resuscitačním oddělení, 5 kmenů na interním oddělení, po 4 kmenech na kardiochirurgii a cévní chirurgii a 1 kmen pak na neurochirurgii. Izoláty VSE pak pocházely hlavně z interního oddělení, kde bylo zachyceno 5 kmenů a dále tu byl záchyt po 2 kmenech ze tří oddělení – kardiologie, cévní chirurgie a neurologie.

8.2 Výsledky účinnosti dezinfekčních prostředků

Testovali jsme účinnost 7 alkoholových dezinfekčních prostředků, z toho bylo 6 komerčně vyráběných, 1 jsme si připravili sami. Všechny uvedené výsledky jsou vztažené ke koncentraci 1 (účinná), jde tedy o neředěný dezinfekční prostředek. U obou ředěných koncentrací byly výsledky shodné s koncentrací 1. Výsledky jsme rozdělili podle citlivosti/rezistence k vankomycinu. Dále uvádíme i výsledky kontrol experimentálních podmínek „A“, možné toxicity neutralizátoru „B“ a validace metody „C“.

8.2.1 Výsledky účinnosti u vankomycin citlivých enterokoků

U všech kmenů vankomycin citlivých enterokoků jsme zaznamenali téměř shodnou redukci bakterií, která byla vyjádřena hodnotou log R, jenž se pohybovala okolo hodnot < 4 (Tabulka 6). Vzhledem k masivnímu růstu bakterií přesáhl jejich počet počítatelný limit 330 kolonií, hodnoty log R uvedené v tabulkách s výsledky proto vyjadřují maximální redukci. Dezinfekce jsou označeny jako účinné, pokud je $\log R \geq 5$. Na základě tohoto kritéria jsme vyhodnotili všechny testované dezinfekce za neúčinné vůči testovaným vankomycin citlivým enterokokům, a to bez ohledu na jejich druh.

Tabulka 6 Výsledky účinnosti dezinfekčních prostředků na VSE

Izolát	Druh	Hodnoty log R						
		Manusept® basic	Promanum® pure	Skinman® soft N	Sterillium® med	Septoderm®	Sterillium®	75% IPA
VSE 1	<i>E. faecalis</i>	< 3,99	< 3,99	< 3,91	< 3,92	< 4,01	< 4,01	< 4,10
VSE 2	<i>E. faecalis</i>	< 4,07	< 4,07	< 4,07	< 4,07	< 4,07	< 4,07	< 4,00
VSE 3	<i>E. faecium</i>	< 3,78	< 3,78	< 3,78	< 3,78	< 3,78	< 3,78	< 3,81
VSE 4	<i>E. faecalis</i>	< 3,85	< 3,85	< 3,83	< 3,83	< 3,83	< 3,83	< 4,01
VSE 5	<i>E. faecalis</i>	< 3,94	< 3,94	< 3,94	< 3,94	< 3,94	< 3,94	< 4,09
VSE 6	<i>E. faecalis</i>	< 4,03	< 4,03	< 4,03	< 4,03	< 4,03	< 4,03	< 4,02
VSE 7	<i>E. faecalis</i>	< 4,09	< 4,09	< 4,12	< 4,12	< 4,12	< 4,12	< 4,08
VSE 8	<i>E. faecalis</i>	< 4,09	< 4,09	< 4,13	< 4,13	< 4,13	< 4,13	< 3,97
VSE 9	<i>E. faecalis</i>	< 4,03	< 4,03	< 4,03	< 4,03	< 4,03	< 4,03	< 3,99
VSE 10	<i>E. faecium</i>	< 3,95	< 3,95	< 3,88	< 3,88	< 3,88	< 3,88	< 3,98
VSE 11	<i>E. faecium</i>	< 3,95	< 3,95	< 3,95	< 3,95	< 3,95	< 3,95	< 3,90
VSE Sb.	<i>E. faecium</i>	< 3,93	< 3,93	< 3,96	< 3,96	< 3,96	< 3,96	< 3,96

Výsledky kontrolních suspenzí vycházely z počtu přeživších bakterií (c/n), jejichž hodnota měla být vyšší nebo rovna poloviční hodnotě validační suspenze v čase nula ($N_{v0} \times 0,5$). U všech kontrolních suspenzí byla tato podmínka splněna, což znamená, že výsledky kontrolních suspenzí izolátů VSE neprokázaly negativní vliv experimentálních podmínek, ani toxicitu neutralizátoru a také hodnoty validace „C“ jsou v požadovaném rozmezí (Tabulka 7).

Tabulka 7 Výsledky kontrol „A“, „B“ a „C“ u VSE

Izolát	Kontrola	Manusept® basic		Promanum® pure		Skinman® soft N		Sterillium® med		Septoderm®		Sterillium®		75% propan-2-ol	
		$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$
VSE 1	A	> 330	17,50	> 330	17,50	> 330	17,00	> 330	17,00	> 330	19,75	> 330	19,75	> 330	20,50
	B	> 330	17,50	> 330	17,50	> 330	17,00	> 330	17,00	> 330	19,75	> 330	19,75	> 330	20,50
	C	> 330	17,50	> 330	17,50	> 330	17,00	> 330	17,00	> 330	19,75	> 330	19,75	> 330	20,50
VSE 2	A	> 330	26,25	> 330	26,25	> 330	26,25	> 330	26,25	> 330	26,25	> 330	26,25	> 330	17,00
	B	> 330	26,25	> 330	26,25	> 330	26,25	> 330	26,25	> 330	26,25	> 330	26,25	> 330	17,00
	C	> 330	26,25	> 330	26,25	> 330	26,25	> 330	26,25	> 330	26,25	> 330	26,25	> 330	17,00
VSE 3	A	> 330	16,00	> 330	16,00	> 330	16,00	> 330	16,00	> 330	16,00	> 330	16,00	> 330	15,50
	B	> 330	16,00	> 330	16,00	> 330	16,00	> 330	16,00	> 330	16,00	> 330	16,00	> 330	15,50
	C	> 330	16,00	> 330	16,00	> 330	16,00	> 330	16,00	> 330	16,00	> 330	16,00	> 330	15,50
VSE 4	A	> 330	20,75	> 330	20,75	> 330	15,75	> 330	15,75	> 330	15,75	> 330	15,75	> 330	18,50
	B	> 330	20,75	> 330	20,75	> 330	15,75	> 330	15,75	> 330	15,75	> 330	15,75	> 330	18,50
	C	> 330	20,75	> 330	20,75	> 330	15,75	> 330	15,75	> 330	15,75	> 330	15,75	> 330	18,50
VSE 5	A	> 330	16,25	> 330	16,25	> 330	16,25	> 330	16,25	> 330	16,25	> 330	16,25	> 330	25,25
	B	> 330	16,25	> 330	16,25	> 330	16,25	> 330	16,25	> 330	16,25	> 330	16,25	> 330	25,25
	C	> 330	16,25	> 330	16,25	> 330	16,25	> 330	16,25	> 330	16,25	> 330	16,25	> 330	25,25
VSE 6	A	> 330	19,50	> 330	19,50	> 330	19,50	> 330	19,50	> 330	19,50	> 330	19,50	> 330	19,25
	B	> 330	19,50	> 330	19,50	> 330	19,50	> 330	19,50	> 330	19,50	> 330	19,50	> 330	19,25
	C	> 330	19,50	> 330	19,50	> 330	19,50	> 330	19,50	> 330	19,50	> 330	19,50	> 330	19,25
VSE 7	A	> 330	21,25	> 330	21,25	> 330	23,00	> 330	23,00	> 330	23,00	> 330	23,00	> 330	19,25
	B	> 330	21,25	> 330	21,25	> 330	23,00	> 330	23,00	> 330	23,00	> 330	23,00	> 330	19,25
	C	> 330	21,25	> 330	21,25	> 330	23,00	> 330	23,00	> 330	23,00	> 330	23,00	> 330	19,25
VSE 8	A	> 330	23,00	> 330	23,00	> 330	28,00	> 330	28,00	> 330	28,00	> 330	28,00	> 330	18,25
	B	> 330	23,00	> 330	23,00	> 330	28,00	> 330	28,00	> 330	28,00	> 330	28,00	> 330	18,25
	C	> 330	23,00	> 330	23,00	> 330	28,00	> 330	28,00	> 330	28,00	> 330	28,00	> 330	18,25
VSE 9	A	> 330	18,25	> 330	18,25	> 330	18,25	> 330	18,25	> 330	18,25	> 330	18,25	> 330	16,75
	B	> 330	18,25	> 330	18,25	> 330	18,25	> 330	18,25	> 330	18,25	> 330	18,25	> 330	16,75
	C	> 330	18,25	> 330	18,25	> 330	18,25	> 330	18,25	> 330	18,25	> 330	18,25	> 330	16,75
VSE 10	A	> 330	15,75	> 330	15,75	> 330	17,50	> 330	17,50	> 330	17,50	> 330	17,50	> 330	16,25
	B	> 330	15,75	> 330	15,75	> 330	17,50	> 330	17,50	> 330	17,50	> 330	17,50	> 330	16,25
	C	> 330	15,75	> 330	15,75	> 330	17,50	> 330	17,50	> 330	17,50	> 330	17,50	> 330	16,25
VSE 11	A	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	15,25
	B	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	15,25
	C	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	15,25
VSE Sb.	A	> 330	15,00	> 330	15,00	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,00
	B	> 330	15,00	> 330	15,00	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,00
	C	> 330	15,00	> 330	15,00	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,75	> 330	16,00

8.2.2 Výsledky účinnosti u vankomycin rezistentních enterokoků

Hodnoty log R se i v případě vankomycin rezistentních enterokoků pohybovaly okolo hodnoty < 4 (Tabulka 8). Podle výše zmíněného kritéria hodnocení účinnosti jsme tedy museli konstatovat, že jsou všechny testované alkoholové dezinfekční prostředky neúčinné.

Tabulka 8 Výsledky účinnosti dezinfekčních prostředků na VRE

Izolát	Druh	Hodnoty log R						
		Manusept® basic	Promanum® pure	Skinman® soft N	Sterillium® med	Septoderm®	Sterillium®	75% IPA
VRE 1	<i>E. faecium</i>	< 3,87	< 3,87	< 3,87	< 3,87	< 3,74	< 3,74	< 3,84
VRE 2	<i>E. faecium</i>	< 3,90	< 3,90	< 3,86	< 3,86	< 3,82	< 3,82	< 4,05
VRE 3	<i>E. faecium</i>	< 3,83	< 3,83	< 3,86	< 3,86	< 3,89	< 3,89	< 3,93
VRE 4	<i>E. faecium</i>	< 3,85	< 3,85	< 3,93	< 3,93	< 3,89	< 3,89	< 4,00
VRE 5	<i>E. faecium</i>	< 3,90	< 3,90	< 3,92	< 3,92	< 3,98	< 3,98	< 3,91
VRE 6	<i>E. faecium</i>	< 3,98	< 3,98	< 4,00	< 4,00	< 4,00	< 4,00	< 3,93
VRE 7	<i>E. faecium</i>	< 3,99	< 3,99	< 3,89	< 3,89	< 3,97	< 3,97	< 3,88
VRE 8	<i>E. faecium</i>	< 3,75	< 3,75	< 3,90	< 3,90	< 3,82	< 3,82	< 3,86
VRE 9	<i>E. faecium</i>	< 3,85	< 3,85	< 3,84	< 3,84	< 3,91	< 3,91	< 3,81
VRE 10	<i>E. faecium</i>	< 3,86	< 3,86	< 3,92	< 3,92	< 3,93	< 3,93	< 3,98
VRE 11	<i>E. faecium</i>	< 4,01	< 4,01	< 4,02	< 4,02	< 4,02	< 4,02	< 3,86
VRE 12	<i>E. faecium</i>	< 4,04	< 4,04	< 4,04	< 4,04	< 4,04	< 4,04	< 4,02
VRE 13	<i>E. faecium</i>	< 4,03	< 4,03	< 4,03	< 4,03	< 4,03	< 4,03	< 4,01
VRE 14	<i>E. faecium</i>	< 4,00	< 4,00	< 4,00	< 4,00	< 4,00	< 4,00	< 3,85
VRE 15	<i>E. faecium</i>	< 3,98	< 3,98	< 3,98	< 3,98	< 3,98	< 3,98	< 3,97
VRE 16	<i>E. faecium</i>	< 4,00	< 4,00	< 4,00	< 4,00	< 4,00	< 4,00	< 4,03
VRE 17	<i>E. faecium</i>	< 3,97	< 3,97	< 3,97	< 3,97	< 3,97	< 3,97	< 3,85
VRE 18	<i>E. faecium</i>	< 3,98	< 3,98	< 3,98	< 3,98	< 3,98	< 3,98	< 3,96
VRE 19	<i>E. faecium</i>	< 3,81	< 3,81	< 3,81	< 3,81	< 3,81	< 3,81	< 3,89
VRE 20	<i>E. faecium</i>	< 3,76	< 3,76	< 3,74	< 3,74	< 3,74	< 3,74	< 3,92
VRE 21	<i>E. faecium</i>	< 3,95	< 3,95	< 3,90	< 3,90	< 3,90	< 3,90	< 4,06
VRE 22	<i>E. faecium</i>	< 3,88	< 3,88	< 3,88	< 3,88	< 3,88	< 3,88	< 4,06
VRE Sb.	<i>E. faecium</i>	< 3,75	< 3,75	< 3,95	< 3,95	< 3,95	< 3,95	< 3,95

Ani v případě izolátů VRE nám výsledky validace „C“ nenaznačily, že by mohlo jít o chyby v pracovním postupu, hodnoty kontrolních suspenzí „A“ a „B“ rovněž neprokázaly žádné vlivy experimentálních podmínek, ani toxicity neutralizátoru (Tabulka 9).

9. DISKUZE

Testováním účinnosti alkoholových dezinfekčních prostředků se v posledních 30 letech zabývala řada studií, u mnoha z nich byly do výběru bakterií zahrnuty i druhy rodu *Enterococcus*. Od 90. let minulého století se této tématice začala věnovat zvýšená pozornost, a to i v souvislosti se zvyšující se antimikrobiální rezistencí. První VRE byly v Evropě izolovány v roce 1986 a následujících letech se rozšířily po celém světě. Vystala tedy oprávněná obava, zda budou používané dezinfekční prostředky účinné i proti těmto rezistentním kmenům rodu *Enterococcus*.

Ve studii Wade *et al.* v roce 1991 kontaminovali ruce 3 dobrovolníků VRE druhu *E. faecium*. K dezinfekci rukou pak použili 60% propan-2-ol a 0,5% chlorhexidin v kombinaci se 70% propan-2-olem. Dobrovolníci si dezinfikovali ruce 5 ml testovaného přípravku po dobu 30 sekund, poté nechali dalších 30 sekund ruce schnout. Následně byly odebírány vzorky z různých prstů po 3, 10 a 30 minutách od zaschnutí přípravku. Již po 3 minutách došlo k redukci bakterií o 4 log₁₀ CFU, tyto hodnoty byla naměřeny také po 10 a 30 minutách. Dle parametrů hodnocení této studie byly všechny testované dezinfekční látky považovány za účinné (Wade *et al.*, 1991). Přestože se redukce bakterií dosažené v této studii shodují s našimi výsledky, použitá metoda testování účinnosti a její vyhodnocení jsou odlišné. Přesto tuto studii uvádíme, protože byla jedna z prvních, která se zabývala hygienickou dezinfekcí rukou v souvislosti s její účinností na VRE.

Diluční metoda s použitím neutralizátoru byla v souvislosti s VRE použita ve studii Bradley a Fraiser z roku 1996. Do testování bylo zařazeno 8 klinických izolátů, 4 *E. faecalis* a 4 *E. faecium* a 1 sbírkový kmen *E. faecalis* NCTC 775. Celkem 5 kmenů jsou vankomycin citlivé a 4 kmeny jsou VRE (konkrétní druhy VSE a VRE neuvedeny). Jako dezinfekční přípravek byl použit 45% alkohol (blíže nespecifikovaný), expozice byly 30 sekund, 1 minuta a 5 minut. Po 30 sekundách byla zaznamenána redukce vyšší než 5 log₁₀ CFU pouze u 1 citlivého kmenu, po 1 minutě pak u 1 citlivého a 2 rezistentních kmenů a po 5 minutách u 2 citlivých a 2 rezistentních kmenů. U 1 citlivého kmenu nebyla ani po 5 minutách zaznamenána redukce vyšší než 4 log₁₀ CFU. Dle autorů studie byl tento neuspokojivý výsledek působení 45% alkoholu na enterokoky způsoben právě nižší koncentrací dezinfekčního prostředku (Bradley a Fraiser, 1996).

Komerční alkoholové dezinfekční prostředky byly v souvislosti s VRE testovány již ve studii Kampf *et al.* z roku 1999. Jednalo se o přípravky Sterillium® (45 % propan-2-olu, 30 % propan-1-olu a 0,2 % mecetronium etylsulfátu), Skinsept F® (70 % propan-2-olu, 0,5 % chlorhexidin diglukonátu a 0,45 % peroxidu vodíku) a Hibisol® (70 % propan-2-olu a 0,5 % chlorhexidin glukonátu). Pro porovnání byl do studie zařazen také propan-1-ol. U komerčních přípravků byly použity koncentrace 100 a 50 %, u propan-1-olu pak 30 a 60 %. K provedení kvantitativního suspenzního testu bylo použito 11 odlišných izolátů enterokoků. 4 izoláty byly citlivé k vankomycinu, 4 byly *vanA* VRE a zbývající *vanB* VRE. 8 izolátů bylo identifikováno jako *Enterococcus faecium*, dva jako *Enterococcus faecalis* a jeden jako *Enterococcus gallinarum*. Zvolené expozice byly 15 a 30 sekund. U všech přípravků ve všech koncentracích byl zaznamenán už po 15 sekundách vysoce baktericidní účinek, redukční faktor měl hodnoty > 6,4. Mezi izoláty *vanA*, *vanB* a VSE nebyl pozorován žádný významný rozdíl (Kampf *et al.*, 1999).

V roce 2018 byly uveřejněny výsledky studie Pidota *et al.*, ve které testovali míru odolnosti enterokoků k alkoholovým dezinfekčním prostředkům. Použité klinické izoláty *E. faecium* (139 kmenů, z toho 66 VRE) pocházely z let 1997–2015. V tomto období postupně stoupala spotřeba alkoholové dezinfekce, a to až na 10násobek v porovnání s rokem 2001. Cílem této studie bylo zjistit, zda na toto zvýšení spotřeby enterokoky zareagovaly a staly se odolnější vůči alkoholům. Aby bylo možné sledovat rozdíly v růstu po expozici alkoholem, bylo potřeba stanovit vhodnou koncentraci propan-2-olu. Nejprve byla použita vyšší koncentrace 70 %, při které však došlo k redukci o 8 log₁₀, což bylo pro testování nežádoucí, koncentraci bylo nutné snížit a pro testování byl nakonec použit 23% propan-2-ol, expozice pak byla 5 minut. Hodnocena byla redukce přeživších bakterií a mezi jednotlivými kmeny byly zjištěny velké rozdíly, a to až o 4,7 log₁₀ CFU. Pozdější izoláty byly více odolné vůči působení propan-2-olu, izoláty zachycené po roce 2010 byly 10krát odolnější než ty z let předchozích. Tato možná adaptace VRE na některé dezinfekční prostředky může mít vliv na současná protiepidemická opatření a je možné, že v budoucnu bude nutná jejich změna (Pidot *et al.*, 2018). Výsledky tří výše uvedených studií naznačují, že v průběhu posledních 30 let došlo u enterokoků k postupnému zvyšování tolerance k alkoholovým dezinfekčním prostředkům. Další výzkum v této oblasti je tedy opodstatněný, a to hlavně v souvislosti s prevencí výskytu a šíření nozokomiálních nákaz.

Závěry Pidotovy studie byly zveřejněny i světovými médii (The Guardian, Reuters, NBC a The Times), která uvedla, že hygienická dezinfekce rukou alkoholovými dezinfekčními prostředky přestává být účinná. K této interpretaci se v odborném recenzovaném časopisu The Lancet vyjádřili odborníci, kteří se dlouhodobě zabývají hygienickou dezinfekcí rukou a jejímu prosazování v rámci prevence přenosu infekčního agens ve zdravotnických zařízeních. Uvedli, že alkoholové dezinfekční prostředky užívané v nemocnicích obsahují 60–90 % alkoholu a u těchto koncentrací nebyla prokázána rezistence, proto není odolnost k 23% alkoholu klinicky relevantní. Poukázali rovněž na skutečnost, že alkoholové dezinfekční přípravky jsou na seznamu základních farmaceutických přípravků WHO a každoročně zachraňují miliony životů. Závěrem uvedli, že nesprávná interpretace významu výsledků laboratorních studií může vést k závažným negativním důsledkům (Pittet *et al.*, 2018).

Na podporu účinnosti alkoholových dezinfekčních prostředků pak byla v roce 2019 uveřejněna studie Gebel *et al.*, která částečně kopíruje Pidotův postup. Kromě 23% propan-2-olu byly použity ještě dvě koncentrace alkoholu, a to 60 a 70 %. Testovanými kmeny byly *E. faecium* – 1 sbírkový kmen, 2 klinické kmeny (ze Švýcarska a z Austrálie, přímo od Pidota) a 1 sbírkový kmen *E. hirae*. Použity byly rozdílné expozice dle koncentrace propan-2-olu, 5 a 15 minut u nízké (23 %), 15, 30 a 60 sekund u vyšších (60 a 70 %).

Navíc byl sledován i vliv organické zátěže, která by mohla ovlivnit účinnost při praktickém použití. Byly použity různé typy organické zátěže – porovnány byly vzorky bez organické zátěže, s 0,03 % sérového albuminu a s 0,3 % sérového albuminu a 0,3 % ovčích erytrocytů. U všech kmenů byla v případě 23% propan-2-olu zaznamenána redukce pouze okolo 1 log₁₀ a to nejen po 5, ale i 15 minutách, zatímco u vyšších koncentrací byly už po 15 sekundách zaznamenány redukce bakterií > 5,5 log₁₀, což potvrdilo účinnost 60 a 70% propan-2-olu. V druhé půlce této studie se autoři věnovali také možnému vlivu množství použité dezinfekce a to metodou 4 polí. Do testování byly zařazeny pouze 3 výše zmíněné kmeny *E. faecium*. Rovněž byly zařazeny vzorky bez organické zátěže a s 0,03 % sérovým albuminem. Pro simulaci povrchu, který má být ošetřen alkoholem byl použit polyvinylchlorid (PVC). Za baktericidní účinek byla i u této metody považována redukce > 5 log₁₀ a použity byly expozice 1 a 5 minut. Po aplikaci 8 ml 70% propan-2-olu byla zaznamenána nižší účinnost s průměrnou redukcí 4,05–4,74 log₁₀. V případě aplikace 16 ml už byla

redukce po 1 minutě vyšší a dostatečná pro potvrzení účinnosti 70% propan-2-olu, průměr redukce byl 5,85 log₁₀. Nebyl zaznamenán žádný významný vliv organické zátěže (Gebel *et al.*, 2019). Tato studie nám ukázala, že objem použitého dezinfekčního prostředku by mohl mít vliv na účinnost dezinfekční látky. Na základě těchto výsledků jsme zvažovali, zda v našem případě nemohl být objem dezinfekčního přípravku pro expozici 30 sekund nedostatečný.

Další studie Suchomel *et al.* v roce 2019 se zabývala otázkou, zda je *E. hirae*, který je doporučován výrobcí dezinfekčních přípravků, vhodným zástupcem enterokoků pro testování účinnosti dezinfekčních prostředků, když rozšířenější a klinicky významnější jsou *E. faecalis* a *E. faecium*. Do testování tedy byly zařazeny všechny tři druhy v podobě sbírkových kmenů. Jako alkoholový dezinfekční prostředek byl použit ethanol, a to v 5 koncentracích 25, 40, 50, 60 a 70 %, doby expozice byly 30 sekund, 1 a 5 minut. V případě 25% ethanolu byly redukce při všech expozicích přibližně stejné a hodnoty se pohybovaly v rozmezí 1,16–1,46 log₁₀. U 40% ethanolu byly výsledky podobné, redukce 1,16–1,36 log₁₀, ovšem u expozice 5 minut byly zaznamenány u dvou kmenů vyšší redukce, u *E. faecalis* 4,11 log₁₀ a u *E. hirae* 7,31 log₁₀. Rozdíl v redukci byl zaznamenán i u 50% ethanolu, zatímco u *E. faecalis* a *E. hirae* byly hodnoty redukce nad 7 log₁₀ u všech časů expozic, tak u *E. faecium* byla redukce nad 7 log₁₀ zaznamenána až po 5 minutách. Po 30 sekundách a 1 minutě byla redukce jen okolo 5,5 log₁₀. U vyšších koncentrací ethanolu, tedy 60 a 70 % byly všechny hodnoty redukce vyšší než 7 log₁₀. *E. hirae* je vhodným kmenem enterokoků pro testování vyšších koncentrací ethanolu, v případě koncentrací pod 50 % by měly být zahrnuty do testování spíše klinické kmeny *E. faecalis* a hlavně *E. faecium* (Suchomel *et al.*, 2019). Jediným námi testovaným dezinfekčním přípravkem, který obsahuje pouze ethanol je Manusept® basic (koncentrace ethanolu 70–90 %). Můžeme tedy porovnat výsledky studie pro 70% ethanol po expozici 30 sekund, kdy byla redukce více než 7 log₁₀, v našem případě byla po 30 sekundách redukce nižší, a to méně než 4 log₁₀. V naší studii jsme kromě klinických izolátů VRE a VSE použili také dva sbírkové kmeny, které ovšem nebyly totožné se sbírkovými kmeny z výše uvedené studie.

Vhodností diluční metody s neutralizátorem pro testování účinnosti dezinfekčních prostředků se zabývala studie Chojecka *et al.* z roku 2017. Klíčovou součástí této metody je neutralizátor, jehož úlohou je v co nejkratším čase eliminovat účinek dezinfekčního prostředku, čímž zajistí jeho neutralizaci. Neutralizátor je obvykle

směs organických a anorganických sloučenin vhodně vybraných pro typ účinné látky přítomné ve zkoušeném přípravku. Po reakci s účinnými látkami by neutralizátor neměl vytvářet toxické produkty, rovněž by neměl inaktivovat mikroorganismy použité pro testování.

Tyto vlastnosti neutralizátoru se v rámci metody testování účinnosti dezinfekčních prostředků zjišťují prostřednictvím kontroly – validace „C“ a při kontrole toxicity neutralizátoru pro testované mikroorganismy – kontrola „B“. Třetí kontrola pak slouží k vyloučení vlivu experimentálních podmínek na testování účinnosti – kontrola „A“. V této studii byly ověřeny všechny 3 kontroly, aby byly výsledky těchto kontrol označeny za vyhovující, bylo potřeba, aby počet přeživších bakterií byl roven nebo převyšoval polovinu počtu bakterií ve validační suspenzi Nv v čase 0. Testovanými mikroorganismy byly 4 druhy bakterií: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* a *Enterococcus hirae*. K testování byly použity dvě koncentrace ethanolu – 70 a 89 %, k neutralizaci ethanolu byl zvolen neutralizátor o následujícím složení: polysorbát 80 – 30 g/l, saponin – 30 g/l a lecitin – 3 g/l v roztoku.

V případě kontroly „A“, byly použity dvě expozice 15 sekund a 1 minuta. Bylo potvrzeno, že tato kontrola je vhodná pro zjištění letálního účinku experimentálních podmínek. U kontroly „B“ byla vzhledem ke krátkému času expozice u alkoholových dezinfekčních prostředků použita v tomto testování neutralizace jen po dobu 10 sekund místo 5 minut, jak je stanoveno v zadání metody. Nebyl prokázán žádný toxický vliv tohoto neutralizátoru, a i v tomto případě byla tato kontrola vyhodnocena jako vyhovující. Poslední kontrolou je samotná validace metody, tedy validace „C“. I zde byla použita zkrácená doba neutralizace 10 sekund a byly použity dvě různé expozice, 15 sekund pro 89% ethanol a 1 minuta pro 70% ethanol. Dle zjištění neutralizátor eliminoval účinky testovaných přípravků, a to u obou koncentrací a neomezil růst testovaných mikroorganismů. Nebyly zjištěny žádné interakce mezi neutralizátorem, dezinfekčními prostředky a testovanými mikroorganismy. Tato validace byla vyhodnocena jako vhodná pro ověření zvolených parametrů a reagensů pro testování účinnosti dezinfekčních látek. Rovněž bylo prokázáno, že i zkrácený čas neutralizace na 10 sekund je dostatečný pro účinnou eliminaci dezinfekčního účinku v případě alkoholových dezinfekčních prostředků.

V rámci této studie bylo provedeno i samotné testování účinnosti ethanolu. Pro kmeny *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* byla použita koncentrace 89 %, pro kmeny *Enterococcus hirae* a *Escherichia coli* pak 70 %. Expozice byly

stanoveny na 15 sekund pro 89% ethanol a 1 minutu pro 70% ethanol. U všech kmenů došlo k redukci počtu bakterií $> 5,4 \log_{10}$, obě koncentrace ethanolu byly tedy vyhodnoceny jako účinné (Chojecka *et al.*, 2017). Výsledky této studie napovídají, že jednotlivé kontroly, které jsou součástí platné normy pro testování dezinfekčních prostředků, jsou vhodné pro ověření správnosti provedení této metody.

V roce 2005 Gordin *et al.* zveřejnili přehled výskytu tří klinicky významných multirezistentních bakterií (MRSA, VRE a *Clostridioides difficile*), které jsou původci nozokomiálních nákaz a které byly izolovány v letech 1998–2003 v Nemocnici pro válečné veterány, Washington DC. (USA). Cílem této studie bylo ověřit, zda došlo k poklesu případů nozokomiálních nákaz po roce 2001, kdy vydalo Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC, USA) doporučení používat k dekontaminaci rukou alkoholové dezinfekční prostředky místo antibakteriálního mýdla. V této nemocnici použili nástěnné dávkovače, které obsahovaly 62,5% ethanol určený k hygienické dezinfekci rukou. Počet izolátů VRE a *Clostridioides difficile* byl během 3 let před zavedením alkoholové dezinfekce téměř shodný. Výskyt MRSA byl poněkud méně stabilní, a to s nárůstem v roce 1998. Po zavedení alkoholové dezinfekce byl v porovnání s předchozími 3 lety zaznamenán pokles o 41 % v počtu nově získaných nozokomiálních nákaz s původcem VRE a 21% pokles v případě nozokomiálního patogenu MRSA. Výskyt nových izolátů *Clostridioides difficile* se v podstatě nezměnil (Gordin *et al.*, 2005). Sledování výskytu nozokomiálních nákaz v souvislosti s užíváním dezinfekčních prostředků je užitečným ukazatelem jejich účinnosti. Ovšem je třeba vzít v úvahu i to, zda jsou dezinfekční prostředky užívány správně, v dostatečném množství a jsou pravidelně střídány v rámci dezinfekčních plánů jednotlivých pracovišť.

Zvážili jsme různé možnosti, proč se naše výsledky rozcházejí s výsledky studií publikovaných v průběhu 30 let. Kontroly včetně validace metody „C“ byly provedeny dle dosud platné normy a vyhodnoceny jako vhodné pro tuto metodu hodnocení účinnosti dezinfekčních prostředků a všechny jejich výsledky byly ve stanoveném rozmezí. V uvedených studiích se lišily jednotlivé prostředky ve složení a koncentraci. Rovněž byly použity různé expozice, testované kmeny a v neposlední řadě i použité metodiky testování. Vzhledem k odlišným parametrům uvedených studií je srovnání s našimi výsledky nesnadné. Je také možné, že existují další faktory, které jsme nezohlednili, a mohou být důvodem našich výsledků, které nekorespondují s dlouhodobým výzkumem účinnosti alkoholových dezinfekčních prostředků.

10. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo ověřit účinnost alkoholových dezinfekčních prostředků vůči vankomycin citlivým a vankomycin rezistentním enterokokům. Ke zjištění účinnosti jsme použili celkem 35 kmenů enterokoků, z toho byly 2 kmeny sbírkové a 33 kmenů klinické izoláty, které byly zachyceny v Nemocnici Na Homolce v Praze. 12 kmenů bylo vankomycin citlivých (4 kmeny *E. faecium* a 8 kmenů *E. faecalis*) a 23 kmenů bylo vankomycin rezistentní (všechny *E. faecium*). Účinnost jsme ověřovali u 7 alkoholových dezinfekčních prostředků určených k hygienické dezinfekci rukou a s různými typy alkoholů. Hygienická dezinfekce rukou, pro kterou jsou tyto alkoholové dezinfekční prostředky určeny, by se měla provádět minimálně po dobu 30 sekund, proto jsme zvolili tuto expozici. U všech dezinfekčních přípravků jsme zaznamenali nižší redukci bakterií, nemohli jsme tedy potvrdit baktericidní účinnost vybraných alkoholových dezinfekčních přípravků vůči klinicky významným enterokokům.

Hygienická dezinfekce rukou je podstatnou součástí prevence přenosu infekčního agens. V současné době se její užívání rozšířilo i mezi širokou veřejnost, je tedy důležité, aby alkoholové dezinfekční přípravky byly spolehlivé a s širokým spektrem účinnosti. Užívání alkoholových dezinfekčních prostředků doporučuje i Světová zdravotnická organizace, která je zařadila do seznamu základních farmaceutických přípravků. Vzhledem k tomu, že se významně zvyšuje množství používané alkoholové dezinfekce, mohlo by dojít u mikroorganismů k vylepšení jejich obranných mechanismů, což by mohlo zapříčinit zvýšení jejich odolnosti k těmto přípravkům. Je tedy důležité i nadále pokračovat ve výzkumu v oblasti účinnosti dezinfekčních prostředků vůči patogenům.

11. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Charakteristika fenotypů rezistence ke glykopeptidům u rodu <i>Enterococcus</i>	25
Tabulka 2 Testování neutralizátoru.....	50
Tabulka 3 Testované dezinfekční prostředky – výrobce, účinné látky a složení.....	52
Tabulka 4 Testované izoláty enterokoků.....	53
Tabulka 5 Stanovení MIC k vankomycinu a teikoplaninu	61
Tabulka 6 Výsledky účinnosti dezinfekčních prostředků na VSE	62
Tabulka 7 Výsledky kontrol „A“, „B“ a „C“ u VSE.....	63
Tabulka 8 Výsledky účinnosti dezinfekčních prostředků na VRE	64
Tabulka 9 Výsledky kontrol „A“, „B“, „C“ u VRE	65

12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 <i>Enterococcus</i> spp. ve tkáni pacienta s pneumonií (tmavě modrofialové oválné koky – viz šipky), Gramovo barvení, zvětšení 1000x.....	13
Obrázek 2 <i>Enterococcus faecium</i> na krevním agaru	14
Obrázek 3 Výsledky testu API® 20 STREP u <i>Enterococcus faecium</i>	16
Obrázek 4 Rozdíly v prekurzorech peptidoglykanu buněčné stěny citlivých a rezistentních enterokoků	27
Obrázek 5 Molekulární mechanismy antibiotické rezistence	30
Obrázek 6 Zastoupení různých typů efluxních pump u gram pozitivních a gram negativních bakterií	35
Obrázek 7 Mechanismy rezistence bakterií vůči dezinfekčním prostředkům (A), tvorba biofilmu (B), a struktura membrán gram pozitivních a gram negativních bakterií (C).....	40
Obrázek 8 Hygiena rukou ve zdravotní péči v pěti situacích	45
Obrázek 9 Technika hygieny rukou s použitím mýdla a vody.....	46
Obrázek 10 Technika hygieny rukou s použitím alkoholového dezinfekčního přípravku	47
Obrázek 11 Strukturní vzorce ethanolu, propan-1-olu a propan-2-olu.....	48
Obrázek 12 Testované dezinfekční prostředky – komerčně vyráběné a čistý propan-2-ol	51
Obrázek 13 Pracovní postup – stanovení baktericidní koncentrace.....	56
Obrázek 14 Pracovní postup – kontrola experimentálních podmínek	56
Obrázek 15 Pracovní postup – kontrola toxicity neutralizátoru.....	57
Obrázek 16 Pracovní postup – validace metody.....	58

13. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1	Procentuální zastoupení izolátů s rezistentním fenotypem v letech 2015–2019.....	21
Graf 2	Záchyt VRE izolátů v Evropě v roce 2019.....	24

14. POUŽITÁ LITERATURA

Bender, J.K., Cattoir, V., Hegstad, K., et al. 2018 Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. *Drug Resistance Updates*. 40, 25–39. DOI: 10.1016/j.drug.2018.10.002.

Boyce, J.M. 2018 Alcohols as Surface Disinfectants in Healthcare Settings. *Infection Control Hospital Epidemiology*. 39(3), 323–328. DOI: 10.1017/ice.2017.301.

Bradley, C.R., Fraise, A.P. 1996 Heat and chemical resistance of enterococci. *Journal of Hospital Infection*. 34(3), 191–196. DOI: 10.1016/s0195-6701(96)90065-1.

Braïek, B.O., Smaoui, S. 2019 Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *BioMed Research International*. vol. 2019:5938210, 1–13. DOI: 10.1155/2019/5938210.

Braoudaki, M., Hilton, A.C. 2004 Adaptive Resistance to Biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and Cross-Resistance to Antimicrobial Agents. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(1), 73–78. DOI: 10.1128/jcm.42.1.73-78.2004.

Byappanahalli, M.N., Nevers, M.B., Korajkic, A., et al. 2012 Enterococci in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76(4), 685–706. DOI: 10.1128/MMBR.00023-12.

Cox, G., Wright, G.D. 2013 Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*. 303(6–7), 287–292. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.02.009.

Davies, J., Davies, D. 2010 Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74(3), 417–433. DOI: 10.1128/MMBR.00016-10.

Devriese, L.A., Pot, B., Collins, M.D. 1993 Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *The Journal of Applied Bacteriology*. 75(5), 399–408. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb02794.x.

Domig, K.J., Mayer, H.K., Kneifel, W. 2003a Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 1. Media for isolation and enumeration. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 147–164. DOI: 10.1016/s0168-1605(03)00177-6.

Domig, K.J., Mayer, H.K., Kneifel, W. 2003b Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. *International Journal of Food Microbiology*. 88(2-3), 165–188. DOI: 10.1016/s0168-1605(03)00178-8.

Dunny, G.M. 1990 Genetic functions and cell-cell interactions in the pheromone-inducible plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology*. 4(5), 689–696. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1990.tb00639.x.

ECDC, EARS-Net. 2020 Surveillance Atlas of Infectious Diseases. *European Centre for Disease Prevention and Control*. [online]. Dostupné na: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4>.

ECDC. 2020 Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019. *European Centre for Disease Prevention and Control*. [online]. Dostupné na: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2019.pdf>.

Facklam, R.R. 2001 Newly described, difficult-to-identify, catalase-negative, gram-positive cocci. *Clinical Microbiology Newsletter*. 23(1), 1–7. DOI: 10.1016/s0196-4399(01)80010-6

Faron, M.L., Ledebøer, N.A., Buchan, B.W. 2016 Resistance Mechanisms, Epidemiology, and Approaches to Screening for Vancomycin-Resistant *Enterococcus* in the Health Care Setting. *Journal of Clinical Microbiology*. 54(10), 2436–2447. DOI: 10.1128/JCM.00211-16.

Fernando, S.A., Gray, T.J., Gottlieb, T. 2017 Healthcare-acquired infections: prevention strategies. *Internal Medicine Journal*. 47(12), 1341–1351. DOI: 10.1111/imj.13642.

Fisher, K., Phillips, C. 2009 The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology (Reading)*. 155(Pt 6), 1749–1757. DOI: 10.1099/mic.0.026385-0.

Gebel, J., Gemein, S., Kampf, G., et al. 2019 Isopropanol at 60% and at 70% are effective against “isopropanol-tolerant” *Enterococcus faecium*. *Journal of Hospital Infection*. DOI: 10.1016/j.jhin.2019.01.024.

Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., et al. 2014 *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [e-book]. Boston: Eye and Ear Infirmary. PMID: 24649510.

Gold, H.S. 2001 Vancomycin-resistant enterococci: mechanisms and clinical observations. *Clinical Infectious Diseases*. 33(2), 210–219. DOI: 10.1086/321815.

Gordin, F.M., Schultz, M.E., Huber, R.A., et al. 2005 Reduction in Nosocomial Transmission of Drug-Resistant Bacteria After Introduction of an Alcohol-Based Handrub. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 26(07), 650–653. DOI: 10.1086/502596.

Hall, C.W., Mah, T.F. 2017 Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 41(3), 276–301. DOI: 10.1093/femsre/fux010.

Hedlová, D. 2010 Jak správně provádět hygienu rukou? *Interní medicína pro praxi*. 12(6), 334–335, ISSN 1803-5256.

Hijazi, N., Elmanama, A.A., Al-Hindi, A. 2009 Vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and non-hospitalized individuals in Gaza City. *Journal of Public Health*. 17(4), 243–249. DOI: 10.1007/s10389-008-0242-5.

Chojecka, A., Tarka, P., Kierzkowska, A., et al. 2017 Neutralization efficiency of alcohol based products used for rapid hand disinfection. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*. 68(4), 389–394. PMID: 29278907.

Ingram, L.O., 1990 Ethanol tolerance in bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*. 9(4), 305–319. DOI: 10.3109/07388558909036741.

Jett, B.D., Huycke, M.M., Gilmore, M.S. 1994 Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 7(4), 462–478. DOI: 10.1128/cmr.7.4.462.

Kampf, G., Höfer, M., Wendt, C. 1999 Efficacy of hand disinfectants against vancomycin-resistant enterococci in vitro. *Journal of Hospital Infection*. 42(2), 143–150. DOI: 10.1053/jhin.1998.0559.

Katz, J.D. 2004 Hand washing and hand disinfection: more than your mother taught you. *Anesthesiology Clinics of North America*. 22(3), 457–471, DOI: 10.1016/j.atc.2004.04.002.

Khan, H. A., Baig, F. K., Mehboob, R. 2017 Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 7(5), 478–482. DOI: 10.1016/j.apjtb.2017.01.019.

Kühn, I., Iversen, A., Burman, L.G., et al. 2003 Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment – a European study. *International Journal of Food Microbiology*. 88(2-3), 133–145. DOI: 10.1016/s0168-1605(03)00176-4.

Mah, T.F. 2012 Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiology*. 7(9), 1061–1072. DOI: 10.2217/fmb.12.76.

Maertens, H., Demeyere, K., De Reu, K., et al. 2020 Effect of subinhibitory exposure to quaternary ammonium compounds on the ciprofloxacin susceptibility of *Escherichia coli* strains in animal husbandry. *BMC Microbiology*. 20(1). DOI: 10.1186/s12866-020-01818-3.

Malathum, K., Murray, B.E. 1999 Vancomycin-resistant enterococci: recent advances in genetics, epidemiology and therapeutic options. *Drug Resistance Updates*. 2(4), 224–243. DOI: 10.1054/drup.1999.0098.

Martinez, J.L. 2014 General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today. Technologies*. 11, 33–39. DOI: 10.1016/j.ddtec.2014.02.001.

McDonnell, G., Russell, A.D. 1999 Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 14(1):227, 147–179. PMID: 9880479.

- Morente, O.E., Fernández-Fuentes, M.A., Grande Burgos, M.J., et al. 2013** Biocide tolerance in bacteria. *International Journal Food Microbiology*. 162(1), 13–25. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.028.
- Müller, T., Ulrich, A., Ott, E.M., et al. 2001** Identification of plant-associated enterococci. *Journal of Applied Microbiology*. 91(2), 268–278. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01373.x.
- Munita, J.M., Arias, C.A. 2016** Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*. 4(2). DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- Murray, B.E. 1990** The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Review*. 3(1), 46–65. DOI: 10.1128/cmr.3.1.46.
- Murray, B.E. 1997** Vancomycin-resistant enterococci. *The American Journal of Medicine*. 102(3), 284–293. DOI: 10.1016/s0002-9343(99)80270-8.
- Murray, P.R. 2010** Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*. 16(11), 1626–1630. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03364.x.
- Nasr, A.M., Mostafa, M.S., Arnaout, H.H., et al. 2018** The effect of exposure to sub-inhibitory concentrations of hypochlorite and quaternary ammonium compounds on antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. *American Journal of Infection Control*. 46(7), e57–e63. DOI: 10.1016/j.ajic.2018.04.201.
- O’Driscoll, T., Crank, C.W. 2015** Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infection and Drug Resistance*. 8, 217–230. DOI: 10.2147/IDR.S54125.
- Pidot, S.J., Gao, W., Buultjens, A.H., et al. 2018** Increasing tolerance of hospital *Enterococcus faecium* to handwash alcohols. *Science Translational Medicine*. 10(452), eaar6115. DOI: 10.1126/scitranslmed.aar6115.
- Pittet, D., Allegranzi, B., Sax, H., et al. 2006** Evidence-based model for hand transmission during patient care and the role of improved practices. *Lancet Infectious Diseases*. 6(10), 641–652. DOI: 10.1016/S1473-3099(06)70600-4.

Pittet, D., Peters, A., Tartari, E. 2018 *Enterococcus faecium* tolerance to isopropanol: from good science to misinformation. *The Lancet Infectious Diseases*. DOI: 10.1016/s1473-3099(18)30542-5.

Suchomel, M., Lenhardt, A., Kampf, G., et al. 2019 *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* show different sensitivities to typical biocidal agents used for disinfection. *Journal of Hospital Infection*. DOI: 10.1016/j.jhin.2019.08.014.

Svoboda, K., Bolek, S. 1975 *Dezinfekce a sterilizace v prevenci nozokomiálních nákaz*. Praha: Avicenum – zdravotnické nakladatelství.

Torres, C., Alonso, C.A., Ruiz-Ripa, L., et al. 2018 Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiology Spectrum*. 6(4). DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0032-2018.

Tong, C., Hu, H., Chen, G., et al. 2021 Disinfectant resistance in bacteria: Mechanisms, spread, and resolution strategies. *Environmental Research*. 195:110897. DOI: 10.1016/j.envres.2021.110897.

Votava, M. 2003 *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. ISBN 80-902896-6-5.

Wade, J.J., Desai, N., Casewell, M.W. 1991 Hygienic hand disinfection for the removal of epidemic vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and gentamicin-resistant *Enterobacter cloacae*. *Journal of Hospital Infection*. 18(3), 211–218. DOI: 10.1016/0195-6701(91)90145-x.

WHO. 2009 WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care: a Summary [online]. WHO. Dostupné na: https://www.who.int/gpsc/5may/tools/who_guidelines-handhygiene_summary.pdf.

Willems, R.J., Bonten, M.J. 2007 Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Current Opinion in Infectious Disease*. 20(4), 384–390. DOI: 10.1097/QCO.0b013e32818be63d.

Xia, J., Gao, J., Tang, W. 2016 Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Bioscience Trends*. 10(1), 14–21. DOI: 10.5582/bst.2016.01020.

Zhang, Y., Gu, A.Z., He, M., et al. 2016 Subinhibitory Concentrations of Disinfectants Promote the Horizontal Transfer of Multidrug Resistance Genes within and across Genera. *Environmental Science & Technology*. 51(1), 570–580. DOI: 10.1021/acs.est.6b03132.

Zhou, X., Willems, R.J.L., Friedrich, A.W., et al. 2020 *Enterococcus faecium*: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 9(1), 130. DOI: 10.1186/s13756-020-00770-1.