

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

**Výskyt multirezistentních kmenů *Klebsiella spp.* ve
FN Hradec Králové v letech 2008-2010**

(Diplomová práce magisterského studijního programu Zdravotnická
bioanalýtika, oboru Odborný pracovník v laboratorních metodách)

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Pavla Paterová

Hradec Králové 2011

Bc. Kateřina Schrammová

Prohlášení

„Prohlašuji, že jsem diplomovou práci Výskyt multirezistentních kmenů *Klebsiella spp.* ve FN Hradec Králové v letech 2008-2010 vypracovala samostatně pod vedením MUDr. Pavly Paterové. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu“

V Hradci Králové dne 20. dubna 2011

Podpis autora:

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Bc. Kateřina Schrammová

Školitel: MUDr. Pavla Paterová

Název diplomové práce: Výskyt multirezistentních kmenů *Klebsiella spp.* ve FN Hradec Králové v letech 2008-2010

Klebsiella pneumoniae produkující širokospektré beta-laktamázy (ESBL) je celosvětově rozšířeným patogenem způsobující časté nozokomiální infekce, které jsou spojeny s vyšší mortalitou a omezením léčebných možností. Pro prevenci nozokomiálního přenosu je nezbytné stanovení a dodržování postupů správné ošetrovatelské praxe zaměřených na multirezistentní kmeny.

Praktická část diplomové práce je zaměřena na výskyt *K. pneumoniae* produkující ESBL ve Fakultní nemocnici Hradec Králové od ledna 2009 do prosince 2010. Do souboru byly zařazeny všechny pozitivní kultivace materiálů od pacientů FN HK. Výskyt *K. pneumoniae* byl hodnocen podle materiálu, záchytu na jednotlivých klinikách, v intenzivní a standardní péči, v chirurgických oborech, podle věku a v čase.

V roce 2009 bylo izolováno celkem 1545 kmenů *K. pneumoniae* produkující ESBL, v roce 2010 1716 kmenů. Nejčastěji pozitivním materiálem je moč (34-35 %) a vzorky z dýchacích cest (43-52 %). ESBL *K. pneumoniae* tvoří 33 % v roce 2009 a 40 % v roce 2010 ze všech izolovaných *K. pneumoniae* z hemokultur. Nejvyšší prevalence je pozorována na jednotkách intenzivní péče, na odděleních s dlouhodobou hospitalizací a staršími pacienty.

Je potvrzen vzrůstající trend výskytu ESBL *K. pneumoniae* u pacientů v nemocniční péči. Infekce tímto patogenem nadále zůstávají problémem zvláště u starších pacientů. Prevence v jejich šíření je významnou součástí správné lékařské a ošetrovatelské péče.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biological and medical Sciences

Candidate: Bc. Kateřina Schrammová

Supervisor: MUDr. Pavla Paterová

Title of diploma thesis: The incidence of multidrug resistant strains of *Klebsiella spp.* at UH in Hradec Kralove in the years 2008-2010

Klebsiella pneumoniae producing a broad spectrum beta - lactamases (ESBLs) are of global common pathogen causing nosocomial infections that are associated with higher mortality and limiting treatment options. To prevent nosocomial transmission is necessary to determine and compliance with procedures of the correct nursing practice focused on multidrug-resistant strains.

The practical part is focused on the occurrence of ESBL-producing *K. pneumoniae* in a University Hospital Hradec Králové from January 2009 to December 2010. The file contains all the positive culture of material from patients of HK Hospital. The incidence of *K. pneumoniae* is evaluated by material, capture the individual clinics, in intensive and standard care, in surgical specialties, age and time.

In 2009 is isolated a total of 1545 strains of ESBL -producing *K. pneumoniae*, 1716 strains in 2010. The most positive material is urine (34-35 %) and samples from the respiratory tract (43-52 %). ESBL *K. pneumoniae* account for 33 % in 2009 and 40 % in 2010 from all of *K. pneumoniae* isolated from blood cultures. The highest prevalence is observed in intensive care units, in wards with long-term hospitalization and with the elderly.

Is confirmed the growing trend of ESBL *K. pneumoniae* in patients in hospital care. Infection by this pathogen still remains a problem especially in elderly patients. Prevention of spread is an important part of good medical and nursing care.

OBSAH

I. ÚVOD A ZADÁNÍ PRÁCE	6
II. OBECNÁ ČÁST	6
TAXONOMIE	6
DIAGNOSTIKA.....	6
HISTORIE.....	7
PŘIROZENÝ VÝSKYT.....	7
PATOGENITA.....	7
TERAPIE INFEKČÍ	8
REZISTENCE NA ANTIBIOTIKA	8
III. ESBL	10
BETA-LAKTAMÁZY - HISTORIE	10
STRUKTURA A MECHANISMY PŮSOBENÍ BETA-LAKTAMOVÝCH ANTIBIOTIK	11
MECHANISMUS PŮSOBENÍ BETA-LAKTAMÁZ	12
PŘENOS GENŮ PRO BETA-LAKTAMÁZY	12
KLASIFIKACE BETA-LAKTAMÁZ.....	13
TYPY ESBL	15
IV. LABORATORNÍ DETEKCE BETA-LAKTAMÁZ	20
SCREENINGOVÉ TESTY	20
FENOTYPOVÉ KONFIRMAČNÍ TESTY	23
DALŠÍ TESTY.....	23
GENOTYPOVÉ METODY DETEKCE ESBL - MOLEKULÁRNĚ-DETEKČNÍ METODY	26
V. EPIDEMIOLOGIE <i>K. PNEUMONIAE</i> ESBL.....	29
VÝSKYT V EVROPĚ	29
SITUACE VE SVĚTĚ	29
PROGRAM ANTIMIKROBIÁLNÍ SURVEILLANCE V EVROPĚ	30
NOZOKOMIÁLNÍ INFEKCE	31
KOMUNITNÍ INFEKCE	32
VI. LÉČEBNÉ MOŽNOSTI <i>K. PNEUMONIAE</i> ESBL	33
KARBAPENEMY	33
CEFALOSPORINY	33
CEFAMYCINY	33
KOMBINACE: BETA-LAKTAMOVÉ ANTIBIOTIKUM S INHIBITOREM BETA-LAKTAMÁZY.....	34
CHINOLONY.....	34
AMINOGLYKOSIDY	34
TIGECYKLIN	35
VII. PREVENCE VZNIKU A ŠÍŘENÍ ESBL	35
VIII. PRAKTICKÁ ČÁST	37
1. MATERIÁL A METODIKA.....	37
Výběr dat	37
2. VÝSLEDKY.....	40
2.2 Výskyt <i>K. pneumoniae</i> ESBL na jednotlivých klinikách	46
2.3 Záchyt ESBL <i>K. pneumoniae</i> v chirurgických a nechirurgických oborech.....	51
2.4 Záchyt ESBL <i>K. pneumoniae</i> v intenzivní a standardní péči	51
2.5 Záchyt ESBL <i>K. pneumoniae</i> podle věku pacientů	54
2.6 Záchyt ESBL <i>K. pneumoniae</i> v časové ose	56
IX. DISKUZE	60
X. ZÁVĚR	63
XI. SEZNAM TABULEK, GRAFIKY, ZKRATEK A LITERATURY	64

I. ÚVOD A ZADÁNÍ PRÁCE

Klebsiella pneumoniae je celosvětově rozšířeným patogenem způsobující časté komunitní i nozokomiální infekce. V posledních letech byl zaznamenán rychlý vývoj rezistence k antibiotikům u většiny bakteriálních patogenů, který se nevyhnul ani kmenům *K. pneumoniae*. Infekce multirezistentními bakteriemi jsou obtížně řešitelným léčebným a preventivním problémem a jsou spojeny s vyšší mortalitou a náklady na terapii.

Cílem mé práce je stanovit zastoupení ESBL *K. pneumoniae* v materiálech pacientů FN HK a určit základní charakteristiky jejího výskytu.

II. Obecná část

a. Taxonomie

Rod *Klebsiella* je řazena do čeledi Enterobacteriaceae, jež se jeví barvením dle Grama jako gramnegativní tyčinky. Bakterie této čeledi, která je značně rozsáhlá a kromě rodu *Klebsiella* spp. zahrnuje ještě dalších 13 rodů, jsou velmi často izolovány z klinického materiálu. Enterobakterie jsou fakultativně anaerobní mikroby. Dobře snášejí změny teplot a do jisté míry i vyschnutí. Nejpřirozenějším životním prostředím většiny enterobakterií je střevo člověka a jiných obratlovců (enteron – řecky střevo). Některé (např. *Enterobacter* spp.) jsou na střevo výrazně vázány, jiné (např. *Klebsiella* spp.) nacházíme často i mimo střevo a další jsou (*Serratia* spp.) již přizpůsobeny životu ve vnějším prostředí jako přirozená součást vody a půdy. Lidských-primárně patogenních rodů této čeledi existuje jen málo, a mohou působit infekce na různých částech těla.

Nomenklatura rodu *Klebsiella* odráží pestrou taxonomickou historii. Nejprve byly pojmenovány 3 druhy podle onemocnění, které způsobovaly: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae*, *K. rhinoscleromatis*. Později ji Orskov rozšířil o další 3 druhy: *K. terrigena*, *K. ornithinolytica* a *K. planticola* (Podschun, 1998).

b. Diagnostika

- Mikroskopie

Mikroskopicky jsou to Gram-negativní tyčky, které se vyskytují jednotlivě, ve dvojicích, či hromadně v podobě řetězků. Mikroskopický obraz není specifický a morfologie je lehce zaměnitelná s ostatními rody a druhy enterobakterií.

- Kultivace

Kultivačně nenáročná bakterie tvoří na Endově a McConkey agaru typické velké



laktózapozitivní kolonie s mukózní konzistencí. Růstové optimum mají okolo 37°C. Pro svou růstovou nenáročnost mohou na krevním agaru přerůst ostatní bakterie a zakrývat jejich přítomnost.

Obr.1 Kultivace *K. pneumoniae* (Krevní agar), (<http://atlas.medmicro.info/>)

- Identifikace

K identifikaci je možno užít biochemických reakcí (krátké pestré řady, mikrometody komerčních setů). Pro *K. pneumoniae* je charakteristické štěpení glukózy, močoviny a nepřítomnost pohybu. Pro přímou diagnostiku *K. pneumoniae* z materiálu nebo identifikaci kmene lze užít i molekulárně diagnostické metody (PCR, sekvenaci).

c. Historie

K. pneumoniae byla objevena před více jak 100 lety. Mikroba poprvé izoloval roku 1882 berlínský patolog Carl Frielander ze zesnulých pacientů se zápalem plic. Pojmenování „*Klebsiella*“ však získala na počest známého mikrobiologa Edwina Klebse.

d. Přirozený výskyt

U člověka je *K. pneumoniae* přítomná jako saprofyt v nasopharyngu a trávicím traktu. Nosičství u vzorků stolice se pohybuje v rozmezí 5-38 %, zatímco v nasopharyngu jsou zastoupené v menším množství: 1-6 %. Růstové podmínky na lidské kůži pro ni nejsou ideální. Tyto poměry se ale mohou dramaticky změnit v nemocničním prostředí, kde se kolonizace zvyšuje v závislosti na délce hospitalizace.

e. Patogenita

Nejprve byla *K. pneumoniae* uznávána jako plicní patogen. Další studie však potvrdily její významný podíl i na vzniku jaterních abscesů, byla také určena jako původce meningitidy u adolescentů (Paterson, 2002). Všechny tyto studie sledovaly infekce získané v komunitě. U ambulantních pacientů *K. pneumoniae* způsobuje pneumonie především u imunokompromitovaných jedinců (alkoholici) (Carpenter, 1990).

K. pneumoniae patří mezi nejčastější nozokomiální („nemocničně-získané“, získané v souvislosti s pobytem ve zdravotnickém zařízení) patogeny. U těchto pacientů způsobuje časté infekce močových cest, nozokomiální pneumonie (s nebo bez souvislosti s umělou plicní ventilací). Poměrně často se vyskytuje i v případech rychle nastupující sepse. Ve smíšených kulturách se účastní i intraabdominálních infekcí (Paterson, 2002). Jako oportunní patogen způsobuje také těžké infekce u jedinců s oslabenou imunitou, jako jsou pacienti v neutropenii a na jednotkách intenzivní péče. Díky rychlému šíření může vyvolávat i nozokomiální epidemie (např. na novorozeneckých jednotkách) (Hart, 1993).

f. Terapie infekcí

Terénní kmeny dobře reagují na léčbu cefalosporiny (např. cefuroxim), chinolony (např. ciprofloxacin, norfloxacin), kotrimoxazolem nebo tetracykliny.

Pro léčbu nemocničních infekcí jsou využívány cefalosporiny vyšších generací (III. generace: cefotaxim, ceftriaxon, IV. generace: cefepim, cefpirom), aminoglykosidy (gentamicin, amikacin), karbapenemy (imipenem, meropenem, ertapenem) nebo kolistin. Léčba závažných stavů je obtížná, zvláště nozokomiální kmeny vykazují různé typy rezistence na antibiotika.

g. Rezistence na antibiotika

Bakteriální rezistence je schopnost bakteriální populace přežít inhibiční koncentrace antibiotik (Jedličková, 2004). Některé bakteriální druhy jsou přirozeně odolné vůči některým antibiotikům (přirozená rezistence), jiné typy rezistence vznikají až sekundárně po styku s antibiotikem (získaná rezistence).

Již v roce 1928 byl Alexandrem Flemिंगem popsán antibakteriální účinek rodu *Penicillium* na kmen *Staphylococcus aureus*, čímž zahájil jednu z nejdůležitějších etap vývoje medicíny, léčbu antibiotiky (Kolář, 2007). První rezistence k penicilinu se objevila brzy po jeho zavedení do lékařské praxe v roce 1942. Za rezistenci zodpovídaly bakteriální enzymy (penicilinázy). Sám Fleming v roce 1945 na tuto rezistenci upozornil a zároveň nevyločil možnost přenosu penicilin-rezistentních kmenů mezi lidmi (Saier, 2000). Během několika dalších desetiletí vznikly další druhy a třídy antibiotik a dočasně zastínily problém bakteriální rezistence. I přes vývoj novějších antibiotik, pokračování jejich selekčního tlaku a adaptace bakterií na vzniklé podmínky nakonec vedlo k problému, který již nemohl být dále ignorován. V dnešní době již existuje rezistence vůči všem dostupným třídám antibiotik (Cohen, 1992).

- Přirozená rezistence *K. pneumoniae*

Klebsiella vlastní gen pro produkci přirozené beta-laktamázy, které hydrolyticky štěpí beta-laktamový kruh a tím zabrání beta-laktamu navázat se na její buněčnou stěnu. Katalýza je

umožněna serinovým zbytkem v aktivním místě beta-laktamázy. Jsou chromozomálně-kódované a vykazují přirozenou odolnost vůči penicilinům a v menší míře k širokému spektru cefalosporinů I. a II. generace. Zdá se, že se jedná o předchůdce plasmidově-kódované SHV-1. (Haeggman, 1997) Dále vyazuje jako většina enterobakterií přirozenou rezistenci ke glykopeptidům, makrolidům, linkosamidům a linezolidu.

- **Získaná rezistence *K. pneumoniae***

Genetickým podkladem rezistence je mutace nebo přenesení genu rezistence pomocí plazmidu nebo transpozonu. Odolnost bakterie k antibiotikům je způsobena několika mechanismy:

- *Zábrana průniku antibiotika do buňky - ztráta pórů vnější membrány*

Poriny jsou bílkoviny přítomné ve vnější membráně Gram-negativních bakterií nebo v buněčné stěně. *K. pneumoniae* produkuje 2 hlavní poriny: OmpK 35 a OmpK 36, a jeden tzv. „klidový“ OmpK 37, který není za normálních podmínek vyjádřen (Domenech-Sanchez, 1999). Póry slouží pro pasivní transport živin a dalších látek do nitra buňky přes vnější membránu bakterie. Ztráta porinů nebo změna jejich terciární struktury zamezí vstupu antibiotik, především penicilinům a cefalosporinům. Většina klinických izolátů *K. pneumoniae* bez ESBL exprimuje oba poriny (OmpK 35, OmpK 36), zatímco producenti ESBL tvoří jen Ompk 36 a v ojedinělých případech mohou chybět oba (Martinez-Martinez, 2002). Absence OmpK 36 způsobuje rezistenci k cefoxitinu a dalším cefalosporinům u ESBL a rezistenci ke karbapenemům u kmenů s plasmidovým AmpC typem beta-laktamáz (Ardanuy et al., 1998).

- *Rychlé vylučování antibiotik z buňky - nadměrná tvorba chromozomálně kódovaných efluxních pump*

Zvýšená exprese genu pro efluxní pumpy vede ke snížené citlivosti *K. pneumoniae* k jednotlivým třídám antibiotik, které jsou vysokým počtem pump vypuzovány. Představují tak důležitou roli ve vzniku multirezistentního fenotypu. Přirozeně mohou být exprimovány např. jako reakce na určité toxické látky, kde mají protekční charakter.

- *Změna struktury cílového místa účinku antibiotika - modifikace topoizomeráz*

Topoizomeráza II (DNA gyráza) a IV jsou pro buňku esenciální z hlediska rozpletení bakteriální dvojšroubovice DNA, bez čehož by nemohla pokračovat v transkripci genetické informace ani dělení. Jako jejich inhibitory působí fluorochinolony, které přednostně blokují DNA gyrázu. Stupeň rezistence k fluorochinolonom je dána počtem mutací těchto enzymů.

První zásah do struktury enzymů je označován jako primární mutace. Sekundární mutace pak zvyšují míru bakteriální rezistence vůči těmto agens (Hooper, 1999).

- *Tvorba inaktivujících enzymů*

Produkce enzymů inaktivujících aminoglykosidová antibiotika (acetyltransferázy, adenyltransferázy, fosfotransferázy). Geny pro tyto enzymy jsou přenášeny i mezi rody bakterií pomocí plazmidů, transpozonů a integronů (genetický element obsahující i několik genů rezistence).

Tvorba betalaktamáz inaktivujících beta-laktamový kruh penicilinů a cefalosporinů je jednou z nejrychleji se vyvíjejících odolností enterobakterií (viz níže).

III. ESBL

a. Beta-laktamázy - historie

První beta-laktamáza byla nalezena u *E. coli* ještě před uvolněním penicilinu do lékařské praxe. U mnoha Gram-negativních bakterií se přirozeně vyskytují beta-laktamázy zakódované na chromozomech. Předpokládá se, že vznikly modifikací penicilin-vazebných proteinů, se kterými vykazují určitou homologii (Bradford, 2001). Tyto přirozené enzymy mohou mít fyziologickou roli ve struktuře a uspořádání peptidoglykanů nebo poskytují zbraň, která ochraňuje bakterii před účinkem beta-laktamů produkovaných bakteriemi a houbami v životním prostředí (Livermore, 1995).

První plazmidem-kódovaná beta-laktamáza byla nalezena u Gram-negativní *Escherichia coli* (*E.coli*) v roce 1965 a pojmenována **TEM-1**, neboť byla izolována z krevní kultury pacientky se jménem **Temoniera** v Řecku (Bradford, 2001). Další plazmidovou beta-laktamázu nalezenou u *K. pneumoniae* a *E. coli* byla SHV-1 (pojmenována po **sulfhydrylové** variaci aktivního místa) (Livermore, 2005). Během několika dalších desetiletí vzniklo velké množství nových antibiotik, které byly schopné odolávat hydrolytické aktivitě beta-laktamáz. Nicméně používání těchto nových tříd k léčbě pacientů, jejich selekční tlak, nadužívání a zneužívání vedlo po čase k bakteriální rezistenci a selekci nových variant beta-laktamáz (Bradford, 2001).

Zavedení a následné široké používání oxyimino-cefalosporinů na začátku 80. let bylo rozhodující pro léčbu těžkých infekcí způsobených Gram-negativními bakteriemi, které produkovaly beta-laktamázy rezistentní k většině tehdy dostupných beta-laktamových antibiotik. Navíc jejich hlavní výhodou bylo zmenšení nefrotoxického efektu ve srovnání

s aminoglykosidy a polymyxiny (Paterson, 2005). První zpráva na sebe nenechala dlouho čekat a již v roce 1983 byla hlášena plazmidem-kódovaná beta-laktamáza, která byla schopna hydrolyzovat široké spektrum cefalosporinů (Asma, 2006). Gen toho enzymu vykazoval mutaci jednoho nukleotidu ve srovnání s genem kodujícím SHV-1.

Brzy nato byly objeveny další nové beta-laktamázy udělující rezistenci širokému spektru cefalosporinů, které úzce souvisely s TEM-1 a TEM-2 (Paterson, 2005). Proto bylo důležité sestavit schéma, podle kterého by byly ESBL rozlišovány na základě jejich substrátové specifity, klasifikace dle Bushy-Jacobyho-Medierose (viz tab.1).

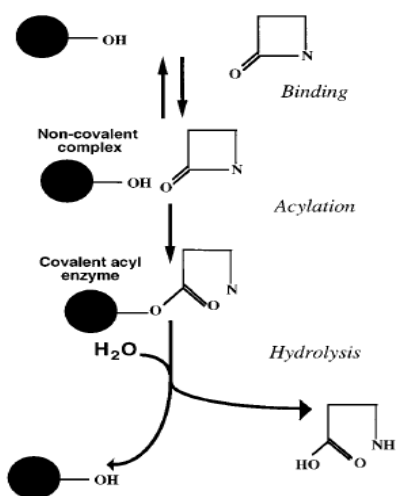
b. Struktura a mechanismy působení beta-laktamových antibiotik

Beta-laktamová antibiotika (zejména peniciliny) jsou nejznámějšími a nejdéle používanými antibiotiky. Jejich charakteristickým strukturním rysem je čtyřčlenný β -laktamový kruh kondenzovaný s heterocyklem, např. 1,3-thiazolidinem (peniciliny), dihydro-1,3-thiazinem (cefalosporiny a cefamyciny) a 1,3-thiazolinem (penemy) (Hampl a spol., 2009).

Baktericidní efekt beta-laktamů je založen na schopnosti inhibovat enzymy podílející se na syntéze buněčné stěny, díky přítomnosti L-cysteinu a L-valinu v jejich struktuře (proto jsou někdy označovány jako antibiotika peptidová). Integrita buněčné stěny je esenciální pro udržení tvaru buňky v hypertonickém a „nepřátelském prostředí“ (Massova, 1998). Osmotická stabilita bakteriální buňky je zajištěna rigidní buněčnou stěnou, která se skládá ze střídajících se jednotek N-acetylmuramidové kyseliny (NAM) a N-acetylglukosaminu (NAG). Tyto glykosidické jednotky jsou spojovány transglykosidázou. Pentapeptid je připojen ke každé NAM jednotce, zkřížené propojení (cross-link) dvou D-alanin-D-alanin NAM pentapeptidáz je katalyzováno PBPs (penicilin-vázající protein), který působí jako transpeptidáza (Goffin, 1998). Tento cross-link přilehlých glykopeptidových vláken uděluje rigiditu buněčné stěně. Beta-laktamový kruh vykazuje sterické podobnosti s D-alanin-D-alaninem NAM pentapeptidázy, takže ji PBPs mylně využije jako stavební kámen buněčné stěny (Zapun, 2008). To vede k acylaci PBP, který již nemůže dál plnit funkci transpeptidázy. Buněčná stěna se stává méně permeabilní a hroutí se.

c. Mechanismus působení beta-laktamáz

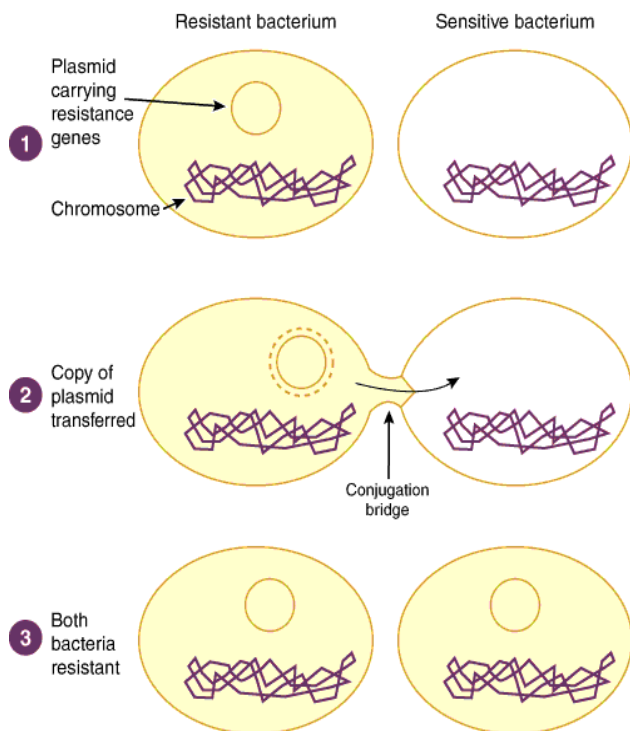
Většina beta-laktamáz využívá reaktivního serinového rezidua v jejich aktivním místě



k narušení beta-laktamového kruhu (třída A, C, D dle Amblera). Mnohem menší množství katalyzuje tuto hydrolýzu účinkem těžkých kovů, především Zn^{II+} , spolu se zbytky histidinu a/nebo cysteinu (třída B).

Obr. 2 Hydrolýza serinovou beta-laktamázou (Livermore, 1995)

d. Přenos genů pro beta-laktamázy



Přenos genů pro beta-laktamázy je umožněn transferem genetického materiálu z rezistentní bakterie na senzitivní pomocí konjugace (přenos genetické informace přímým stykem mezi buňkami). Geny ESBL jsou především kódovány plazmidy (některé i chromozomálně) a mohou být přenášeny vnitrodruhově i mezidruhově.

Obr. 3 Přenos rezistence pomocí konjugace

http://www.mja.com.au/public/issues/177_06_160902/col10836_fm.html

e. Klasifikace beta-laktamáz

V průběhu let bylo vyvinuto několik klasifikačních systémů. První schéma bylo navrženo v roce 1968, obsahovalo penicilinázy a cefalosporinázy, další schéma vzniklo roku 1970 s jeho aktualizací o 3 roky později a odráželo jejich substrátový profil. Až do nedávna byly beta-laktamázy identifikovány podle jejich hydrolytického spektra, citlivosti k inhibitorům a druhem kódování (chromozomy či plazmidy). Dále podle jejich schopnosti hydrolyzovat cefaloridin větší rychlostí než benzylpenicilin (a naopak) a také záleželo na inaktivaci enzymu kloxacillinem, klavulanátem, aztreonamem či p-chloromercuribenzoátem.

Jelikož každý rok vznikaly nové enzymy, bylo nutné navrhnout aktuální klasifikaci. Tak v roce 1989 Bush aktualizoval již existující rozdělení a pokusil se dát do vztahu substrátové a inhibitorové vlastnosti s molekulární strukturou. Klasifikace podle molekulární struktury byla poprvé navržena v roce 1980 Amblerem a obsahovala tehdy třídy A a B (Paterson, 2005). V následujících letech vznikly další dvě třídy C a D. Konečně v roce 1995 došlo k aktualizaci schématu dle Bushe z roku 1989, které i nadále využívalo funkčních charakteristik a molekulární struktury (Bush, Jacoby, Medeiros, 1995). Tak došlo ke spojení dvou hlavních schémat: Molekulárního klasifikačního schématu dle Amblera a Funkčního klasifikačního systému dle Bushe-Jacobyho-Medeirose (viz tab.1).

Dle Amblera jsou rozlišovány 4 třídy: A, B, C, D. Do třídy A, C a D se řadí serinové beta-laktamázy, do třídy B metalo-beta-laktamázy.

Bush-Jacoby-Medeiros klasifikace se zaměřuje na funkční podobnosti (substrátový a inhibitorový profil). Rozděluje beta-laktamázy na 4 hlavní skupiny a mnoho podskupin. Toto klasifikační schéma je mnohem více bezprostřední ve vztahu k lékařům nebo mikrobiologům v diagnostické laboratoři, neboť považuje inhibitory beta-laktamáz a substráty beta-laktamů za klinicky velmi významné (Paterson, 2005).

Tab. 1 Klasifikační schéma dle Bushe-Jacobyho-Medeirose, dle Amblera (Drawz, Bonomo, 2010; upraveno)

Ambler class	Bush-Jacoby-Medeiros class	Preffered substrates	Inhibited by clavulanate	Representative enzyme (s)
A (serine penicillinases)	2a	Penicillins	+	PC1 from <i>St. aureus</i>
	2b	<i>Penicillins, narrow-spectrum cephalosporins</i>	+	<i>TEM-1, TEM-2, SHV-1</i>
	2be	Penicillins, narrow-spectrum and extended-spectrum cephalosporins	+	SHV-2 to SHV-6, TEM-3 to TEM-26, CTX-Ms
	2br	Penicillins	-	TEM-30, SHV-72
	2c	Penicillins, carbenicillin	+	PSE-1
	2e	Extended-spectrum cephalosporins	+	FEC-1, CepA
	2f	Penicillins, cephalosporins, carbapenems	±	KPC-2, SME-1, NMC-A
B (metallo-β-lactamases)	3	Most β-lactams, including carbapenems	-	IMP-1, VIM-1, CcrA, and BcII (B1); CphA(B2); L1(B3)
C (cephalosporinases)	1	Cephalosporins	-	AmpC, CMY-2, ACT-1
D (pxacillinases)	2d	Penicillins, cloxacillin	±	OXA-1, OXA-10
Not classified	4			

ESBL (Extended Spectrum BetaLactamase – beta-laktamáza se širokým spektrem) producentům je přiřazována třída 2be podle B-J-M a dle Amblera třída A. Běžně užívaná pracovní (rutinní) definice přiřazuje beta-laktamázám ESBL označení, jsou-li schopné udělit bakteriální rezistenci k penicilinům, I., II.(př. cefuroxim) a III. generaci cefalosporinů (3a oxyimino skupiny: cefotaxim, ceftriaxon; 3b: ceftazidim) a aztreonamu, a jsou-li inhibovány inhibitorem beta-laktamáz jako je kyselina klavulanová (Paterson, 2005). ESBL jsou deriváty jejich předchůdců, TEM-1, TEM-2, SHV-1 ze skupiny 2b dle B-J-M a liší se od nich jednou nebo více aminokyselinovými záměnami. TEM-1 je nejběžnější plazmidem-kódovaná beta-laktamáza, ampicilin-rezistentních středních Gram-negativních bakterií (*E. coli*). Zatímco SHV-1 je produkována drtivou většinou *K. pneumoniae* (Livermore, 1995). TEM-2 je méně běžný druh v této skupině, má podobné biochemické vlastnosti jako TEM-1. Širokospektré beta-laktamázy vycházející z AmpC typu beta-laktamáz využívají jako substrát III. generaci cefalosporinů, ale nejsou na rozdíl od „klasických“ ESBL inhibovány kyselinou

klavulanovou. Také u OXA typů beta-laktamáz se širokým spektrem účinku byla pozorována hydrolytická aktivita vůči široko-spektrálním cefalosporinům, mnoho autorů je z tohoto důvodů řadí k ESBL (Medeiros, 1997).

f. Typy ESBL

TEM-beta-laktamázy

Jak bylo uvedeno výše, TEM-typy ESBL jsou odvozeny z původních TEM-1 a TEM-2. TEM-1 hydrolyzuje ampicilin ve vyšší míře než karbenicilin, oxacilin nebo cefalotin, a zanedbatelně i široké spektrum cefalosporinů. Je inhibována kyselinou klavulanovou.

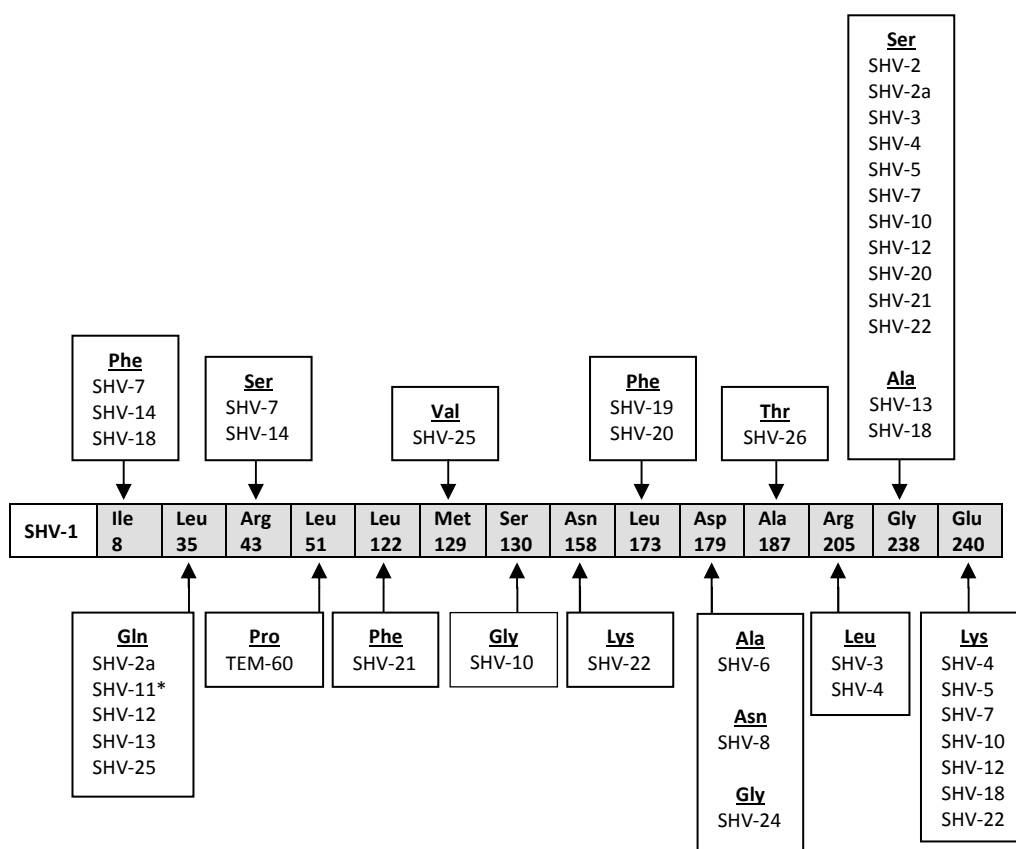
TEM-2 má stejné účinky, ale má na rozdíl od TEM-1 větší aktivitu přirozeného promotoru a odlišný izoelektrický bod (5,6 ve srovnání s 5,4). TEM-13 má podobné hydrolytické účinky jako TEM-1 a TEM-2 (Jacoby and Medeiros, 1991).

U izolátů *K. pneumoniae* nalezených ve Francii roku 1984 byla odhalena nová plasmidem-kódovaná beta-laktamáza, která byla původně pojmenována CTX-1, neboť měla vysokou aktivitu vůči cefotaximu. Tento enzym, nově označen TEM-3, se od TEM-2 lišil dvěma aminokyselinovými substitucemi (Asma, 2006). O dva roky dříve (1982) byla v Anglii izolována *Klebsiella oxytoca* s geneticky zakódovanou rezistencí k ceftazidimu, která byla přenosná plazmidy (Du Bois et al., 1995). Ceftazidim byl určen k léčbě infekčních pacientů a vznik těchto TEM-ESBL je dobrým příkladem selekčního tlaku indukovaného širokým spektrem cefalosporinů. Bylo již popsáno více jak 100 TEM typů beta-laktamáz, většina z nich ESBL. Jejich izoelektrické body se pohybují v rozmezí od 5,2 do 6,5. Ačkoli se většina TEM beta-laktamáz nachází u *E. coli* a *K. pneumoniae*, byly nalézány se zvyšující se frekvencí i u ostatních druhů Gram-negativních bakterií.

SHV-beta-laktamázy

SHV-1 beta-laktamázy jsou nacházeny u *K. pneumoniae* nejčastěji a zodpovídají až za 20 % plasmidem-zprostředkované rezistence u tohoto druhu (Tzouveleakis, 1999). Na rozdíl od TEM typu beta-laktamáz, existuje poměrně málo derivátů SHV-1, jen 33 enzymů vlastní po aminokyselinové substituci ESBL či IRS (inhibitor-rezistentní SHV) fenotyp. Na druhou stranu jsou mnohem častěji nacházeny v klinických izolátech než ostatní typy ESBL. SHV-1 u *K. pneumoniae* uděluje rezistenci k ampicilinu, amoxicilinu, karbenicilinu a tikarcilinu (Babini a Livermore, 2000). V mnoha kmenech non-ESBL *K. pneumoniae* jsou buď bla_{SHV-1} nebo jiné související geny, zabudovány do bakteriálního chromozomu (Livermore, 1995). Gen kodující SHV-1 by také mohl existovat jako část přenosného prvku (plazmidu). Mutace,

kteře byly pozorovány v oblasti genu bla_{SHV-1}, vedly ke vzniku variant SHV vyskytujících se v několika pozicích v rámci strukturálního genu.



Obr. 4 Vznik SHV-ESBL variant z SHV-1 (Bradford, 2001; upraveno); *SHV-11 není ESBL producent

V roce 1983 byla v izolátu *Klebsielly ozaenae* v Německu objevena beta-laktamáza, která dostatečně hydrolyzovala cefotaxim a v menší míře i ceftazidim (Paterson, 2005). Sekvenování odhalilo změny v genu SHV-1, které vedly k substituci serinu za glycin v pozici 238. Vznikla tak první SHV beta-laktamáza s produkcí ESBL, určená jako SHV-2. Ser238 je důležitý pro efektivní hydrolyzu ceftazidimu, Lys pro cefotaxim (Huletsky et al., 1993). V průběhu 15 let od objevení tohoto enzymu byly kmeny exprimující SHV-2 nalezeny na každém obydleném kontinentu (Paterson et al., 2003).

SHV beta-laktamázy s aminokyselinovými substitucemi mohou být zodpovědné za vzrůstající rezistenci k cefalosporinům úzkého i širokého spektra, monobaktamům, stejně jako k jejich inhibitorům. Varianty související s typem SHV-5 mají zaměněn lysin za glutamát v pozici 240. Aminokyselinová substituce v reziduích Asp179, Gly238 a Glu240 byla

nalezena u klinických izolátů, které byly rezistentní k III. generaci cefalosporinů. V dnešní době má již většina SHV derivátů ESBL fenotyp. Dokonce bylo hlášeno, že varianta SHV-10 disponuje inhibitor-rezistentním fenotypem. SHV-10 je odvozena od SHV-5 jednou substitucí navíc: glycin za serin v pozici 130 (Prinarakis et al., 1997). Ser140Gly představuje také inhibitor-rezistentní fenotyp a je zajímavé, že potlačuje produkci ESBL u enzymů obsahujících jak Gly238Ser, tak Glu240Lys u SHV-5. Většina SHV-ESLB je nalézána u kmenů *K. pneumoniae*, ačkoli byly nalezeny také u druhu *Citrobacter diversus*, *E. coli* a *Pseudomonas aeruginosa* (Bradford, 2001).

V práci Frenche et al. z roku 1996 studující výskyt infekce v nemocnici byla hlášena aminoglykosid-rezistentní *K. pneumoniae*, která dále vykazovala rezistenci k širokému spektru nejen cefalosporinů, ale i k amoxicilinu s klavulanovou kyselinou a k dalšími dostupným kombinacím beta-laktamu s inhibitorem beta-laktamáz. Tato zkřížená rezistence byla způsobena hyperprodukcí SHV-5-ESBL a byla přenosná z *E.coli* in vivo i in vitro (French et al., 1996). Hyperprodukce SHV-5 by mohla být způsobená zvýšením buď počtů kopií odpovědného plazmidu nebo počtem kopií beta-laktamázového genu na plazmidu. Druhá varianta se zdá více pravděpodobná, neboť plazmid je pro zvýšení kopií příliš velký (160 kB). Také mutace vedoucí k zefektivnění činnosti promotoru v transkripčních a translačních reakcích beta-laktamázového genu může vést ke zvýšené aktivitě SHV-5. Není vyloučeno, že hyperprodukce ESBL-beta-laktamáz u enterobakterií bude běžná. To by znamenalo, že mohou být rezistentní ke všem dostupným antimikrobním látkám a mohla by vytvářet velká nemocniční ohniska neléčitelných infekcí (French et al., 1996).

Tab. 2 Charakteristika SHV-typů beta-laktamáz (Bradford, 2001; upraveno)

pI	Enzymy	Typ enzymu		
		Široké spektrum	ESBL	Inhibitor rezistentní
7.0	OHIO-1, LEN-1 SHV-3, SHV-14	X		
7.5	SHV-24		X	
7.6	SHV-1, SHV-11 SHV-2, SHV-2a, SHV-6, SHV-8 SHV-13, SHV-19, SHV-20, SHV-21, SHV-22	X	X	
7.8	SHV-4, SHV-7 ^b , SHV-18		X	
8.2	SHV-5, SHV-9, SHV-12 SHV-10		X	X

Inhibitor-rezistentní beta-laktamázy

Přestože inhibitor-rezistentní beta-laktamázy nejsou ESBL, často jsou s nimi spojovány, protože jsou také odvozeny od klasických SHV- a TEM-typů enzymů. Beta-laktamázy rezistentní k účinku kyseliny klavulanové byly objeveny na začátku 90-tých let. Bylo nalezeno asi 19 inhibitor-rezistentních TEM (IRT) beta-laktamáz především v klinických izolátech *E. coli*, méně u *K. pneumoniae*. Tyto TEM varianty vykazují klinickou rezistenci ke kombinacím beta-laktamu s inhibitorem beta-laktamáz (amoxicilin-klavulanát, ampicilin-sulbaktam, tikarcilin-klavulanát), ale zůstávají citlivé k inhibici tazobaktamem a také jeho kombinaci s piperacilinem (Bonomo et al., 1997; Chaibi et al., 1999). Místa aminokyselinových záměn na TEM-1,-2 jsou zřetelně odlišena od těch, které vedou k ESBL fenotypu. Laboratorně byly zkonstruovány mutanty, které obsahovaly substituce společné jak IRT, tak ESBL, ale fenotyp vlastnily pouze jeden (Stapleton et al., 1999). Pouze nedávno objevený TEM-50 nabyl díky společné substituci oba dva fenotypy: IRT a ESBL. Byl tedy rezistentní k inhibici klavulanátem, ale také uděloval mírnou rezistenci k širokému spektru cefalosporinů (Sirot et al., 1997).

CTX-M a Toho-beta-laktamázy

CTX-M je nedávno popsána skupina patřící do rodiny ESBL. Název CTX je odvozen od hydrolytické aktivity této beta-laktamázy vůči cefotaximu (Bonnet, 2004). CTX-M dobře hydrolyzují cefalotin, cefotaxim a některé udělují rezistenci k ceftazidimu (Poirel et al., 2002). Spíše než na základě mutací vznikají přenosem plazmidu s danou beta-laktamázou. CTX-M-ESBL byly původně nalezeny v Jižní Americe, Blízkém Východě a Východní Evropě. Mohly by být nejčastěji se vyskytujícími ESBL na celém světě. Dnes už je známo více jak 40 CTX-M variant (Tzouvelekis et al., 2000). Toho-1 a Toho-2 jsou beta-laktamázy strukturně podobné CTX-M-typům a mají i podobné hydrolytické vlastnosti vůči cefotaximu (Ma et al., 1998).

OXA-beta-laktamázy

Rozrůstající se ESBL doplňují OXA-typy, které patří do molekulární třídy D a funkční skupiny 2d. Tyto enzymy udělují rezistenci k ampicilinu a cefalotinu. Mají vysokou hydrolytickou aktivitu vůči oxacilinu a kloxacilinu a jsou špatně inhibovány kyselinou klavulanovou (Livermore et al., 1995). Zatímco většina ESBL se vyskytují především u *K. pneumoniae* a *E. coli*, OXA- typy ESBL jsou nalézány u *Pseudomonas aeruginosa*. Většina OXA-beta-laktamáz nedokáže dostatečně silně hydrolyzovat široké spektrum cefalosporinů, a proto nejsou považovány za ESBL. Nicméně OXA-10 slabě hydrolyzuje cefotaxim, ceftriaxon a aztreonam, a způsobuje u většiny organismů sníženou vnímavost k těmto

antibiotikům. Dalšími OXA-typy ESBL jsou: OXA-11, -14, -16, -17 (odvozeny od OXA-10), -19, -15, -18, -28, -31, -32, -35, -45 (Toleman et al., 2003). Ty udělují čistou rezistenci k cefotaximu a někdy i k ceftazidimu a aztreonamu (Paterson, 2005).

Další ESBL

Nedávno byly objeveny nové varianty beta-laktamázy, které se lišily od těch známých složitými bodovými mutacemi. Jsou charakteristické jejich geografickým rozložením.

PER-typy-ESBL se vyznačují se pouze 25-27% homologií v porovnání s SHV- a TEM-typy-ESBL (Nordmann, Nass, 1994). PER-1 hydrolyzuje peniciliny a cefalosporiny a je inhibována kyselinou klavulanovou. Byla původně nalezena v Turecku, dále se objevila v Itálii, Francii, Belgii a Korei. PER-2 se vyznačuje 86% homologií k PER-1, byla nalezena pouze v Jižní Americe (Asma M Al-Jasser, 2006). VEB-1 se v 38% shodují s PER-1 a PER-2. K ceftazidimu, cefotaximu a aztreonamu jsou vysoce rezistentní, jejich inhibice je zajištěna kyselinou klavulanovou. Poprvé byla VEB-1 nalezena v izolátu *E. coli* ve Vietnamu (Poir et al., 1999). Identické beta-laktamázy byly mimo jiné nalezeny i u *K. pneumoniae*.

PER-typy-ESBL

Vyznačují se pouze 25 až 27% homologií v porovnání s SHV- a TEM-typy-ESBL (Nordmann, Nass, 1994). PER-1 hydrolyzuje peniciliny a cefalosporiny a je inhibována kyselinou klavulanovou. Byla původně nalezena v Turecku, dále se objevila v Itálii, Francii, Belgii a Korei. PER-2 se vyznačuje 86% homologií k PER-1, byla nalezena pouze v Jižní Americe (Asma M Al-Jasser, 2006).

VEB-typy-ESBL

VEB-1 se v 38% shodují s PER-1 a PER-2. K ceftazidimu, cefotaximu a aztreonamu jsou vysoce rezistentní, jejich inhibice je zajištěna kyselinou klavulanovou. Poprvé byla VEB-1 nalezena v izolátu *E. coli* ve Vietnamu (Poir et al., 1999). Identické beta-laktamázy byly mimo jiné nalezeny i u *K. pneumoniae*.

IV. Laboratorní detekce beta-laktamáz

Detekce beta-laktamáz v klinických laboratořích procházela a prochází neustálým vývojem tak, jak jsou objevovány nové typy beta-laktamáz. V současné době je laboratorní detekce nejběžnějších širokospektrých beta-laktamáz standardizována a používána v rutinní diagnostice.

Jednou z prvních metod bylo využití chromogenních metod. Chromogenní metoda s nitrocefinem je rychlá, praktická a vysoce senzitivní (i k většině ESBL). Acidimetrické a jodometrické testy založené na změně barvy v průběhu reakce nejsou tak nákladné jako metoda s nitrocefinem. Žádná z chromogenních metod není schopna určit typ přítomné beta-laktamázy. Pro Gram-negativní bakterie není nitrocefínová metoda příliš doporučována pro nízkou senzitivitu reakce. Gram-negativní bakterie produkují beta-laktamázy do periplazmatického prostoru a vzniká tu riziko falešně negativních výsledků.

a. Screeningové testy

Diskový difuzní test (DDT)

Ceftazidim a cefotaxim jsou základní součástí pro screeningové vyšetření potenciálních ESBL producentů. Kmeny s průměrnou inhibiční zónou ≤ 22 mm pro ceftazidim a ≤ 27 mm pro cefotaxim jsou považovány za potenciální ESBL podle předpisů ustanovených CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Kultury s těmito výsledky by měly být podrobeny fenotypovým konfirmačním diskovým difuzním testům. ESBL producenti jsou vnímaví k cefalosporinům v různé míře a to v závislosti na tom, jaká hraniční koncentrace (break-point) pro ně byla zvolena. Hraniční koncentrace (break-point) antibiotika je průměrná koncentrace dosažitelná v séru pacienta po podání běžné dávky obvyklým způsobem. MIC představuje minimální koncentraci antibiotika, které již inhibuje viditelný růst mikroorganismu (v $\mu\text{g/ml}$). Mezinárodní rozdíly v break-pointech jsou však poměrně značné.

Tab. 3 Přehled break-pointů pro cefotaxim a ceftazidim

Země	MIC break-point* ($\mu\text{g/ml}$)			
	Cefotaxim		Ceftazidim	
	C (\leq)	R (\geq)	C (\leq)	R (\geq)
Spojené Státy Americké	8	64	8	32
Velká Británie	1	2	2	4
Francie	4	32	4	32
Nizozemí	4	1	4	16

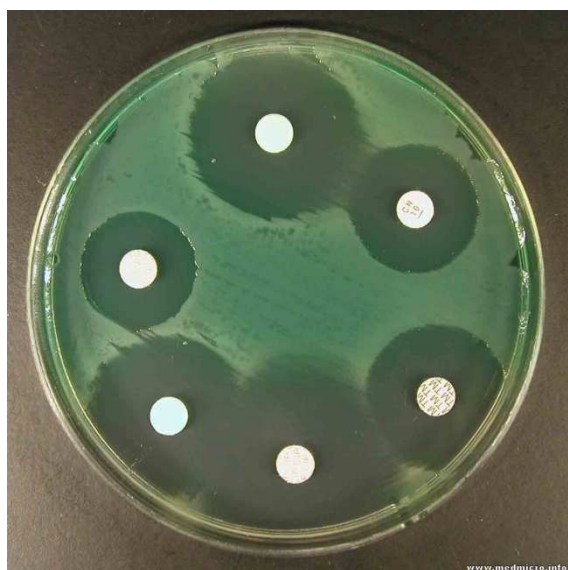
Německo	2	8	4	32
Španělsko	1	8	1	8
Norsko	2	16	2	16
Švédsko	4	32	4	16

*C- citlivý, R- rezistentní; MIC- minimální inhibiční koncentrace (Paterson and Bonomo, 2005; upraveno)

CLSI navrhl MIC cefalosporinů pro vnímavé druhy, jako $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ (CLSI, 2005). CLSI break-pointy pro široké spektrum cefalosporinů a aztreonam pro citlivé členy z čeledi Enterobacteriaceae byly zavedeny na začátku 80-tých let. S použitím této koncentrace cefalosporinů byla úspěšnost léčby více než 95 %.

Jednotlivé ESBL mají odlišné stupně vnímavosti k některým cefalosporinům (cefotaxim, ceftriaxon, ceftazidim), což je způsobeno tím, že různé beta-laktamázy hydrolyzují tato agens odlišnými rychlostmi a tím, že některé cefalosporiny penetrují do nitra buňky ve větší míře, na rozdíl od ostatních.

DDT by se měl podle CLSI využívat jako screeningová metoda pro ESBL pozitivní *K. pneumoniae*, *E. coli* a *Proteus mirabilis*. Testování se provádí pomocí cefpodoximu, aztreonamu, ceftazidimu, cefotaximu nebo ceftriaxonu. Použití více jak jednoho z těchto agens úspěšně zvyšuje citlivost metody. ESBL producenti se vyhledávají pomocí průměru inhibičních zón okolo disků napuštěných beta-laktamy. CLSI doporučuje, aby průměrná zóna okolo disku s $10 \mu\text{g}$ cefpodoximu pro ESBL měla hodnotu $\leq 17 \text{ mm}$ (NCCLS, 2005). Limity pro pozitivní výsledek jsou u ceftazidimu $\leq 22 \text{ mm}$, aztreonamu $\leq 27 \text{ mm}$, cefotaximu $\leq 27 \text{ mm}$ a ceftriaxonu $\leq 25 \text{ mm}$ (CLSI, 2006).



Obr. 9 Diskový difúzní test (<http://atlas.medmicro.info/>)

Diluční testy

Výsledkem standardizované metody stanovení citlivosti bakterií dilučními testy, za použití Mueller-Hintonova bujonu jako růstového média, je stanovení MIC pro daná antibiotika. Nejčastěji se provádí v mikrotitračních destičkách, kde jsou antibiotika ředěna geometrickou řadou (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2;...) Koncentrace inokula odpovídá 0,5 zákalové stupnice McFarlanda (10^5). Bakterie citlivé při příslušné MIC antibiotika in vitro však nemusí být dostatečně citlivé in vivo, neboť se zde se uplatňuje více efekt inokula. CLSI doporučuje pro ceftazidim, aztreonam, cefotaxim nebo ceftriaxon použít break-point 2 $\mu\text{g/ml}$. Je-li prokázán růst za těchto podmínek, jedná se o podezření z produkce ESBL a je indikován fenotypový konfirmační test. V dilučních testech se neužívá cefpodoxim, protože Oliver a spol. našli v roce 2002 u 59 kmenů *E. coli* non-ESBL sníženou vnímavost při MIC 2 nebo 4 $\mu\text{g/ml}$ tohoto antibiotika. Což bylo pravděpodobně způsobeno produkcí TEM-1 beta-laktamáz společně se ztrátou nebo poškozením hlavního porinového proteinu, zvýšenou produkcí AmpC chromozomální beta-laktamázy, či izoláty exprimujícími OXA-30 beta-laktamázy (Oliver et al., 2002).



Obr. 6 Běžný mikrodiluční test (čísla: koncentrace atb, žlutě: break-point, inhibice růstu: bez zákalu), (http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/mic/zvets_pop.jpg)

b. Fenotypové konfirmační testy

Disková metoda s kombinací cefalosporin/klavulanát

Pro fenotypovou konfirmaci při podezření na ESBL u *klebsiell* a *E. coli* doporučuje CLSI použití cefotaximu (30 µg) nebo ceftazidimu (30 µg) s nebo bez kyseliny klavulanové (10 µg). Jako pozitivní výsledek je považována rozdíl velikosti inhibiční zóny mezi diskem s cefalosporinem a kombinovaným diskem téhož cefalosporinu ≥ 5 mm, ve prospěch disku s klavulanátem (CLSI, 2006).

Mikrodiluční metoda

Používá k provedení ceftazidim v koncentraci (c) c=0,25- 0,128 µg/ml, ceftazidim s kyselinou klavulanovou c= 0,25/4- 128/4 µg/ml, cefotaxim c= 0,25- 64 µg/ml a cefotaxim s kyselinou klavulanovou v c 0,25/4- 64/4 µg/ml (Queenan et al., 2004). Snížení MIC \geq tři ředění každého cefalosporinu s klavulanátem ve srovnání se samotným, je brán jako pozitivní výsledek.

Falešně-pozitivní a falešně-negativní výsledky fenotypových konfirmačních testů

- Falešně pozitivní výsledky způsobují izoláty *K. pneumoniae* nebo *E. coli* s hyperprodukcí SHV-1 navíc s větším množstvím malých vnějších membránových proteinů (45-kDa); produkce TEM-1, SHV-1 a ztráta vnějšího membránového proteinu OmpK35.
- Falešně negativní výsledky byly hlášeny u *K. pneumoniae* s plazmidem-kódovanou AmpC-beta-laktamázou. AmpC pravděpodobně odolává účinku klavulanátu a proto není zřetelně vidět jeho synergní efekt s cefalosporinem vůči ESBL (a to i za použití cefalosporinu IV. generace). Pro průkaz ESBL je proto nutno produkci AmpC inhibovat. AmpC-beta-laktamázy jsou inhibovány kyselinou boritou, kloxacilinem a dalšími látkami. Mueller-Hintonův agar s přídavkem 128 mg/l oxacilinu je metodou volby pro detekci ESBL se současným výskytem AmpC (Coudron, 2005).
- Použitím menšího množství inokula u screeningu a konfirmačních testů byly také pozorovány falešně-negativní výsledky.

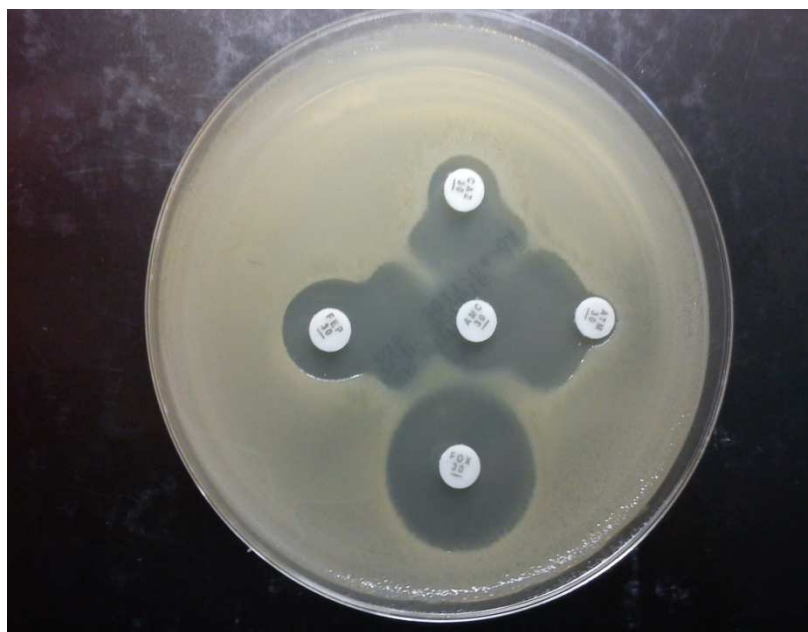
c. Další testy

DDST (Double disk synergy test)

Jedním z prvních popsanych testů (podobný double disk synergy testu) byl navržen Jarlierem et al. v roce 1988. Mueller-Hintonův agar byl nejprve natřen testovanou kulturou a

následně na něj byly umístěny antibiotické disky: do centra agarů disk s amoxicilin-klavulanátem (20 μ g/10 μ g;) a 30 mm (od středu ke středu disku) od něj druhý s oxoimino-beta-laktamem (cefotaxim, 30 μ g). Zvětšená zóna inhibice růstu okolo oxoimino-beta-laktamového směrem k disku s klavulanátem ukazovala na pozitivní výsledek s produkcí ESBL (Jarlier et al., 1988). Antibiotikem volby DDST pro screening ESBL byl navržen cefpodoxim, coby zástupce širokospektrých cefalosporinů, neboť není tolik používán u hospitalizovaných pacientů.

Současná varianta DDST se běžně provádí pomocí 30 μ g disků ceftazidimu, aztreonamu a ceftriaxonu (i např. cefotaximu), které jsou umístěny na agar 30 mm od centra amoxicilin/klavulanát disku (Paterson, 2005). Pozitivní pro produkci ESBL je po kultivaci Petriho misky s agarem zvětšená zóna inhibice směrem ke kombinovanému disku připomínající tvar zátky od šampaňského.



Obr. 7 DDST ESBL+ (foto, MUDr. P. Paterová, 2011)

CAZ...ceftazidim, FEP...cefepim, FOX...cefoxitin, AMC...amoxicilin/klavulanát,
ATM...aztreonam

E-test

Využívá dvoustranného stripu, který obsahuje gradient oxoimino-beta-laktamu na jedné straně, a na opačné straně gradient stejného beta-laktamu s kyselinou klavulanovou (Cormican et al., 1996). Dostupné jsou stripy s ceftazidimem a cefotaximem, což zlepšuje schopnost detekovat ESBL, které přednostně hydrolyzují cefotaxim jako jsou CTX-M-beta-laktamázy. Zmenší-li se MIC cefalosporinu s kyselinou klavulanovou o ≥ 2 ředění, je

výsledek ESBL pozitivní. Tato metoda je vhodná jak pro screening, tak pro fenotypovou konfirmaci ESBL producentů. Její citlivost jako fenotypového konfirmačního testu byla hlášena 87-100% a specificita 95-100 % (Asma M Al-Jasser, 2006). Někdy je E-test obtížně interpretovatelný, zejména u kmenů slabě produkujících enzymy jako je TEM-12. Kyselina klavulanová z opozitní strany difunduje až k samotnému cefalosporinu a tak může zkreslovat výsledek testu.



Obr. 8 E-test kmene produkujícího ESBL

(TZ...ceftazidim, TZL...ceftazidim+klavulanát) (Bradford, 2001)

Automatizované testy pro detekci ESBL

-Komerční systém *Vitek ESBL test* využívá cefotaximu a ceftazidimu, samotné (0,5 μ g/ml) a jejich kombinaci s klavulanátem (4 μ g/ml). Redukce růstu v lánzi s cefotaxim/klavulanát nebo ceftazidim/klavulanát ve srovnání se stupněm růstu v lánzi se samotným antibiotikem značí pozitivní výsledek. Citlivost a specificita metody přesahuje 90 % (Sanders et al., 1996). Falešně-negativní výsledky byly pozorovány u *K. pneumoniae* s koprodukcí ESBL i AmpC beta-laktamáz (Paterson, 2005).

-*Metoda MicroScan* je vysoce spolehlivá a využívá stejných cefalosporinů jako u testu Vitek.

Metoda agaru s kyselinou klavulanovou

Antibiotické disky s ceftazidimem, cefotaximem, ceftriaxonem a aztreonamem (všechny po 30 μ g) jsou umístěny na Mueller-Hintonův agar obohacený klavulanátem. Současně jsou položeny i na agar bez suplementace. Je-li zóna inhibice okolo beta-laktamu na médiu s klavulanátem větší o ≥ 10 mm, je výsledek považován za pozitivní ESBL produkci. Nevýhodou této metody je potřeba připravit čerstvé agary s kyselinou klavulanovou, neboť její účinek začíná klesat již po 72 hodinách (Paterson, 2005).

Metoda s nahrazením disků

Tři disky s amoxicilin/klavulanátem jsou položeny na Mueller-Hintonův agar, který je naočkován testovaným organismem. Agar je hodinu inkubován při pokojové teplotě, poté jsou z něj disky odstraněny a na to samé místo nakladeny disky obsahující ceftazidim, cefotaxim a aztreonam. Kontrolní disky těchto tří antibiotik jsou současně umístěny alespoň 30 mm od místa testování. Je-li zóna inhibice okolo disků, na jejichž místech byly před tím kombinované disky, o ≥ 5 mm větší ve srovnání s kontrolou je výsledek pozitivní na produkci ESBL (Asma M Al-Jasser, 2006).

d. Genotypové metody detekce ESBL - molekulárně-detekční metody

Genotypizace je využívána zejména v univerzitních nemocnicích, jako součást lékařského výzkumu nebo v referenčních laboratořích. Poměrně rychle dokáží určit rezistentní kmeny a přispívají ke zvolení správné antibiotické terapie. Fenotypizace potvrdí přítomnost ESBL, ale na rozdíl od genotypizace již nezjistí, jaký druh ESBL je přítomný. Fenotypové metody odhalují přítomnost nových rezistentních genů a detekují mutace, které souvisejí a antimikrobiální rezistencí. Molekulární metody jsou obzvláště přínosné u rezistentních mechanismů, které by nemusely být běžnou fenotypovou detekcí vůbec odhaleny. Na druhou stranu mohou slabé geny a pseudogeny vést k falešně pozitivním výsledkům. Další nevýhodou je, že jsou spojeny s vysokými finančními náklady na laboratorní zařízení. I nadále zůstává určení antibiotické citlivosti pomocí fenotypových metod zlatým standardem pro výběr správné terapie.

▪ DNA sondy a oligotypizace (hybridizační techniky)

DNA hybridizační sondy značené ^{32}P byly dříve používány pro identifikaci TEM-1, SHV-1, OXA-1 a -2. Tato metoda byla však poměrně náročná, a proto byly navrženy oligonukleotidové sondy, které byly schopny odhalit místo mutace za přísných hybridizačních podmínek. Nejdříve rozeznávaly TEM-1 a TEM-2 v klinickém izolátu. Později byly vyvinuty oligonukleotidové sondy značené radioizotopem nebo biotinem, které odhalovaly mutace v šesti pozicích uvnitř bla_{TEM} genu (Mabilat and Courvalin, 1990).

▪ Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je nejjednodušší a nejběžnější molekulární metoda pro detekci přítomnosti beta-laktamáz. Tato metoda v přítomnosti termostabilní polymerázy a oligonukleotidových primerů syntetizuje nové oligonukleotidy, vše probíhá v tzv. termocyclerech. Základním

principem je střídání tří cyklů: 1. Denaturace DNA (94°C), 2. Annealing, „nasednutí primerů“ (55-60°C), 3. Elongace (72°C). Na konci každého cyklu dojde ke zdvojnásobení molekul DNA. U beta-laktamázy může probíhat amplifikace celého genu (*bla* gen) nebo jen jeho určité cílové části (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}), které jsou ohraničeny specifickými oligonukleotidovými primery. PCR určí jednotlivé třídy beta-laktamázy, ale nedokáže rozlišit mezi enzymy s úzkým- a širokým-spektrům aktivit a také mezi variantami jednotlivých enzymů (TEM-1, TEM-2, TEM-3,...). Proto byly navrženy techniky zaměřené na specifické bodové mutace (Chromá, Kolář, 2010).

- **PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism, restrikční fragmenty délkového polymorfismu)**

Po dokončení PCR jsou amplifikované molekuly DNA vystaveny působení restrikčních endonukleáz, které štěpí dvoj- nebo jednovláknovou DNA ve specifických nukleotidových sekvencích neboli restrikčních místech. Délkový polymorfismus je určen podle přítomnosti nebo chybění restrikčních míst. RFLP metoda je zvláště vhodná při určování TEM-typů ESBL, kde jsou díky známým mutacím rychle detekována nová restrikční místa a následně rozštěpena. Jednotlivé štěpy DNA jsou separovány pomocí elektroforézy a porovnány jejich délky.

- **PCR-SSCP (single strand conformational polymorphism, jednořetězcový konformační polymorfismus)**

Metoda založená na pohyblivosti amplifikované ssDNA (jednořetězcové) v nedenaturovaném polyakrylamidovém gelu je schopná určit mutace a polymorfismy, které ji odlišují od základní nemutované sekvence ssDNA. Tyto odchylky od základní DNA se projeví změnou v pohyblivosti, a budou produkovány bandy odlišné od normálního žebříčku. SSCP byla využita při detekci jednotlivých bodových mutací na specifických místech v rámci *bla*_{SHV} genu. Metoda byla aplikována při detekci SHV-7 genu a pro identifikaci různých SHV genů v rámci jednoho kmene (M'Zali et al., 1998).

- **LCR (Ligase chain reaction)**

LCR dokáže určit DNA sekvence lišící se jedním párem bází za pomoci dvou párů oligonukleotidových primerů, které jsou komplementární k cílové sekvenci denaturované DNA. Každý primer z páru hybridizuje s přilehlými úseky DNA. Záměna jedné báze cílové DNA zabraňuje ligaci (díky nedokonalé hybridizaci) a následné amplifikaci. LCR byla

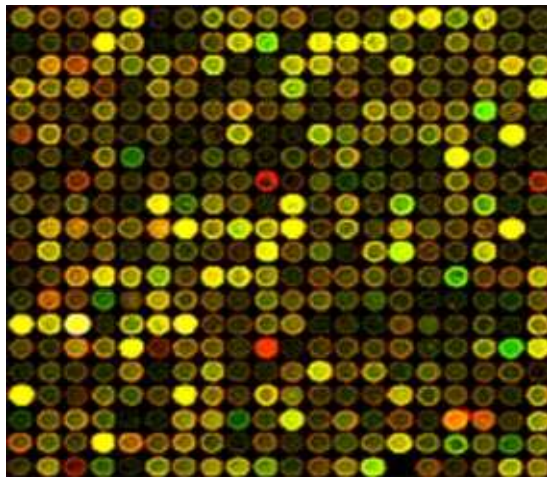
navržena pro identifikaci SHV genů (určovala 7 SHV variant). LCR produkt v této metodě byl detekován pomocí NADPH-alkalické fosfatázy (Kim, Lee; 2000).

- **Real-time PCR (PCR v reálném čase)**

Od klasické PCR se liší snížením doby trvání jednoho cyklu, eliminací nutnosti další analýzy vzorků (ELFO) a tím, že využívají specifických fluorescenčních sond (SYBR Green I). Kvantifikace amplikonů probíhá v průběhu reakce díky značeným primerům, které jsou vmezeřeny mezi báze dsDNA. Real-time PCR a následnou analýzou křivky tání našla praktické uplatnění v detekci SHV-ESBL. Randegger a Häthchler dokázali vyvinout metodu pro detekci mutací v třech hlavních kodonech (aminokyselinové pozice 179, 238, 240) v rámci *bla_{SHV}* v průběhu jedné reakce. Tato metoda byla schopna určit mezi *bla_{SHV-non-ESBL}* a *bla_{SHV-ESBL}* ve studovaném vzorku. Kombinací real-time a multiplex PCR s následnou analýzou křivky tání bylo umožněno současnou identifikaci SHV a CTX-M ESBL (Chromá, Kolář; 2010).

- **DNA microarray (mikročipy)**

Na rozdíl od ostatních molekulárních metod, které detekují jen omezené množství cílových genů v jedné reakci, DNA microarray může v jednom cyklu určit většinu nebo i všechny geny, které organismus vlastní. Je využívána především ke kvantifikaci genové exprese; ke genotypizaci (určení genů rezistentních na antibiotika, mutace); u sekvenování (hledání nových mutací); u hledání SNP (single nucleotide polymorphism). Princip metody spočívá v hybridizaci fluorescenčně značené DNA ze vzorku s oligonukleotidy kovalentně navázanými na povrchu destičky (12 cm²), které představují genotyp hledaného organismu. Současně se přidává i jinak barevná kontrola a sleduje se výsledná intenzita jednotlivých signálů.



Obr. 9 DNA mikročipy (<http://bio.cse.ohio-state.edu/MicroarrayDesigner/>)

V roce 2004 byla Grimmem a spol. uznána oligonukleotidová mircoarray metoda pro rychlou identifikaci ESBL gram-negativních bakterií současnou genotypizací *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M}. Pole se 168 sondami zahrnuje i detekci mutací, které jsou zodpovědné za 156 aminokyselinových substitucí. Test trvá asi pět hodin. Další metodu, pro detekci deseti známých ESBL z čeledi Enterobakterií a pro typizaci šesti důležitých bodových mutací v oblasti *bla*_{SHV} genu, popsal Zhu a spol. (Chromá a Kolář; 2010).

V. Epidemiologie *K. pneumoniae* ESBL

▪ Výskyt v Evropě

Rychlost vzniku, způsob šíření a typy ESBL produkovaných enterobakteriemi se liší na každém světovém kontinentu, ale i mezi jednotlivými státy, městy a dokonce i mezi jednotlivými nemocnicemi. První ESBL-producenti byli objeveni v Německu a Anglii. Roku 1986 bylo ve Francii hlášeno první velké ohnisko infekce způsobené ESBL. Šíření ve Francii pokračovalo a na začátku 90.-tých let bylo již 25-35 % nozokomiálně-získaných *K. pneumoniae* produkujících ESBL. Nicméně, zavedením protiinfekčních opatření a vývojem nových laboratorních technik na detekci ESBL *K. pneumoniae* jejich výskyt zde začal klesat. (Marty and Jarlier; 1998) Studie prováděné v rámci Evropy ukázaly značné procento rozdílů mezi produkcí ESBL *K. pneumoniae* na 100 JIP mezi jednotlivými státy (Švédsko 3 %, Portugalsko 34 %). Další studie z 25 evropských nemocnic (JIP a non-JIP) odhalily, že 21 % *K. pneumoniae* mělo sníženou citlivost k ceftazidimu (Paterson, Bonomo, 2005).

▪ Situace ve světě

Program antimikrobiálního dohledu (surveillance) v letech 1997-1999, který byl zaměřen na celosvětový výskyt ESBL pozitivních *K. pneumoniae* ukázal: 45 % v Latinské Americe, 25 % v západním Pacifiku, 23 % v Evropě a 8 % v USA. Tato situace byla způsobena především neuváženým a nekontrolovatelným podáváním cefalosporinů III. generace (Manzoor Ahmed Thokar et al., 2010).

V Austrálii vznikají ohniska infekcí ESBL *K. pneumoniae* jak u dospělých, tak u dětských pacientů. Z celosvětového výskytu připadá na Australské nemocnice asi 5 %.

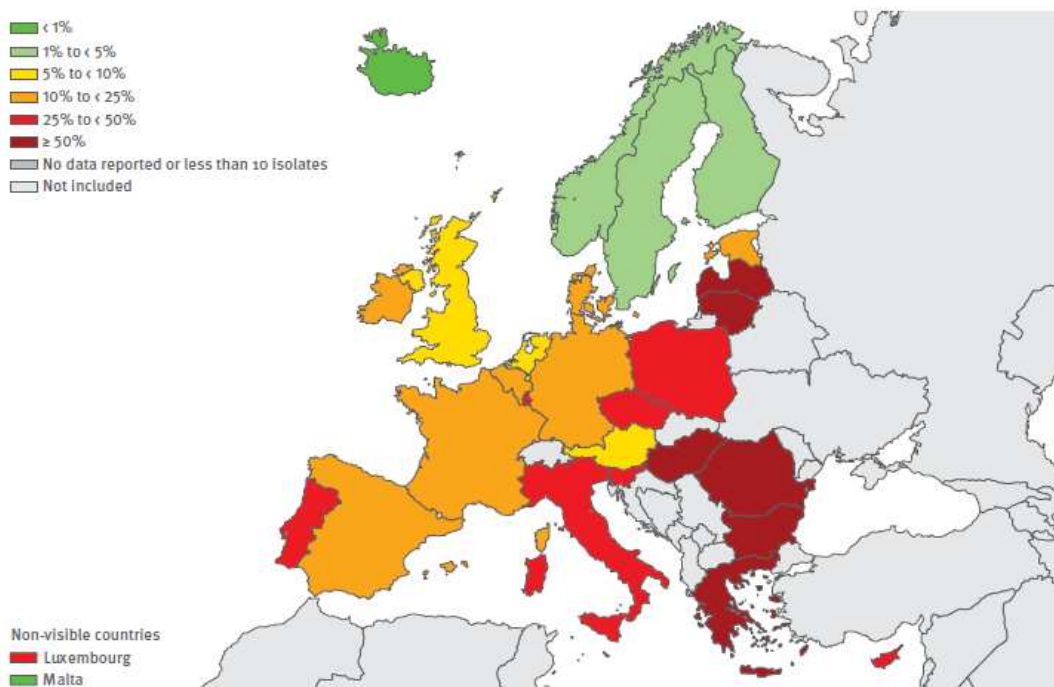
Na Asijském kontinentu byla hlášena první *K. pneumoniae* s SHV-2 v roce 1988 v Číně. Nejdříve v jednotlivých studiích dominovaly ESBL typu SHV-2, SHV-5, SHV-12. Později se začaly vyskytovat nové varianty SHV-ESBL na Taiwanu, v Japonsku. Poslední výzkumy ukazují, že CTX-M-typ by mohl být dominantní ESBL v Asii.

Mezinárodní výsledky z let 1998-1999 v rámci Programu antimikrobiální surveillace prováděné na území Asijského Pacifiku a v Severní Africe, bylo z 678 izolátů *K. pneumoniae* označeno 171 (25,2 %) jako fenotypově ESBL pozitivních. Vysoká prevalence ESBL *K. pneumoniae* (> 20%) byla pozorována ve všech velkých městech v Číně, v Japonsku a na Taiwanu, dále ve Filipínách, v Severní Africe, v Singapuru a především ve všech fakultních nemocnicích (Pfaller, Jones, 2002).

V USA bylo porovnání zkoušek rezistence k III. generaci cefalosporinů se zbytkem světa nemožné, neboť definice rezistence byla odlišná: MIC (ceftazidim) ≥ 32 $\mu\text{g}/\text{m}$, či ≥ 64 $\mu\text{g}/\text{m}$ pro cefotaxim/ceftriaxon místo běžně používané MIC mezi 2-16 $\mu\text{g}/\text{m}$. NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance) v letech 1998-2002 odhalila, že 6,1 % z 6 101 izolátů *K. pneumoniae* (ze 110 JIP) bylo rezistentních k III. generaci cefalosporinů. Z toho alespoň u 10 % JIP byla rezistence vyšší než 25 % (NNIS, 2002).

▪ Program antimikrobiální surveillace v Evropě

Program antimikrobiální surveillace v Evropě (EARSS) má dlouholetou tradici. Od roku 2000 je z mnoha evropských zemí hlášeno zvyšující se procento a vzrůstající trend rezistence k III. generaci cefalosporinů, fluorochinolonům a aminoglykosidům u Gram-negativních tyčtek, zvláště *E. coli* a *K. pneumoniae*. V roce 2009 byl zaznamenán i vysoký stupeň rezistence ke karbapenemům (bla_{KPC} *K. pneumoniae*) v Řecku a na Kypru. V Belgii a Itálii byla pozorována rezistence ke karbapenemům u 1 % izolátů. Z 2/3 evropských zemí byl hlášen více jak 10% podíl rezistence k III. generaci cefalosporinů a fluorochinolonům. Multirezistentní kmeny (III. generace cefalosporinů, fluorochinolony, aminoglykosidy) vykazovaly 10% podíl rezistence u poloviny evropských zemí. Zvýšený počet multirezistentních *klebsiell* byl nalezen i severní Evropě, kde jsou velice přísně dodržovány zásady správné antimikrobiální terapie. Většina izolátů s rezistencí k III. generaci cefalosporinů byla odolná i vůči fluorochinolonům a aminoglykosidům. Klesající trend rezistentních kmenů byl pozorován pouze ve Velké Británii, Irsku a Maltě (EARS-Net, 2009).



Obr. 14 Stupeň rozšíření izolátů *K. pneumoniae*, rezistentní k III. generaci cefalosporinů v roce 2009 (EARS-Net, 2009)

▪ **Nozokomiální infekce**

Nozokomiální infekce jsou definovány jako nákazy exogenního i endogenního původu vznikající v příčinné souvislosti s pobytem osob ve zdravotnickém zařízení, jsou důležitou příčinou narůstající morbidity, prodloužení doby hospitalizace, zvýšení nákladů spojených s léčbou a mortality (Kolář, 2007). Vznik infekce ESBL *K. pneumoniae* je spjat s mnoha faktory.

Nejdůležitějším rizikem pro kolonizaci a vznik infekce ESBL se jeví předchozí léčba antibiotiky, převážně cefalosporiny III. generace v kombinaci s aminoglykosidy, hned za ní monoterapie cefalosporiny III. generace nebo aminoglykosidy. Ve velkém riziku jsou pacienti těžce nemocní s dlouhodobějším pobytem v nemocnicích a sanatoriích, kteří většinou figurují jako vektory přenosu v ohniscích infekcí způsobených ESBL *K. pneumoniae*, neboť jimi bývají často kolonizováni.

Dalšími faktory jsou rozsáhlé chirurgické operace a zavedení léčebných prostředků jako jsou močové a cévní katetry, endotracheální rourky, umělá plicní ventilace (zvláště jejich ponechání delší dobu).

Další rizikovou skupinou jsou imunokompromitovaní jedinci, především předčasně narozené děti, na druhé straně staré osoby; pacienti s dekubity; v režimu hemodialýzy; se špatným

stavem výživy a ti, kteří jsou odkázáni na parenterální nutriční dávky (Paterson, Bonomo, 2005).

Zdrojem nákazy je pacient s infekcí ESBL *K. pneumoniae* nebo pacient kolonizovaný. Kolonizace míst s přirozenou mikroflórou (zvláště gastrointestinálního traktu, horních cest dýchacích, chronických ran) může být dlouhodobá bez zjevných známek infekce. Tyto systémy mohou být zdrojem endogenní infekce, při nedostatečné ošetrovatelské péči mohou být zdrojem pro kolonizaci močových a jiných katetrů.

Zdravotnický personál má podíl na vzniku těchto ohnisek především neuváženým podáváním antibiotik. Ošetřující personál může fungovat též jako cesta přenosu ESBL *K. pneumoniae*, zvláště důležité jsou ruce zdravotníků. Špatné dezinfekční návyky a nepoužívání rukavic vede k přenosu ze zdroje na ostatní pacienty. Sám zdravotník může být kolonizován, a tak být přímým zdrojem při ošetřování.

K. pneumoniae ESBL získané za pobytu v nemocničním zařízení způsobují nejčastěji infekce dýchacích cest, ran, dále sepse, infekce močové a intraabdominální. Zajímavé je, že ESBL-typy, které způsobily epidemii, mohou koexistovat s těmi sporadickými. Tak může být v rámci jedné nemocnice více typů ESBL *K. pneumoniae* s převahou těch, které způsobují ohniska infekce. Dále mohou být některé typy ESBL identifikovány v klonálně nepříbuzném izolátu, nebo naopak izoláty toho samého klonálního původu mohou kódovat různé typy ESBL. Tato rozmanitost je způsobena přenosnými genetickými elementy, plazmidy, které se šíří horizontálně (Flagas and Karageorgopolous, 2009).

▪ Komunitní infekce

I když jsou ESBL-producenti považováni za hlavní původce ohniskových nemocničních infekcí, přibývá stále více případů získaných infekcí ESBL v běžné společnosti, což je velmi důležitý problém veřejného zdraví. K této situaci přispělo především rozšířené neadekvátní užívání antibiotik, především širokospektrálních. Dále zvýšené užívání antibiotické terapie u hospodářských zvířat, mezinárodní cestování, dlouhodobější přežití oslabených a starých osob, vyšší počty imunokompromitovaných osob (alkoholici) a chudoba ve světě (Abinash and Steckelberg, 2000). Tyto infekce ESBL postihují především močové cesty, občas mohou přejít v sepsi. Vysoký je počet osob se střevním nosičstvím. ESBL bývá izolována především u ambulantních pacientů s různými rizikovými faktory. Podle studie případů a kontrol byla riziková skupina pro ESBL-získanou infekci *E.coli* popsána jako: vyšší věk, ženské pohlaví, cukrovka, opakované infekce močového traktu, předchozí přístrojové vyšetření močových

cest a předešlá léčba amonopeniciliny, cefalosporiny a fluorochinolony. Počet komunitních ESBL infekcí mají zvyšující tendenci. Přenos z živočišného zdroje na člověka nebo z jednoho pacienta na druhého by mohl být potenciálním rizikem diseminace ESBL, což je ale předmětem dalších studií (Rodriguez et al., 2008).

VI. Léčebné možnosti *K. pneumoniae* ESBL

Cílená terapie je založena na výsledcích testů citlivosti prováděných in vitro. ESBL hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny (s výjimkou cefamycinu) a aztreonam (monobaktam). Navíc jsou některými ESBL-producenty přenášeny i plasmidově-kódované geny rezistence k aminoglykosidům, trimethioprim/sulfametoxazolu, u také u rezistence k flourochinolonům byla sledována častější asociace s plazmidem-kódovanou rezistencí k cefalosporinům. Tak může mnoho léčebných postupů selhávat, což významně prodlužuje dobu trvání infekce, ohrožení pacienta na životě a zvyšuje i náklady na léčbu.

Karbapenemy

Karbapenemy jsou považovány za lék volby pro těžké infekce vyvolané ESBL. V in vitro testech s karbapenemy nebyly pozorovány výkyvy v jejich citlivosti a jejich využití v lékařské praxi vzrůstá (Paterson et al., 2004). Léčba meropenemem je indikována u nosokomiálních meningitid, účinný je také polymyxin B. Ertapenem dávkovaný 1x denně může být využit při těžkých ESBL infekcích u pacientů v sanatoriích nebo léčících se mimo nemocniční zařízení. Někdy je pozorován synergní účinek karbapenemů s ostatními třídami antibiotik (Paterson, 2005).

Cefalosporiny

Cefalosporiny nejsou pro léčbu ESBL infekcí vůbec doporučovány, i když mohou být testy citlivosti in vitro v normě. Ani cefepim by neměl být použit jako první antibiotikum v léčbě ESBL infekce. Pokud už je zvolen, měl by být užíván 2x denně ve vyšších dávkách. Rezistence k cefepimu je často pozorována u CTX-M typů ESBL (Asma M Al-Jasser, 2006).

Cefamyciny

Cefamyciny se řadí mezi nové beta-laktamy a mohou být využity v boji proti ESBL producentům. Mezi cefamyciny, které nejsou hydrolyzovány ESBL patří především cefotetan, cefoxitin a cefmazole. V místech, kde byly cefamyciny hojně používány k terapii infekcí ESBL *K. pneumoniae*, se objevila rezistence k nim samotným a navíc i ke karbapenemům. Další rezistence k cefamycinům se může vyskytnout i u enterobakterií, které postrádají

membránové poriny nebo exprimují zároveň ESBL i AmpC-beta-laktamázy. Proto není doporučován jako první antibiotikum léčby ESBL infekcí, i když je dostatečně aktivní in vitro (Asma M Al-Jasser, 2006). V ČR nejsou tato antibiotika registrována.

Kombinace: beta-laktamové antibiotikum s inhibitorem beta-laktamázy

Inhibitor beta-laktamáz může být různě aktivní vůči hydrolýze beta-laktamového antibiotika za působení ESBL v závislosti na jeho typu a také na typu ESBL. Vůči CTX-M typům ESBL se odolnější jevil tazobaktam nežli kyselina klavulanová. Nicméně byly popsány i terapeutické neúspěchy: ve studiích prováděných na zvířatech byla kombinace beta-laktamu s inhibitorem beta laktamáz méně účinná než léčba karbapenemy (Karadenzili et al., 2001). Produkuje-li ESBL organismus navíc ještě nějaký z mateřských enzymů (SHV-1, TEM-1) v nadbytku a přidruží-li se k této produkci ještě ztráta membránového porinu, může vzniklý fenotyp brzdit aktivitu inhibitoru beta-laktamáz. Inhibitory jsou tedy obvykle aktivní u ESBL infekcí s produkcí jednoho enzymu. Zdá se, že kombinace amoxicilin/klavulanát by mohla sloužit jako druhá linie obrany v léčbě proti infekcím močových cest. Bylo zaznamenáno, že inhibitor beta-laktamáz vykazuje určité protektivní vlastnosti proti infekci a kolonizaci ESBL kmeny *K. pneumoniae* (Piroth et al., 1998).

Chinolony

Patří mezi nebataktamová antibiotika, jejich mechanismus působení je založen na blokadě DNA gyrázy. Chinolony by mohly být zvoleny pro léčbu ESBL infekcí močových cest. Jako rezervní antibiotikum je předepisováno u bakteriemií, pneumonií získaných v nemocničním prostředí a intraabdominálních infekcí, způsobených ESBL. Bohužel rezistence k nim začíná vzrůstat, a tak i jejich terapeutické využití je omezeno. Vývoj novějších chinolonů může přinést mnoho výhod oproti dosavadní léčbě ciprofloxacinem, coby zástupcem 3. generace chinolonů. V roce 2009 byly provedeny dvě velké studie, které se zaměřily na terapii bakteriemií způsobených *K. pneumoniae*. První preferovala léčbu karbapenemy než fluorochinolony. Druhá považovala obě dvě antibiotika za stejně účinné (Flagas and Karageorgopolous, 2009). Vysvětlením by mohlo být, že dávkování chinolonů je neadekvátní u organismů, jejichž MIC (chinolonů) je vyšší, ale stále jsou ještě vnímaví. In vitro pozorování odhalilo možnou synergii ciprofloxacinu s beta-laktamem (cefotaxim, imipenem, cefepim). Kombinace ciprofloxacinu s cefpiromem nebo cefepimem vedla ke snížení MIC ESBL- *K. pneumoniae* o 4 logaritmičké řády (Paterson, 2005).

Aminoglykosidy

Aminoglykosidy jsou účinné v kombinaci s beta-laktamy. Jejich využití k léčbě ESBL je nejisté.

Tigecyklin

Tigecyklin je nové glycylycyklinové antibiotikum, příbuzné tetracyklinům, se širokým spektrem účinku. Je schopen se vyhnout rezistenci, která je pozorována u Gram-negativních bakterií k tetracyklinům. Tigecyklin by mohl snižovat ESBL produkci u izolátů *K. pneumoniae* v závislosti na zvolených break-pointech, kdy jsou bakterie ještě citlivé. Klinické výstupy týkající se využití tigecyklinu nejsou optimistické. Pouze 10-15 % podaného tigecyklinu je aktivně využito, zbytek je beze změny vyloučen. Jeho koncentrace v séru nemusí být dostačující, neboť je zvýšeně distribuován do tkání a je velice silným antimikrobiálním prostředkem vůči patogenním organismům s MIC blízko break-pointu pro citlivost (Flagas and Karageorgopolous, 2009).

VII. Prevence vzniku a šíření ESBL

Hlavním opatřením proti vzniku a šíření ESBL je jasná informovanost zaměstnanců nemocničního zařízení. Povinností každého zaměstnance je dodržování předepsaných pokynů, buď v rámci prevence, nebo již ve vzniklém ohnisku infekce, a zúčastňovat se vzdělávacích seminářů.

- Mikrobiologická laboratoř

Laboratorní detekce a hlášení ESBL jsou prvním stupněm v rámci infekční kontroly. Čím dříve dojde provedení vhodné detekce, tím dříve jsou zahájena preventivní opatření a může se tak zabránit vzniku ohniska infekce ESBL. Informace o výskytu ESBL by měla být poskytována při propuštění pacienta i praktickým lékařům.

- Surveillance

Program surveillance (pozorování) pomáhá ustanovit základní údaje o prevalenci ESBL a sledovat změny v jejich rozložení. Dokáže identifikovat selekční tlaky antibiotik a určuje nejdůležitější determinanty v rámci nápravných opatření (Asma M Al-Jasser, 2006).

- Antibiotická politika

Omezení léčby antibiotiky je spojeno se snížením výskytu rezistentních organismů. Metody pro redukci antimikrobiální terapie jsou spojeny se zavedením přísnější indikace k podávání antibiotik, vytvoření směrnic pro účelné využití antibiotik převážně dodržování zásad správné antimikrobiální terapie.

Zásady správné antimikrobiální terapie:

- nepředepisovat antibiotika v situacích, kdy je jejich přínos zpochybňován: podezření z virové infekce; asymptomatické bakteriurie u starších pacientů se zavedenými katetry; dekubity bez známek abscesu nebo sepse; bakteriální kolonizace respiračního traktu
 - vytvoření postupů pro zvolení vhodné empirické léčby, na podporu omezení předepisování antibiotik praktickými lékaři
 - předepisovat antibiotikum proti konkrétnímu agens (cílená terapie), preferovat úzkospektrá antibiotika v závislosti na výsledcích kultivace a testů citlivosti
 - správná interpretace výsledků kultivací a testů citlivosti, zabránit a rozpoznat kontaminaci
 - užívat antibiotikum jen po dobu nezbytně nutnou
 - zavést optimální dávkování
 - omezení antimikrobiální profylaxe v závislosti na indikaci, trvání infekce a na zvoleném antibiotiku: neužívat III. generace cefalosporinů pro profylaxi ani empirickou terapii
- Kontrola šíření ESBL – epidemiologická opatření

Izolace ESBL **pozitivního pacienta** nebo jeho uložení na samostatný pokoj není vždy nezbytně nutné. Záleží na rozhodnutí personálu po zhodnocení následujících rizik:

- z jakého místa byla *K. pneumoniae* ESBL izolována
- možný způsob přenosu
- přítomnost dalších rizikových faktorů: invazivní terapeutické prostředky (katetry), otevřené rány

Po zhodnocení rizika by potenciálně infekční pacienti měli mít přiděleno vlastní vybavení jako: šatna, předměty k pohybu, ovládací zařízení, mycí mísy, manžety na měření krevního tlaku, kontroverzním řešením je i úplná izolace pacienta a zákaz návštěv (ESBL guideline, 2008).

Ke zjištění ESBL střevního nosičství je možné u pacientů provádět rektální výtěry. Kultivace není technicky náročná, i když vyžaduje selektivní média. Bylo prokázáno, že u značného procenta pacientů s kolonizací gastrointestinálního traktu se později objevila ESBL-infekce (Flagas and Karageorgopoulos, 2009). Jako řešení se nabízí dekontaminace

gastrointestinálního traktu, která by mohla tyto infekce redukovat a omezit tak i horizontální přenos ESBL na okolní pacienty. Problém je však ve vzrůstající rezistenci nozokomiálních ESBL producentů k antibiotikům používaným k dekolonizaci (neomycin, norfloxacin). Navíc může užívání polymyxinů, které mohou mnohdy sloužit jako poslední východisko léčby vysoce rezistentními kmeny, napomáhat selekci multirezistentních Gram-negativních bakterií (Flagas and Karageorgopolous, 2009).

Zdravotnický personál (ESBL guideline, 2008)

- Správná hygiena rukou je jedním z nejdůležitějších úkonů v prevenci šíření ESBL-infekcí. Především striktní a důkladné omytí rukou mýdlem a vodou po každé manipulaci s pacientem nebo předměty v jeho okolí. Zaměstnanci a návštěvníci jsou povinni si při každém vstupu a výstupu z izolace mýt omyté ruce, jinak hrozí riziko přenosu dalších nemocničních patogenů na pacienta.
- Používání osobních ochranných pomůcek jako jsou rukavice na jedno použití, roušky, zástěry jsou rovněž součástí protiinfekčních zásad. Po použití rukavic by měly být ruce omyty.
- Důkladný úklid vodou a detergentem v místnosti pobytu infekčního pacienta, zvláště pokud je přeložen.

Správné sterilizační postupy používaných materiálů, případně vyšší stupeň desinfekce lékařských vyšetřovacích přístrojů (endoskopy).

VIII. Praktická část

1. Materiál a metodika

Výběr dat

Výsledky práce vycházejí z retrospektivní analýzy dat z elektronické databáze laboratorního informačního systému Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Hradec Králové (ÚKM FNHK). Do studie jsou zařazena data všech pacientů hospitalizovaných ve FNHK nebo přicházejících k ambulantnímu ošetření do FNHK, u kterých byla izolována *K. pneumoniae* z klinického materiálu z období od 1. 1. 2009 do 31. 12. 2010. Jsou zpracovány údaje všech kmenů *K. pneumoniae* izolovaných z materiálů uvedených v tab. 4.

Jako I. záchyt je definována časově první kultivace *K. pneumoniae* z jakéhokoliv materiálů, jako záchyt opakovaný je definována každá další kultivace z téhož nebo jiného materiálu.

Přehled jednotlivých klinik FNHK je uveden v tab. 5. Rozdělení oborů na chirurgické a nechirurgické je možno vidět v tab. 6, rozdělení péče na intenzivní a standardní v tab. 7. Roční období jsou definována na jaro (březen, duben, květen), léto (červen, červenec, srpen), podzim (září, říjen, listopad) a zimu (prosinec, leden, únor).

Tab. 4 Přehled zařazených materiálů podle systémů

Hemokultivace	Aerobní hemokultivace
	Anaerobní hemokultivace
	Dětská hemokultivace
	Kultivace cévního katetru
Moč	Moč z permanentní cévky
	Cévkovaná moč
	Moč
	Kultivace močového katetru
Horní cesty dýchací	Kultivace výtěru z laryngu
	Kultivace výtěru z nasopharyngu
	Kultivace výtěru z krku
	Kultivace stěru z dutiny ústní
Dolní cesty dýchací	Kultivace sputa
	Kultivace tracheálního aspirátu
	Kultivace výplachu, aspirátu z bronchu
	Kultivace tracheálního výtěru
	Kultivace bronchoalveolární laváže
Hnis, rána	Kultivace savky (DC)
	Kultivace punktátu, tekutiny
	Kultivace z abscesu
	Kultivace z rány
	Kultivace stěru z dekubitu, z bércevého vředu
	Kultivace tkáně
	Kultivace pleurálního výpotku, ascités
Kultivace hnisu	
Rektum	Kultivace výtěru ze zvukovodu, oka
	Kultivace výtěru z rekta - screening pro JIP
	Kultivace výtěru z rekta
Vagina, uretra	Kultivace výtěru z vaginy
	Kultivace výtěru z uretry
Kůže	Kultivace stěru z kůže

Tab. 5 Rozdělení klinik ve FN HK

Kliniky FN HK	
I.interní klinika	Kardiochirurgická klinika
II.interní klinika	Chirurgická klinika
Klinika infekčních nemocí	Oddělení dětské chirurgie a traumatologie
Plicní klinika	Neurochirurgická klinika
Neurologická klinika	Ortopedická klinika
Psychiatrická klinika	Urologická klinika
Dětská klinika	Klinika ušní, nosní a krční
Kl. anestez., resuscitace a intenz. medicíny	Oční klinika
Kl. nemocí kožních a pohlavních	Porodnická a gynekologická klinika
Kl. onkologie a radioterapie	II. Interní klin. - odd.klinické hematologie
Kl. gerontologická a metabolická	Rehabilitační klinika

Tab. 6 Rozdělení chirurgické vs. nechirurgické obory ve FN HK

Obory	Kliniky FN HK
NECHIRURGICKÉ	I. interní klinika
	II. interní klinika
	Klinika infekčních nemocí
	Plicní klinika
	Neurologická klinika
	Psychiatrická klinika
	Dětská klinika
	Kl. anestez., resuscitace a intenz.medicíny
	Kl.nemocí kožních a pohlavních
	Kl.onkologie a radioterapie
	Kl.gerontologická a metabolická
	II. Interní klin. - odd. klinické hematologie
	Rehabilitační klinika
	CHIRURGICKÉ
Chirurgická klinika	
Oddělení dětské chirurgie a traumatologie	
Neurochirurgická klinika	
Ortopedická klinika	
Urologická klinika	
Klinika ušní, nosní a krční	
Oční klinika	
Porodnická a gynekologická klinika	

Tab. 7 Zařazení oddělení do intenzivní péče ve FN HK

Název oddělení	
Akutní kardiologie	Koronární a arytmiologická jednotka
JIP infekční	JIP plicní
JIP neurologie	JIP větší děti
JIP novorozenci	KARIM (Kl. anesteziologie, resusc. a intenzivní medicíny)
JIP geriatric	JIP interní A
JIP interní B	JIP kardiochirurgická
JIP kardiochirurgická 2	JIP 1 chirurgická
JIP 2 chirurgická	JIP neurochirurgická
JIP transplantační	Oddělení hematol. intenz. péče
JIP (II. IK hematologická)	

2. Výsledky

2.1 Výskyt *K. pneumoniae* ESBL v klinických materiálech

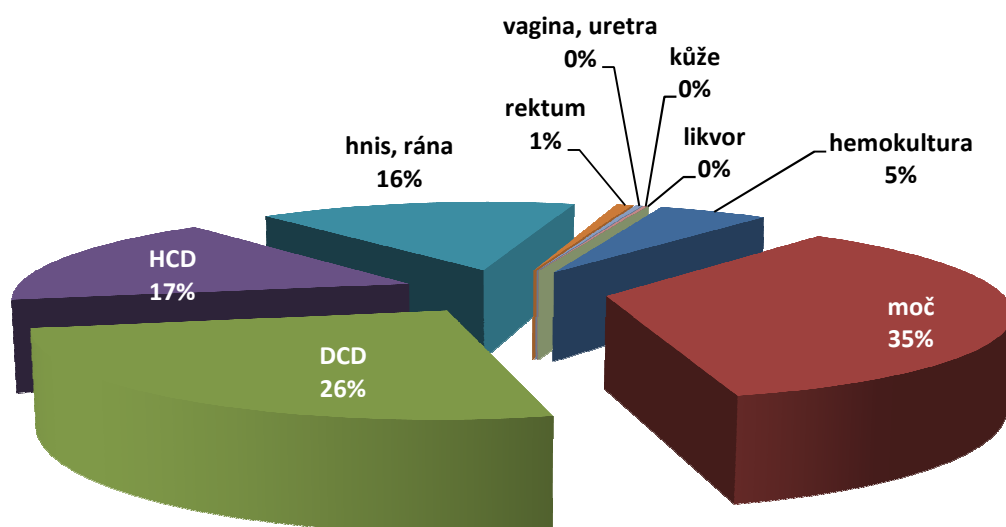
V roce 2009 byl celkový počet pozitivního materiálu 1545 a 1716 v roce 2010. Výskyt kmenů *K. pneumoniae* ESBL v klinických materiálech je zobrazen v tab. 8 a v grafu 1 a 2. Nejčastěji pozitivním materiálem je moč (34-35 %) a vzorky z dolních dýchacích cest (24-26 %). Nejčastější první záchyt *K. pneumoniae* ESBL je zaznamenán opět u vzorků moči (33-38 %). Nejčastěji opakovaně pozitivní materiál je moč.

Celkový počet ESBL pozitivního materiálu v roce 2009, 2010

Tab. 8 Počet pozitivního materiálu celkově, 2009 a 2010

Materiál	Celkem 2009	Celkem 2010
hemokultura	82	82
moč	545	578
DCD	400	403
HCD	260	345
hnis, rána	238	275
rektum	12	20
vagina, uretra	5	4
kůže	3	5
likvor	0	4
	1545	1716

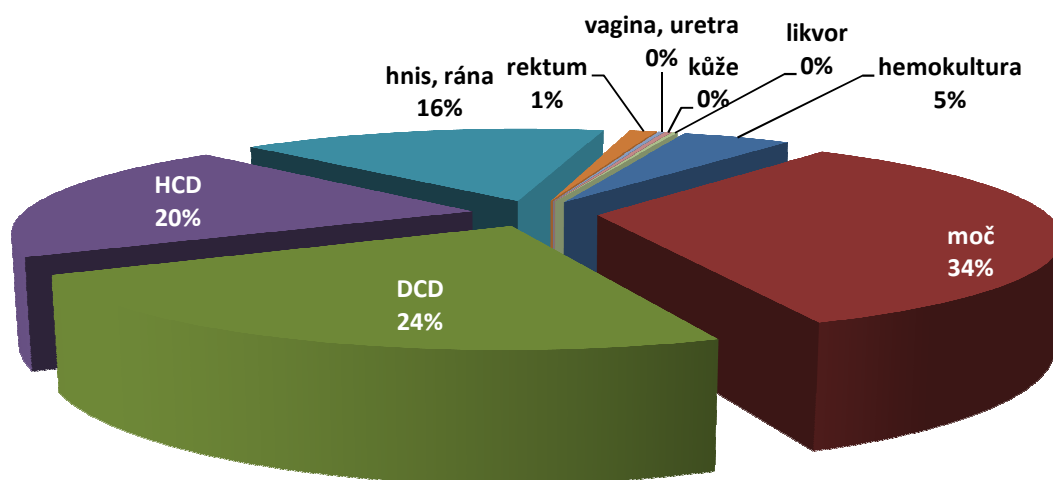
Pozitivní materiál celkově 2009 (n=1545)



Graf 1 Procentuální ESBL pozitivita jednotlivých materiálů 2009 (n=1545)

Z celkového počtu 1545 pozitivních ESBL vzorků náleželo 35 % vzorkům moči a 26 % vzorkům z dolních cest dýchacích.

Pozitivní materiál celkově 2010 (n=1716)



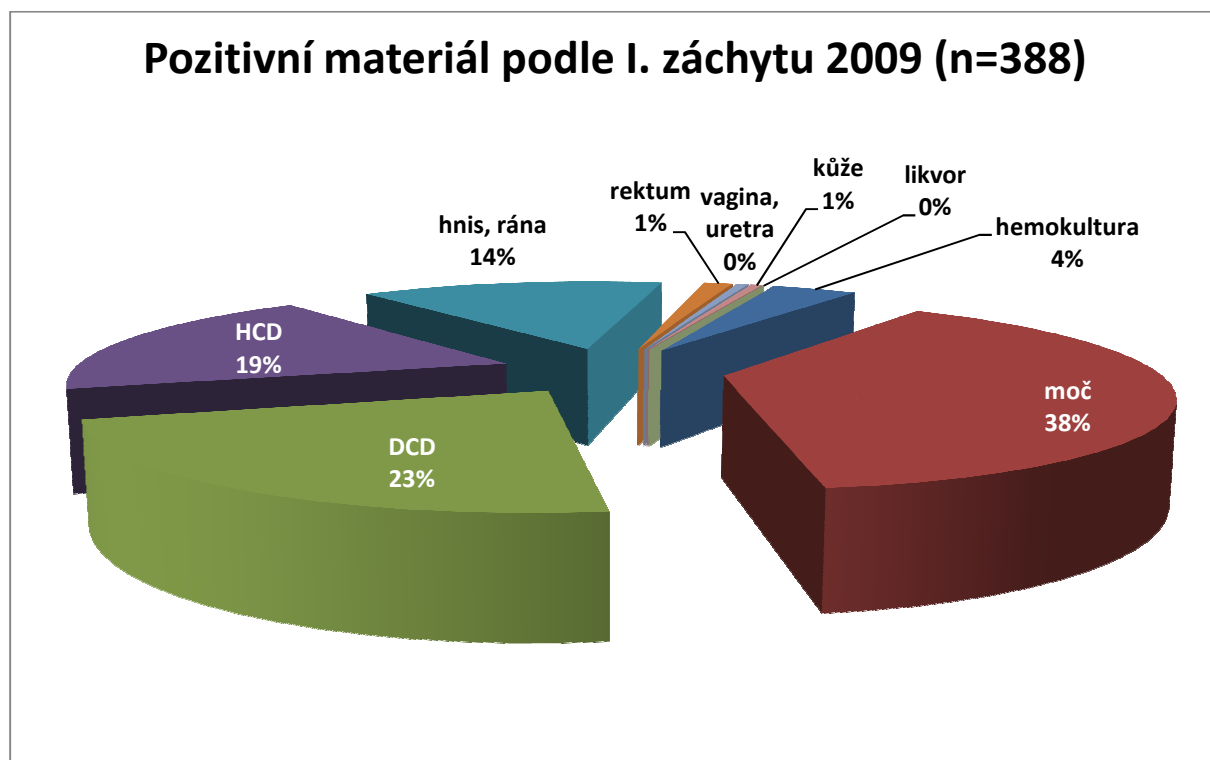
Graf 2 Procentuální ESBL pozitivita jednotlivých materiálů 2010 (n=1716)

Z celkového počtu 1716 pozitivních ESBL vzorků náleželo 34% vzorkům moči a 24% vzorkům z dolních cest dýchacích.

Počet ESBL pozitivního materiálu podle I. záchytu v roce 2009, 2010

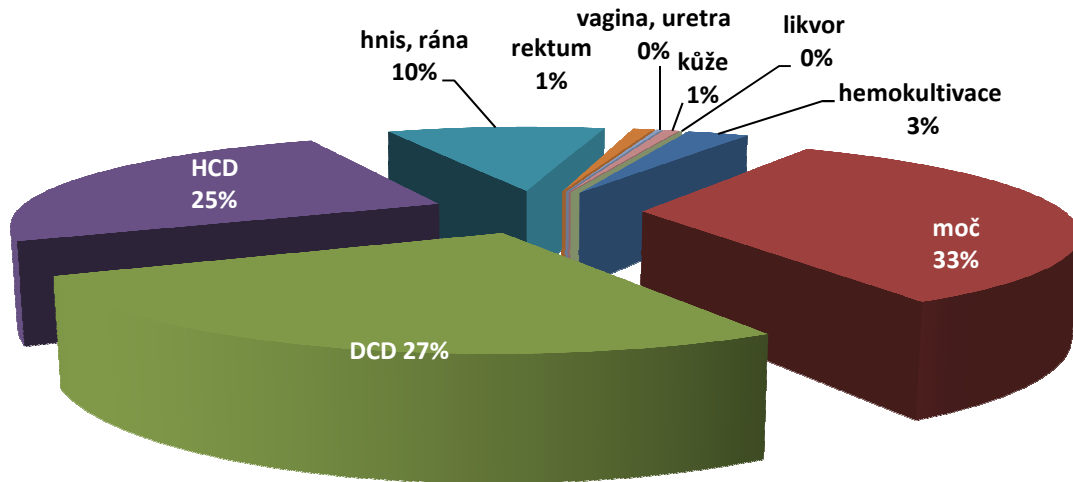
Tab. 9 Výskyt ESBL pozitivního materiálu podle I. záchytu (2009 a 2010)

Materiál	I. pozit. záchyt 2009	I. pozit. záchyt 2010
hemokultura	15	12
moč	149	138
DCD	88	110
HCD	73	104
hnis, rána	54	43
rektum	5	4
vagina, uretra	2	1
kůže	2	3
likvor	0	0



Graf 3 Procentuální ESBL pozitivita jednotlivých materiálů, 2009 (I. pozit. záchyt, n= 388)

Pozitivní materiál podle I. záchytu 2010 (n=415)



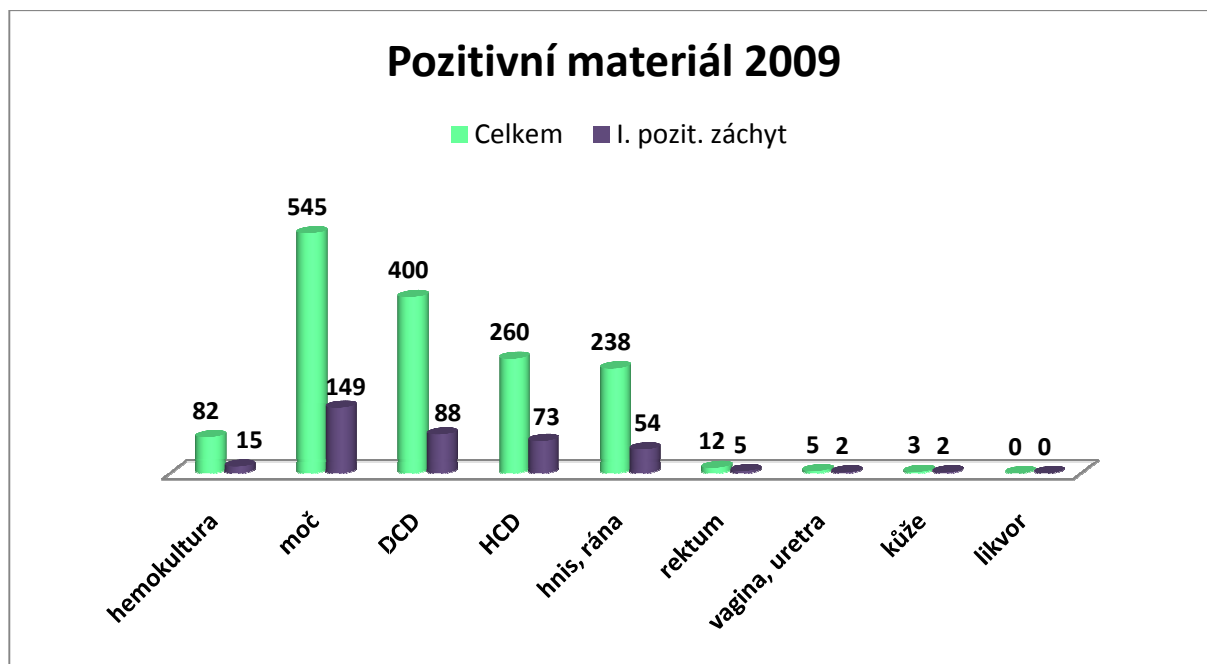
Graf 4 Procentuální pozitivita jednotlivých materiálů, 2010 (I. pozit. záchyt, 415)

Tab. 10 Pozitivní materiál 2009 (celkově, I. záchyt, opakovaně)

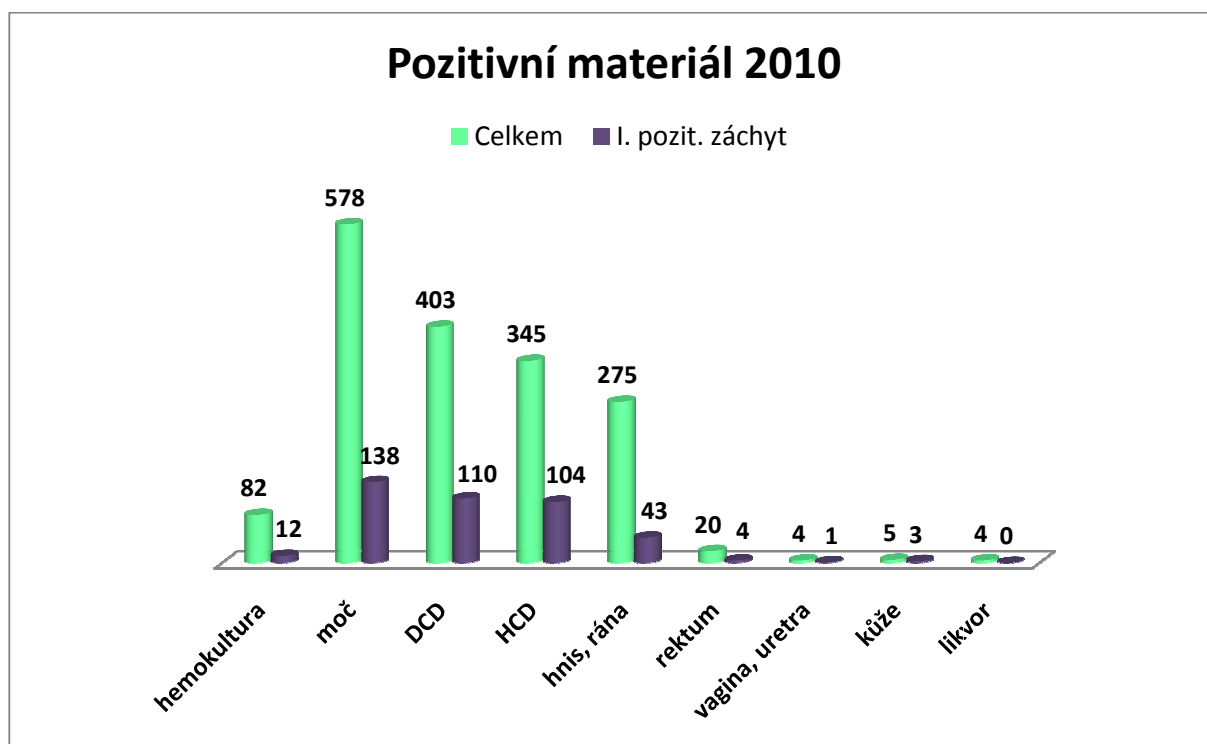
Materiál	Celkem	I. pozit. záchyt	Opakovaný záchyt
hemokultura	82	15	67
moč	545	149	396
DCD	400	88	312
HCD	260	73	187
hnis, rána	238	54	184
rektum	12	5	7
vagina, uretra	5	2	3
kůže	3	2	1
likvor	0	0	0
	1545	388	1157

Tab. 11 Pozitivní materiál 2010 (celkově, I. záchyt, opakovaně)

Materiál	Celkem	I. pozit. záchyt	Opakovaný záchyt
hemokultura	82	12	70
moč	578	138	440
DCD	403	110	293
HCD	345	104	241
hnis, rána	275	43	232
rektum	20	4	16
vagina, uretra	4	1	3
kůže	5	3	2
likvor	4	0	4
	1716	415	1301



Graf 5 Pozitivní materiál 2009 (celkově, I. záchyt)

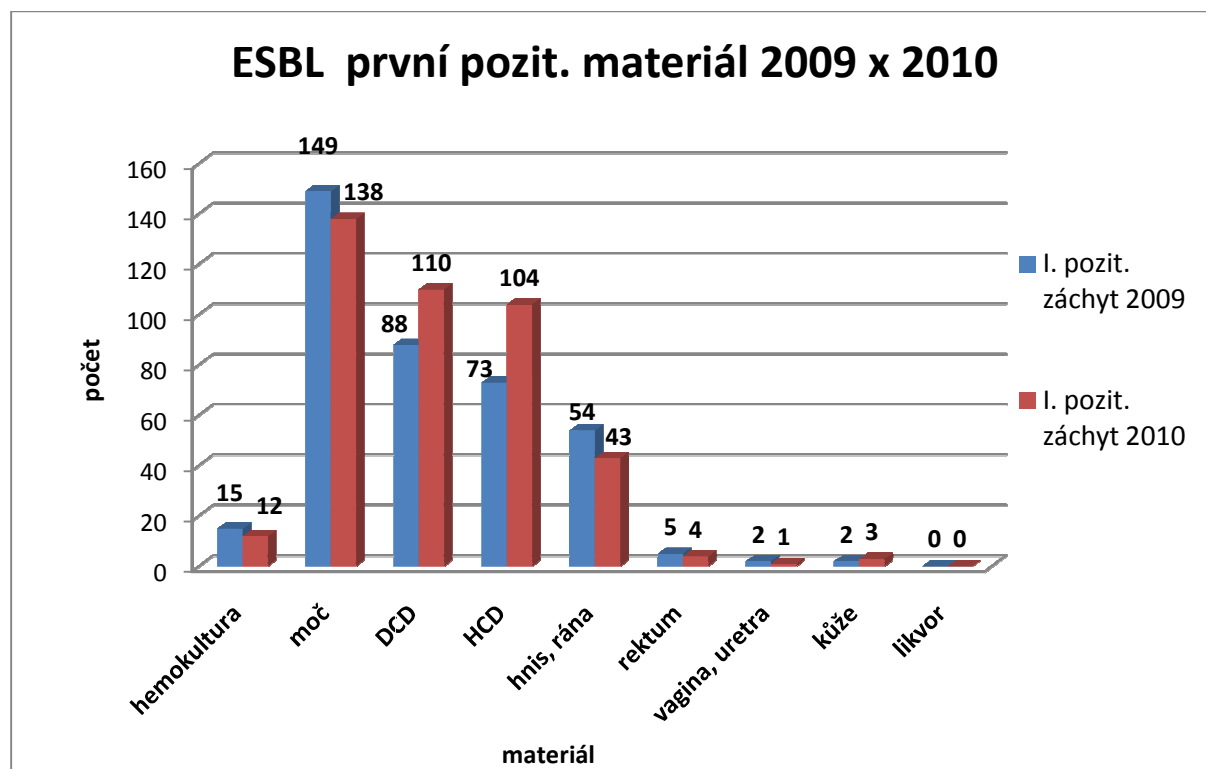


Graf 6 Pozitivní materiál 2010 (celkově, I. záchyt)

Při srovnání materiálů podle I. záchytu (viz. tab. 12 a graf 7) v letech 2009 a 2010 došlo k nejvyššímu nárůstu pozitivních kultivací v dýchacích cestách (161 v roce 2009 vs. 214 v roce 2010).

Tab. 12 Srovnání roku 2009 a 2010 ve výskytu ESBL pozitivního materiálu podle I. záchytu

Materiál	I. pozit. záchyt 2009	I. pozit. záchyt 2010
hemokultura	15	12
moč	149	138
DCD	88	110
HCD	73	104
hnis, rána	54	43
rektum	5	4
vagina, uretra	2	1
kůže	2	3
likvor	0	0

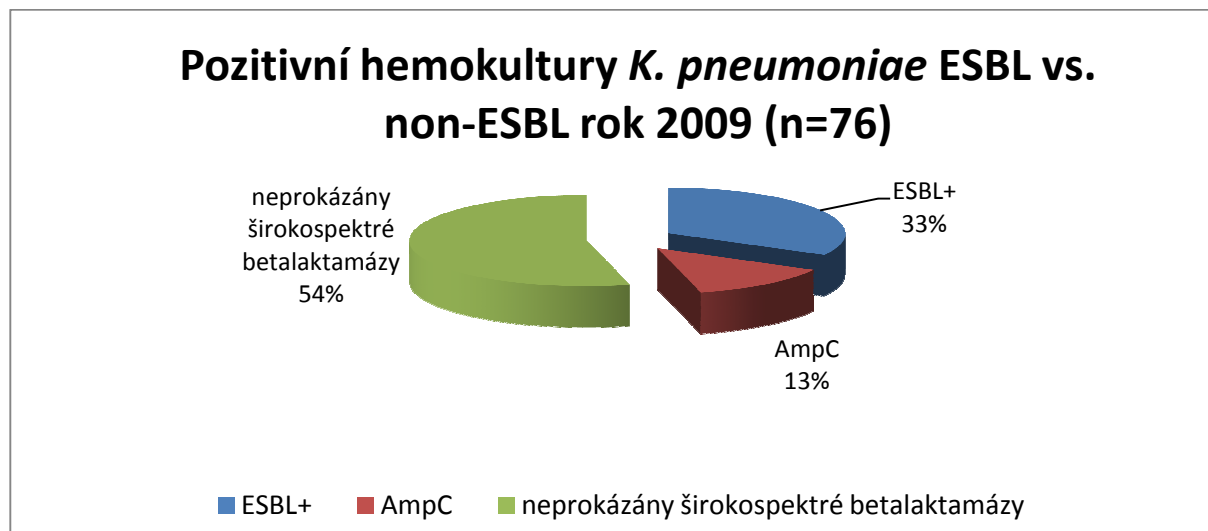


Graf 7 Srovnání roku 2009 a 2010 ve výskytu ESBL pozitivního materiálu podle I. záchytu

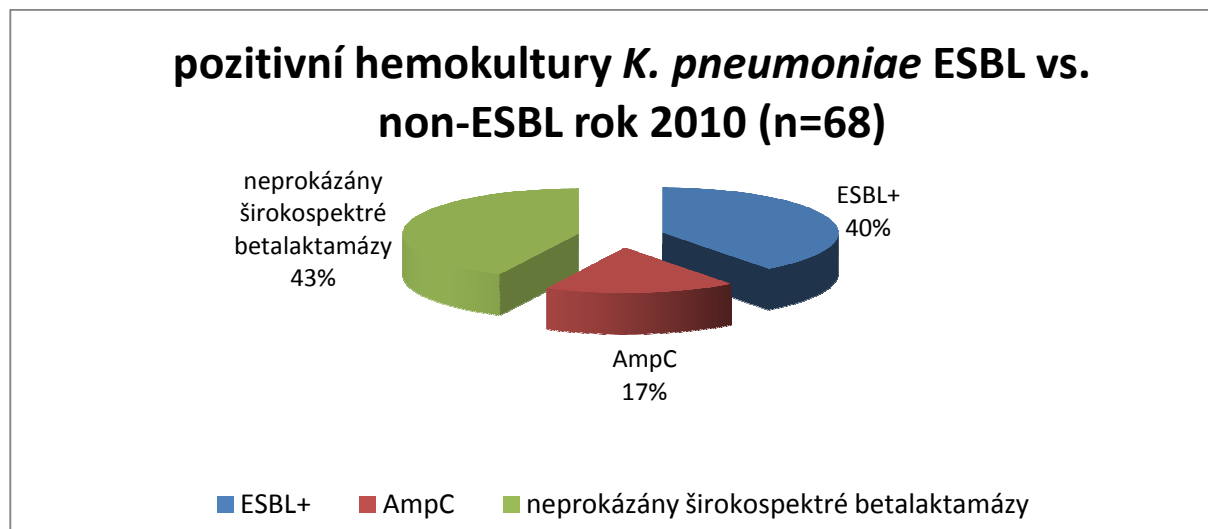
Soubor pacientů s alespoň jednou pozitivní hemokultivací *K. pneumoniae* je zobrazen v tab. 13 a grafu 8, 9. ESBL pozitivní kmeny jsou zachyceny v 33 % invazivních *K. pneumoniae* v roce 2009 a v 40 % v roce 2010.

Tab. 13 Pozitivní záchyt ESBL, AmpC a non-ESBL *K. pneumoniae* z hemokultur v letech 2009 a 2010

hemokultury	ESBL+	AmpC	neprokázány širokospektré betalaktamázy	celkem
2009	25	10	41	76
2010	27	12	29	68



Graf 8 Zastoupení ESBL, AmpC a non-ESBL *K. pneumoniae* pozitivních hemokultur v roce 2009. V roce 2009 bylo z celkového záchytu 76 *K. pneumoniae* 25 ESBL.



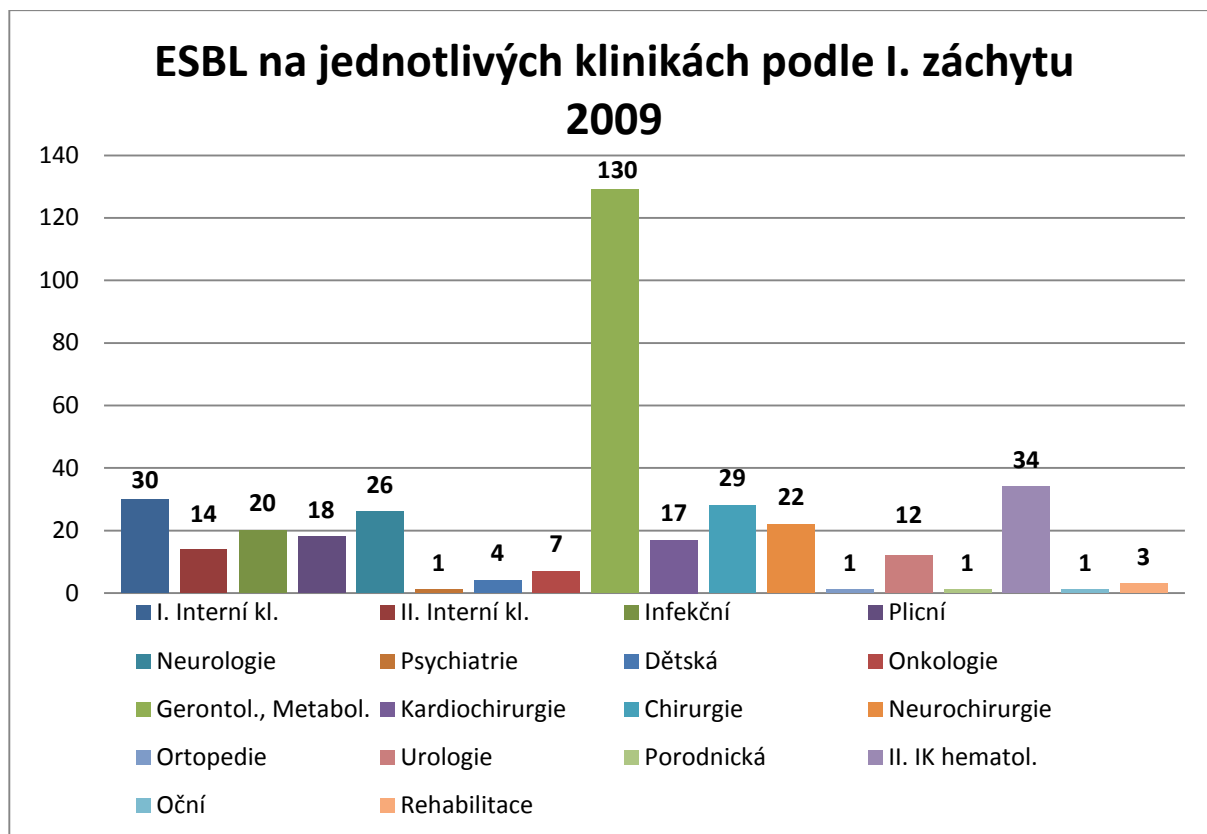
Graf 9 Zastoupení ESBL, AmpC a non-ESBL *K. pneumoniae* pozitivních hemokultur v roce 2010. V roce 2010 bylo z celkového záchytu 68 *K. pneumoniae* 27 ESBL.

2.2 Výskyt *K. pneumoniae* ESBL na jednotlivých klinikách

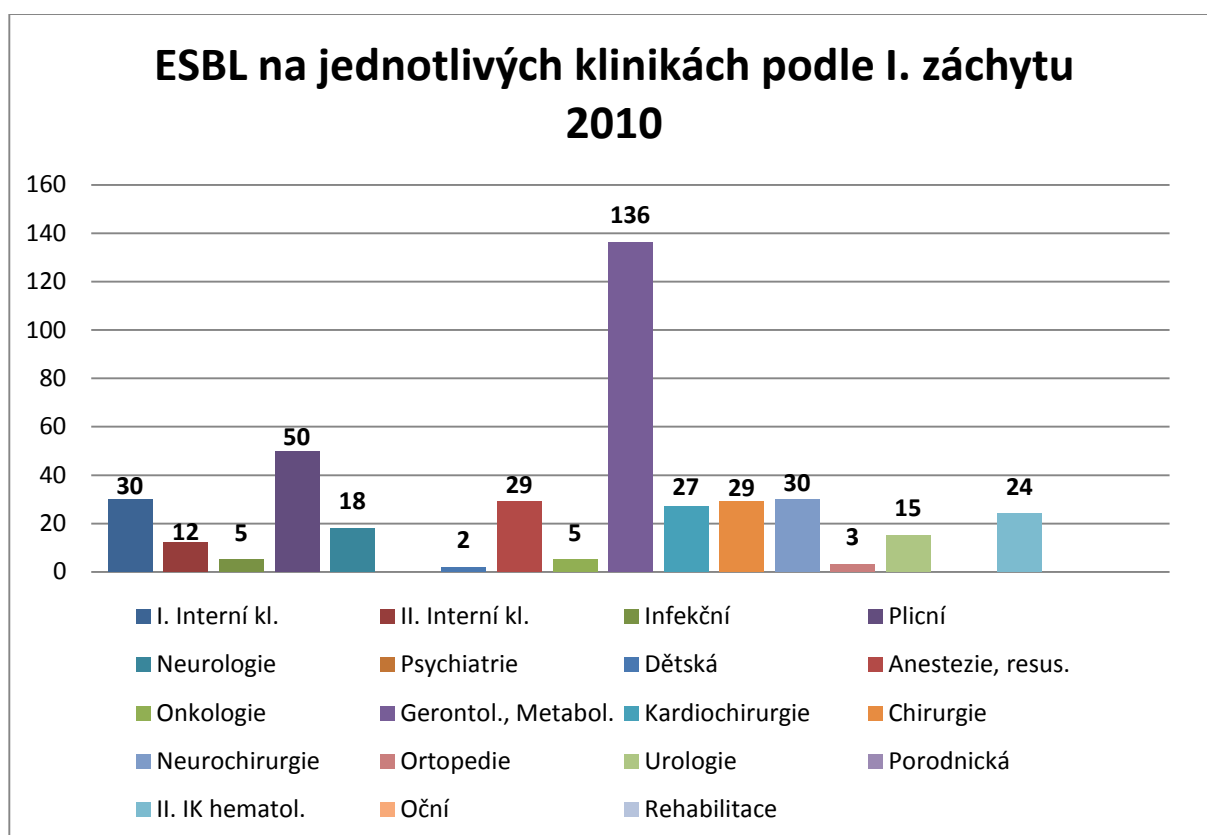
Výskyt *K. pneumoniae* ESBL na jednotlivých klinikách podle I. záchytu u pacienta v roce 2009 a 2010 je zobrazen v tab. 14 a grafech 10, 11. Nejvyšší počet pozitivních pacientů je zaznamenán na Klinice gerontologické a metabolické v obou sledovaných letech.

Tab. 14 Výskyt *K. pneumoniae* ESBL na jednotlivých klinikách podle I. záchytu u pacienta v roce 2009, 2010

Jednotlivé kliniky	Počet záchytů 2009	Počet záchytů 2010
I. Interní kl.	30	30
II. Interní kl.	14	12
Infekční	20	5
Plicní	18	50
Neurologie	26	18
Psychiatrie	1	0
Dětská	4	2
Anestezie, resusc., int. med.	18	29
Onkologie	7	5
Gerontol. a metabol.	130	136
Kardiochirurgie	17	27
Chirurgie	29	29
Neurochirurgie	22	30
Ortopedie	1	3
Urologie	12	15
Porodnická	1	0
II. IK hematologická	34	24
Oční	1	0
Rehabilitace	3	0



Graf 10 Výskyt *K. pneumoniae* ESBL na jednotlivých klinikách podle I. záchytu, 2009

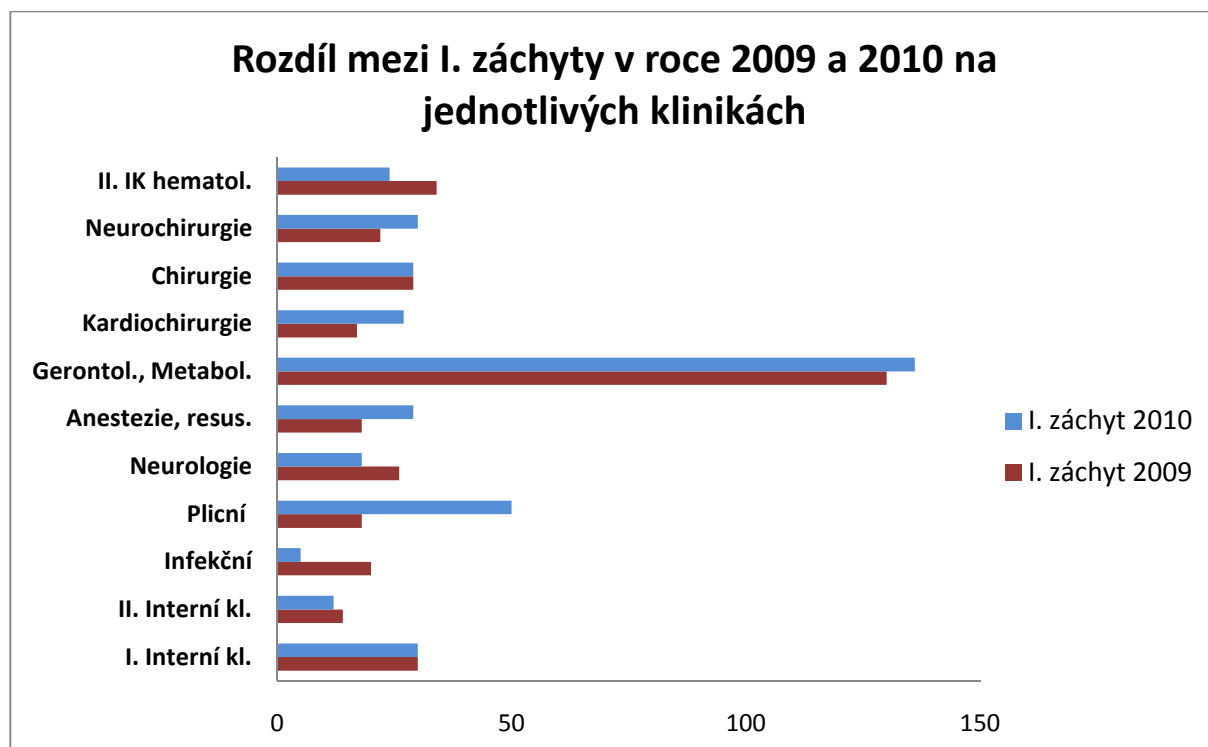


Graf 11 Výskyt *K. pneumoniae* ESBL na jednotlivých klinikách podle I. záchytu, 2010

V tab. 14 a grafu 12 je zobrazeno srovnání I. záchytu ESBL *K. pneumoniae* na jednotlivých klinikách v letech 2009 a 2010. Nejvyšší vzestup ESBL pozitivních pacientů je zaznamenán na Klinice plicní (vzestup o 32). Největší pokles ESBL pozitivních pacientů je zaznamenán na Klinice infekční (pokles o 15).

Tab. 15 Srovnání klinik s nejvyššími počty I. záchytu v letech 2009-2010 (vzestup pozitivních pacientů zvýrazněn červeně)

Kliniky	I. záchyt 2009	I. záchyt 2010	Rozdíl obou záchytů
I. Interní kl.	30	30	0
II. Interní kl.	14	12	-2
Infekční	20	5	-15
Plicní	18	50	+32
Neurologie	26	18	-8
Anestezie, resuscitace	18	29	+11
Gerontologie, Metabolická	130	136	+6
Kardiochirurgie	17	27	+10
Chirurgie	29	29	0
Neurochirurgie	22	30	+8
II. IK hematologická	34	24	-10



Graf 12 Srovnání mezi I. záchyty *K. pneumoniae* ESBL v roce 2009 a 2010 na jednotlivých klinikách FN HK

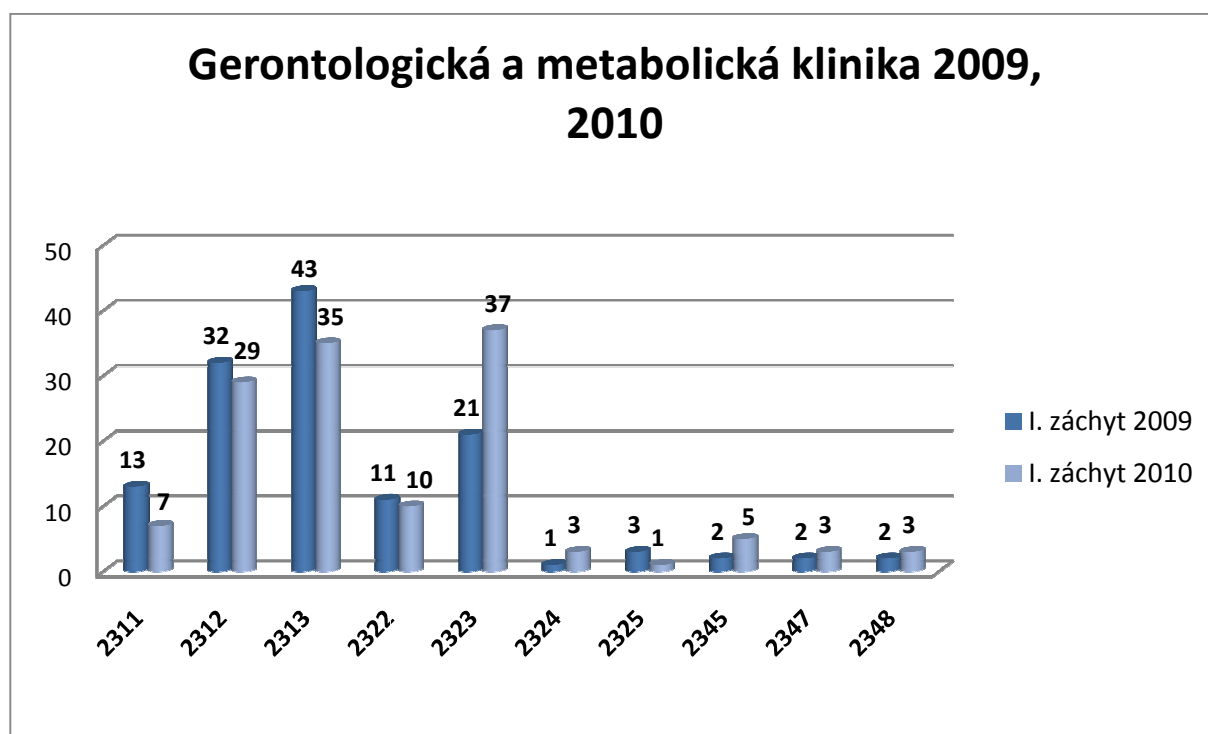
V obou sledovaných letech byl zaznamenán nejvyšší počet pozitivních pacientů na Klinice gerontologické a metabolické, a proto je vytvořen detailnější přehled I. záchytů na jednotlivých odděleních této kliniky (tab. 15 a graf 13).

Tab. 16 Počet pozitivních pacientů na jednotlivých odděleních Gerontologie a metabolické kliniky v roce 2009 a 2010 (I. záchyt)

Oddělení	I. záchyt 2009	I. záchyt 2010
2311 (JIP geriatrická)	13	7
2312 (JIP A)	32	29
2313 (JIP B)	43	35
2322 (odd. geriatrie)	11	10
2323 (lůžkové odd. A)	21	37
2324 (diabetol. odd.)	1	3
2325 (F odd.)	3	1
2345 (transpl. poradna)	2	5
2347 (dialýza)	2	3
2348 (nefrolog. poradna)	2	3

Celkem: 130

Celkem: 133



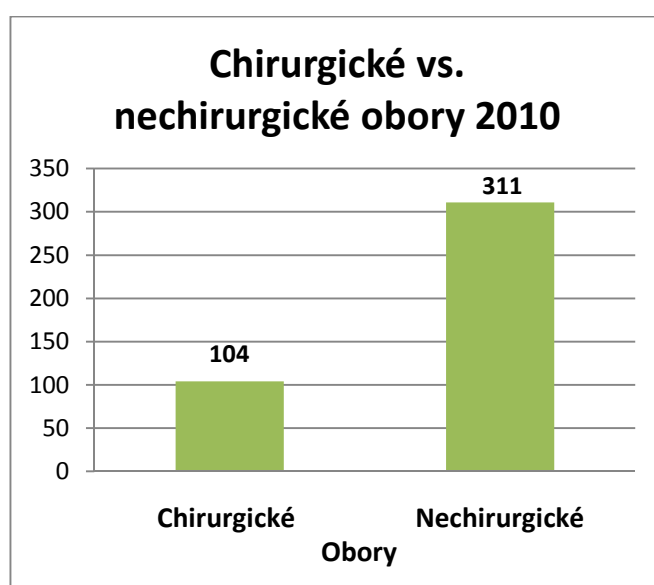
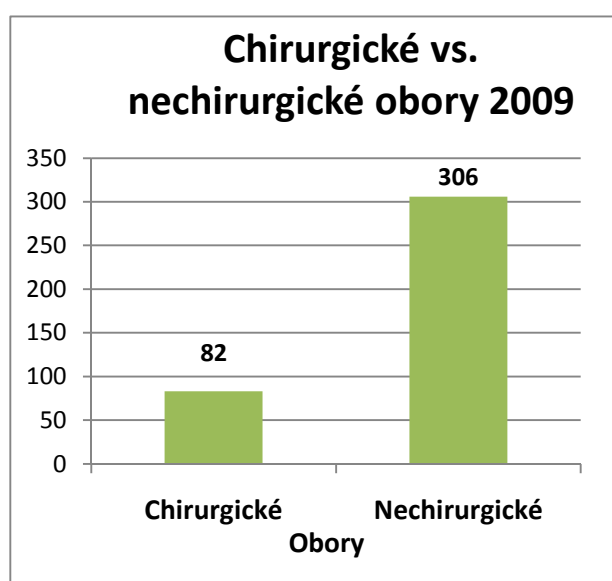
Graf 13 Počet ESBL pozitivních pacientů na jednotlivých odděleních Gerontologické a metabolické kliniky v roce 2009 a 2010 (I. záchyt)

2.3 Záchyt ESBL *K. pneumoniae* v chirurgických a nechirurgických oborech

Výskyt *K. pneumoniae* ESBL v chirurgických a nechirurgických oborech podle I. záchytu u pacienta v roce 2009 a 2010 je zobrazen v tab. 16 a grafech 14 a 15. Vyšší zastoupení ESBL pozitivních pacientů je zaznamenán v nechirurgických oborech v obou sledovaných letech.

Tab. 17 Četnost výskytu ESBL na chirurgických a nechirurgických pracovištích, 2009 a 2010 (I. záchyt)

	Chirurgické	Nechirurgické	Celkem
2009	82	306	388
2010	104	311	415



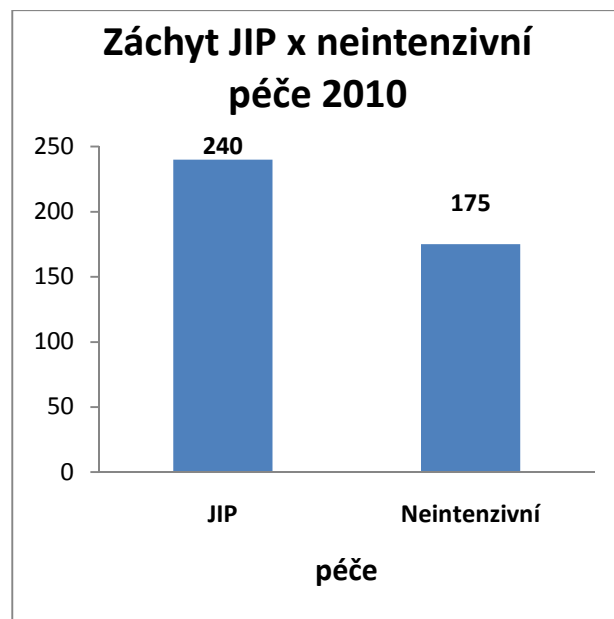
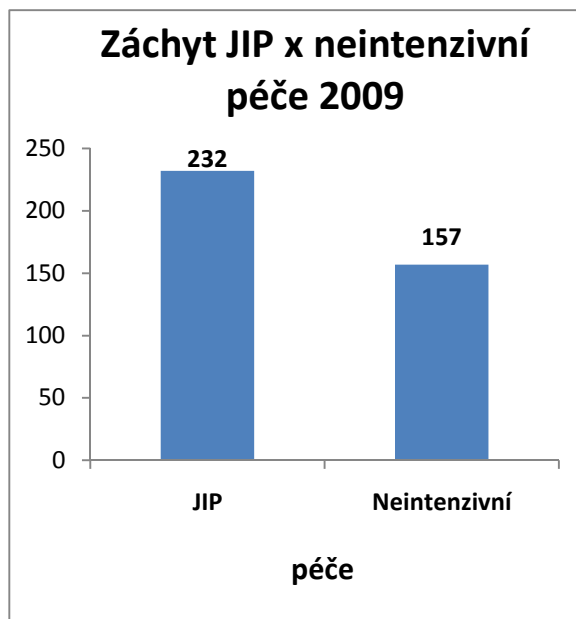
Graf 14 a 15 Četnost výskytu ESBL na chirurgických a nechirurgických pracovištích, 2009 a 2010 (I. záchyt)

2.4 Záchyt ESBL *K. pneumoniae* v intenzivní a standardní péči

Výskyt *K. pneumoniae* ESBL na pracovištích intenzivní a standardní péče podle I. záchytu u pacienta v roce 2009 a 2010 je zobrazen v tab. 17 a grafech 14 a 15. Vyšší zastoupení ESBL pozitivních pacientů je zaznamenán na pracovištích intenzivní péče v obou sledovaných letech.

Tab. 18 Četnost výskytu ESBL na JIP (jednotka intenzivní péče) a standardních pracovištích, 2009 a 2010 (I. záchyt)

	JIP	Neintenzivní péče	Celkem
2009	231	157	388
2010	240	175	415



Graf 16 a 17 Výskyt ESBL na JIP a na odděleních standardní péče 2009, 2010 (I. záchyt)

V roce 2009 bylo na jednotkách intenzivní péče hlášeno 232 ESBL-*K. pneumoniae* pozitivních pacientů a na odděleních neintenzivní péče 157 I. pozitivních záchytů.

V obou sledovaných letech byl zaznamenán nejvyšší počet pozitivních pacientů na odděleních s intenzivní péčí, a proto je vytvořen detailnější přehled I. záchytů na jednotlivých JIP FN HK (tab. 18 a grafu 18). Nejvyšší záchyt je sledován na JIP interní B (Kl. gerontologická a metabolická) v obou sledovaných letech.

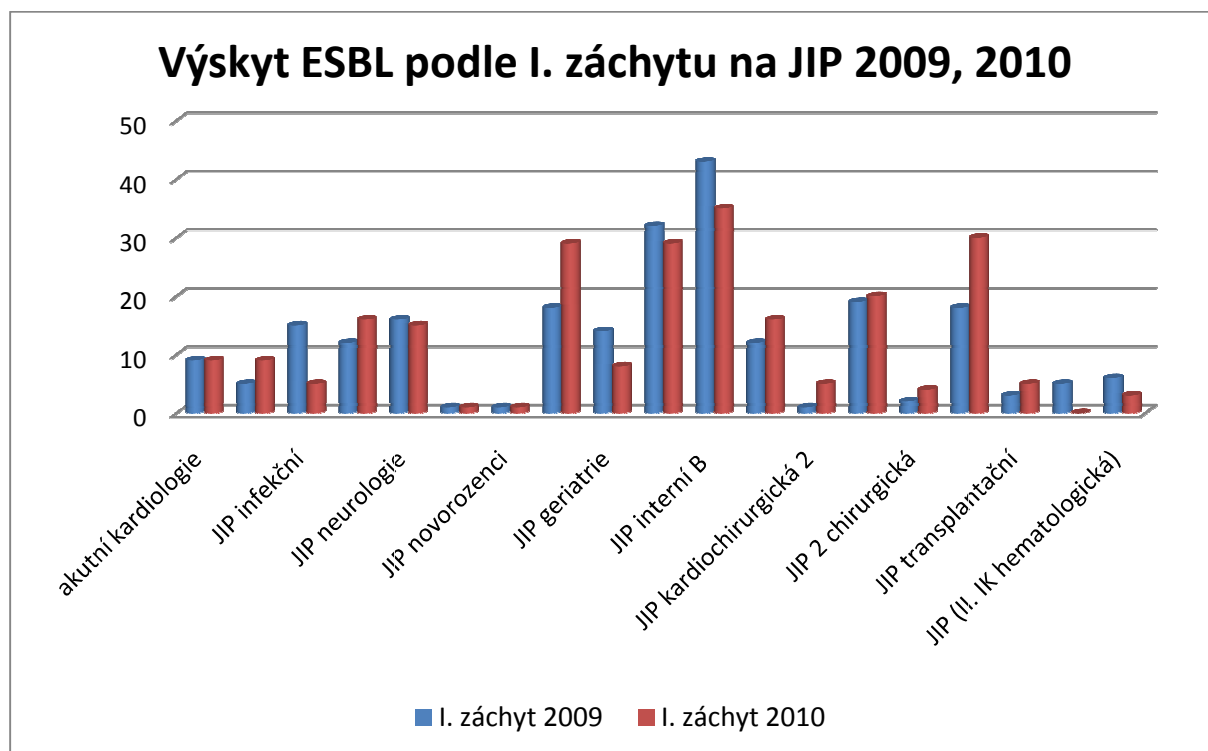
Tab. 19 Četnost výskytu ESBL pozitivních pacientů na jednotlivých JIP 2009 a 2010

Název oddělení	I. záchyt 2009	I. záchyt 2010
akutní kardiologie	9	9
koronární a arytmiologická jednotka	5	9
JIP infekční	15	5
JIP plicní	12	16
JIP neurologie	16	15
JIP větší děti	1	1
JIP novorozenci	1	1
KARIM (Kl. anesteziologie, resusc. a intenzivní medicíny)	18	29
JIP geriatrie	14	8
JIP interní A	32	29
JIP interní B	43	35
JIP kardiologická	12	16
JIP kardiologická 2	1	5
JIP 1 chirurgická	19	20

JIP 2 chirurgická	2	4
JIP neurochirurgická	18	30
JIP transplantační	3	5
Oddělení hematol. intenz. péče	5	0
JIP (II. IK hematologická)	6	3

Celkem: 232

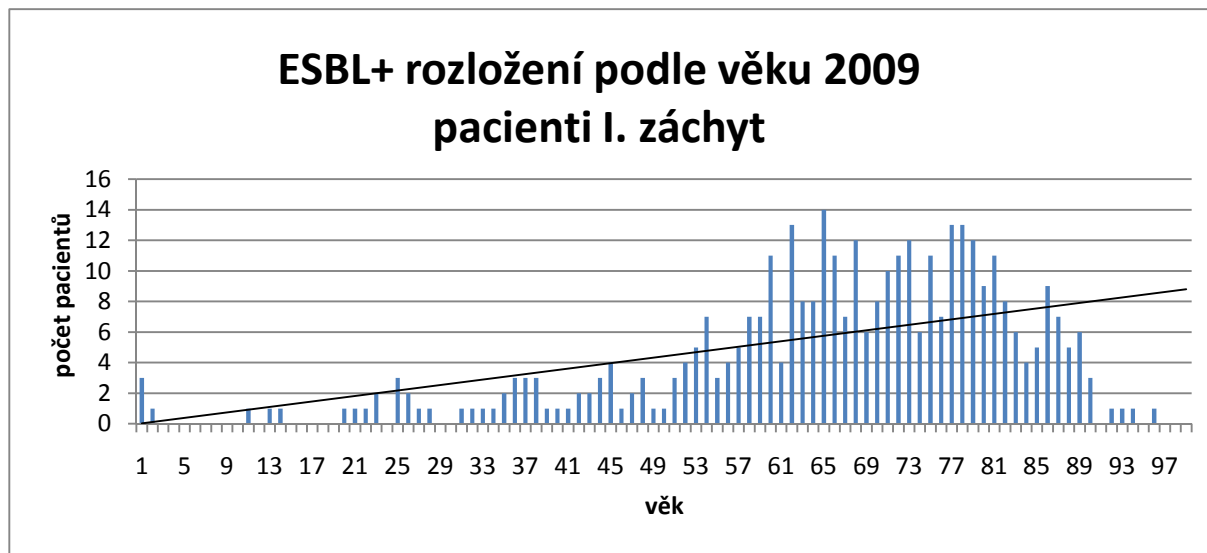
Celkem: 240



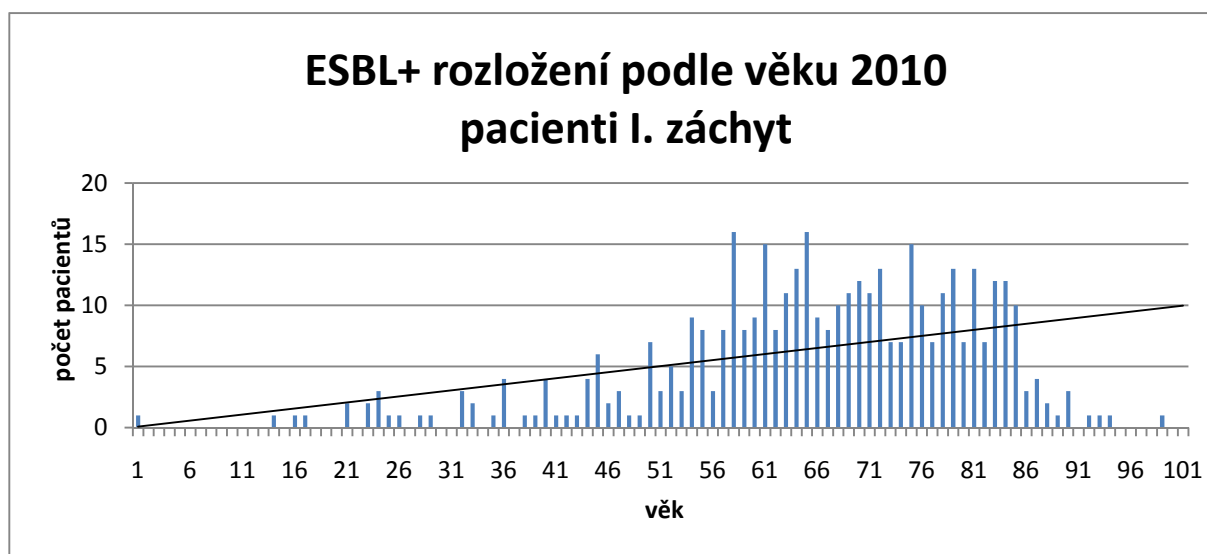
Graf 18 Výskyt ESBL pozitivních pacientů na jednotlivých odd. JIP (I. záchyt, 2009 a 2010)

2.5 Záchyt ESBL *K. pneumoniae* podle věku pacientů

Zobrazení záchytu *K. pneumoniae* ESBL ze všech klinických materiálů podle věku pacienta v roce 2009 a 2010 je v grafech 19 a 20. Vyšší zastoupení ESBL pozitivních pacientů je zaznamenán ve věkové kategorii 50 až 90 let.



Graf 19 Četnost pozitivivity I. záchytu ESBL podle věku pacientů v roce 2009



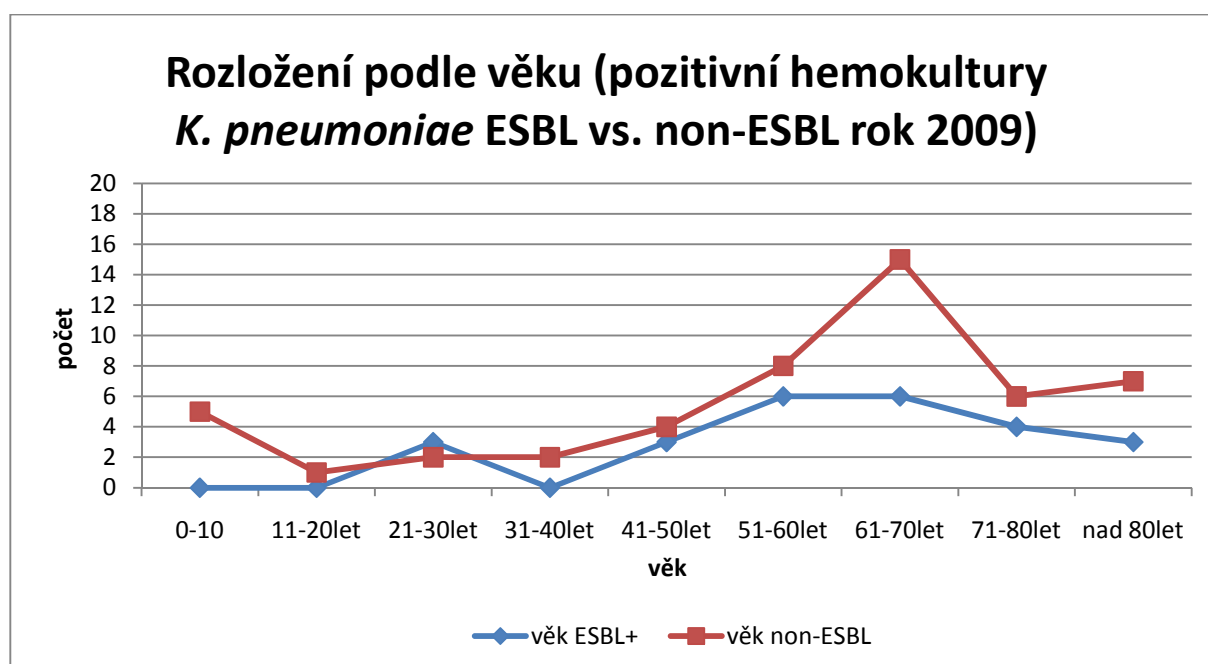
Graf 20 Četnost pozitivivity I. záchytu ESBL podle věku pacientů v roce 2009

Zobrazení záchytu *K. pneumoniae* ESBL z hemokultur podle věku pacienta v roce 2009 a 2010 je v tab. 19 a grafech 21 a 22. Nejvyšší zastoupení ESBL *K. pneumoniae* pozitivních hemokultur je zaznamenán ve věkové kategorii 61-70 let v obou letech. U non-ESBL *K. pneumoniae* pozitivních hemokultur je nejvyšší zastoupení ve věkové kategorii 61-70 let v roce 2009 a v kategorii 71-80 let v roce 2010.

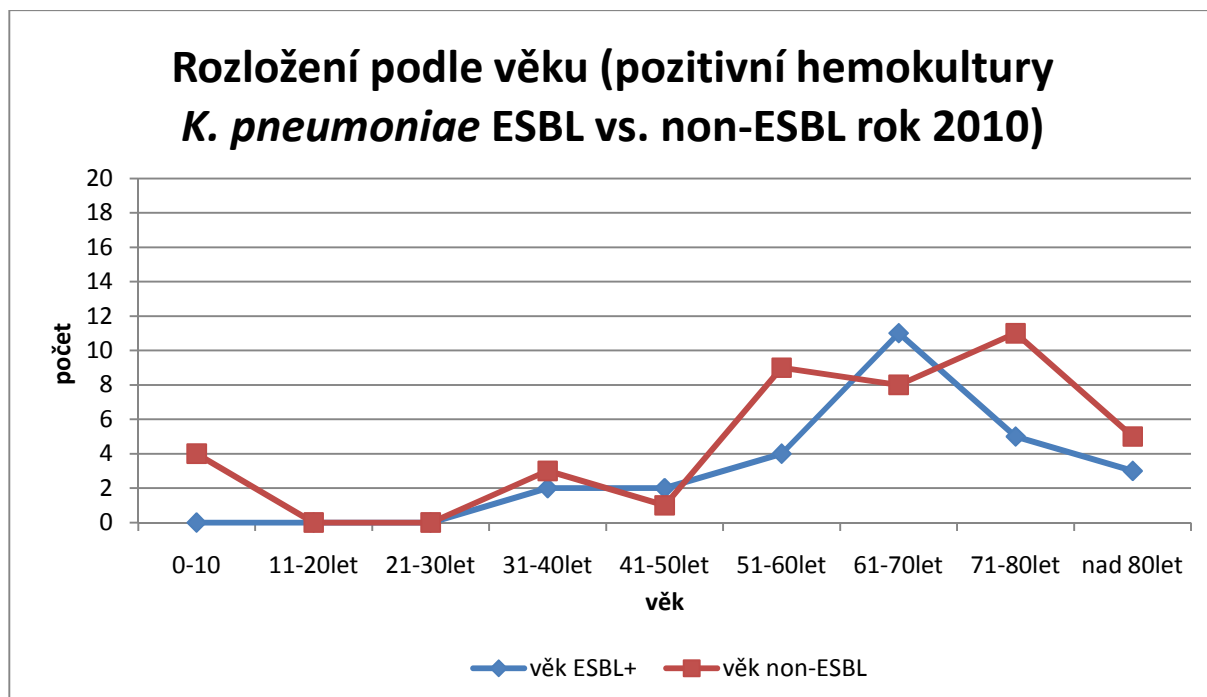
Tab. 20 Počet ESBL a non-ESBL hemokultur podle věku pacientů, 2009 a 2010

	hemokultury 2009								
	0-10 let	11-20 let	21-30 let	31-40 let	41-50 let	51-60 let	61-70 let	71-80 let	> 80 let
ESBL+	0	0	3	0	3	6	6	4	3
non-ESBL	5	1	2	2	4	8	15	6	7

	hemokultury 2010								
	0-10 let	11-20 let	21-30 let	31-40 let	41-50 let	51-60 let	61-70 let	71-80 let	> 80 let
ESBL+	0	0	0	2	2	4	11	5	3
non-ESBL	4	0	0	3	1	9	8	11	5



Graf 21 ESBL a non-ESBL hemokultury podle věku pacientů (2009)



Graf 22 ESBL a non-ESBL hemokultury podle věku pacientů (2010)

2.6 Záchyt ESBL *K. pneumoniae* v časové ose

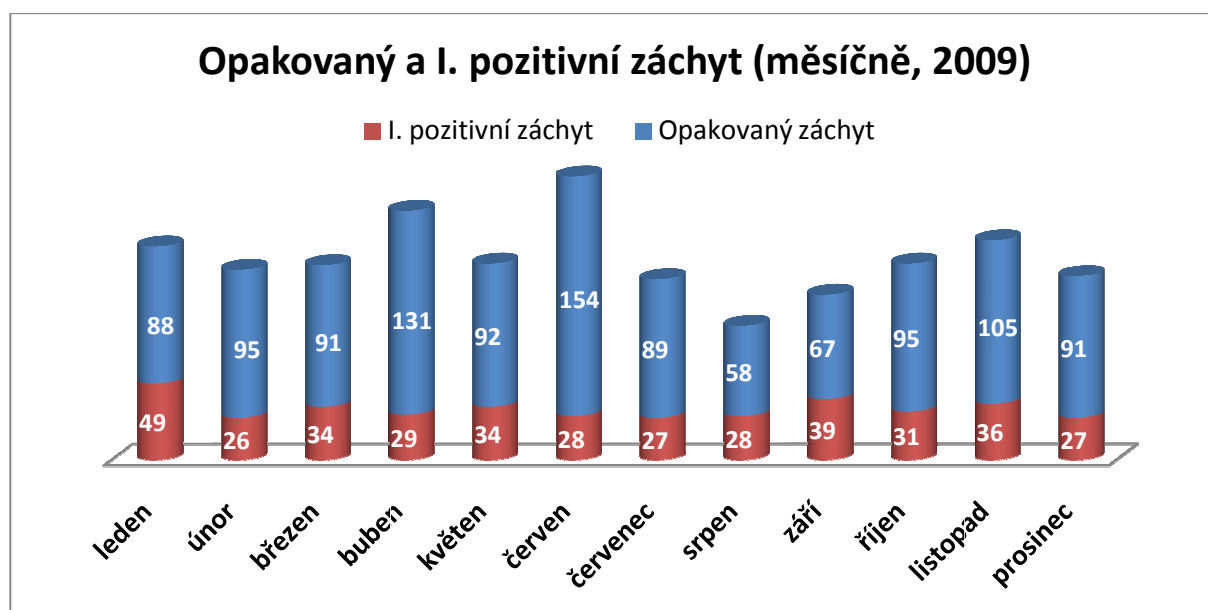
První a opakovaný záchyt *K. pneumoniae* ESBL ze všech materiálů v jednotlivých měsících roků 2009 a 2010 je zobrazen v tab. 20 a 21 a grafech 23, 24. Nejvyšší I. záchyt ESBL *K. pneumoniae* je zaznamenán v lednu obou let a nejnižší v prosinci obou let.

Tab. 21 Četnost výskytu ESBL v jednotlivých měsících, 2009 (celkově, I. a opakovaný záchyt)

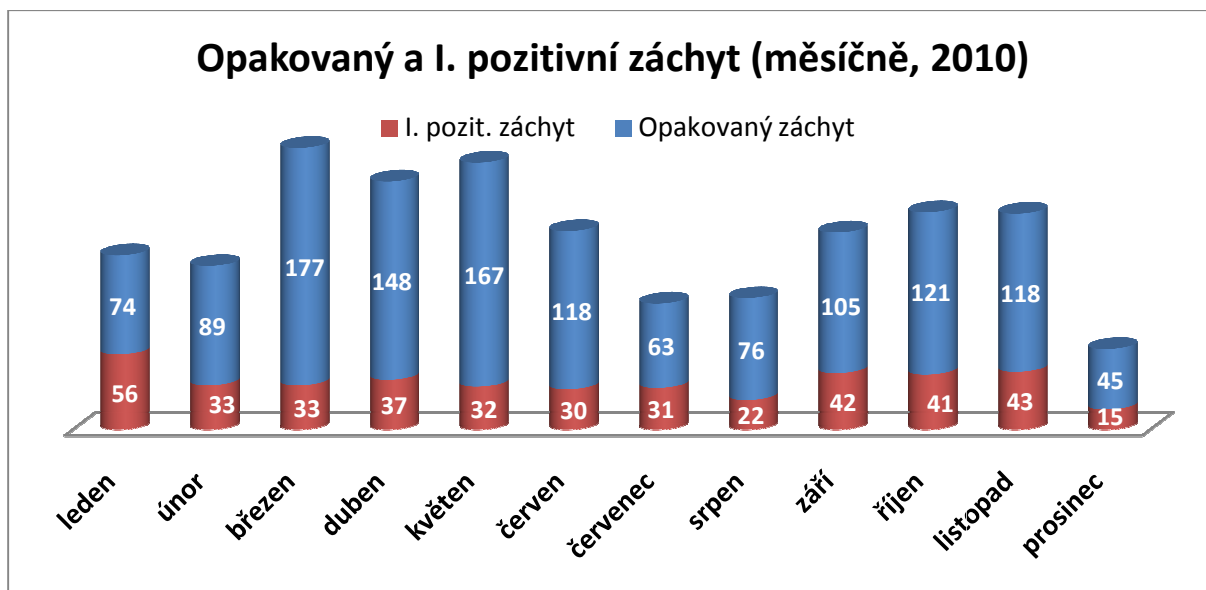
Měsíce	Celkem	I. pozit. záchyt	Opakovaný záchyt
leden	137	49	88
únor	122	26	95
březen	125	34	91
duben	160	29	131
květen	126	34	92
červen	182	28	154
červenec	116	27	89
srpen	86	28	58
září	106	39	67
říjen	126	31	95
listopad	141	36	105
prosinec	118	27	91
	1545	388	1156

Tab. 22 Četnost výskytu ESBL v jednotlivých měsících, 2010 (celkově, I. a opakovaný záchyt)

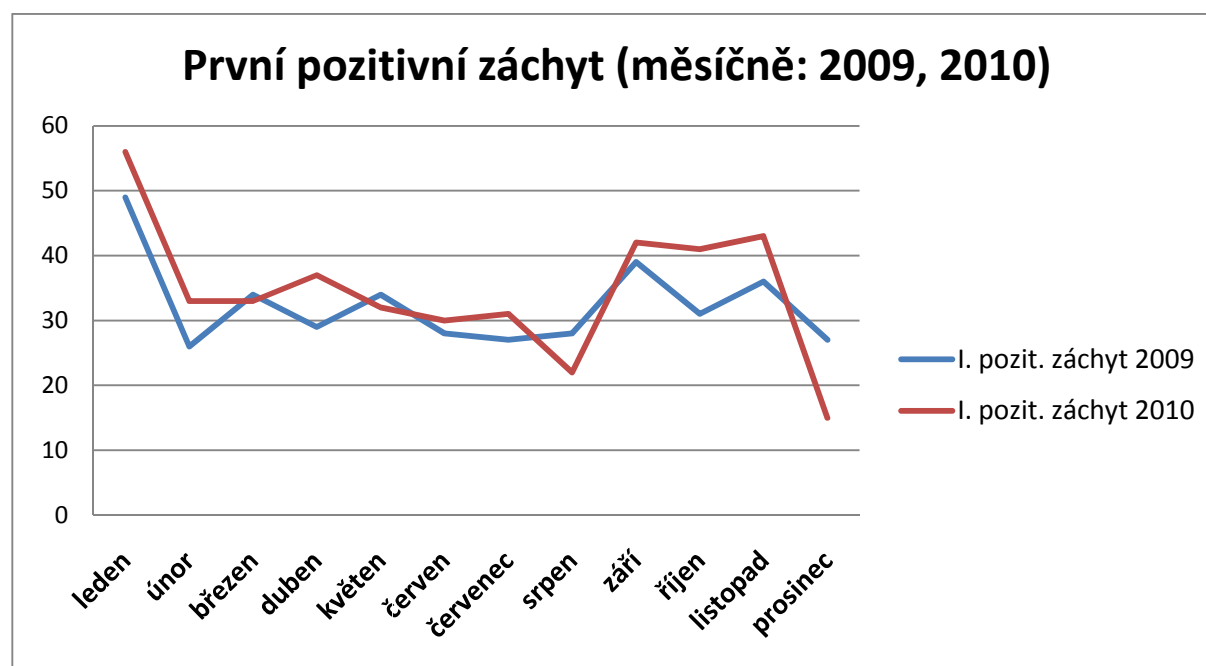
Měsíce	Celkem	I. pozit. záchyt	Opakovaný záchyt
leden	130	56	74
únor	122	33	89
březen	210	33	177
duben	185	37	148
květen	199	32	167
červen	148	30	118
červenec	94	31	63
srpen	98	22	76
září	147	42	105
říjen	162	41	121
listopad	161	43	118
prosinec	60	15	45
	1716	415	1301



Graf 23 Srovnání ESBL pozitivit podle I. a opakovaných záchytů v jednotlivých měsících, rok 2009



Graf 24 Srovnání ESBL pozitivit podle I. a opakovaných záchytů v jednotlivých měsících, rok 2010

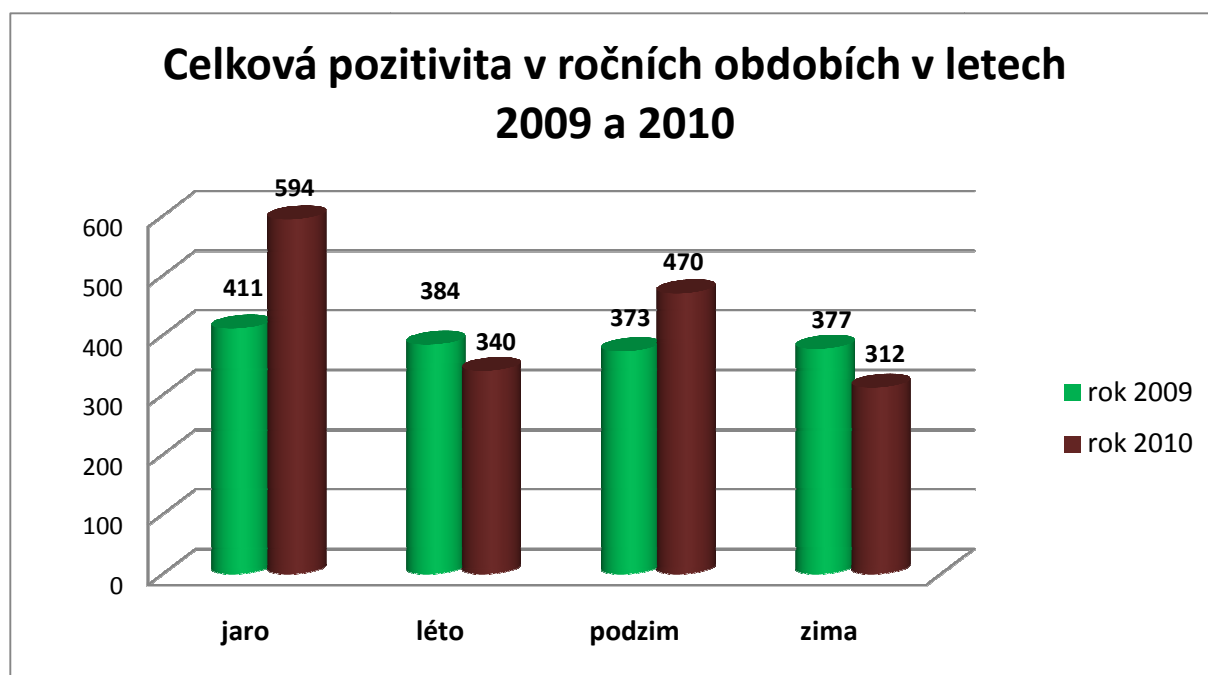


Graf 25 Srovnání prvního pozitivního ESBL záchytu v jednotlivých měsících v letech 2009, 2010

Celkový záchyt *K. pneumoniae* ESBL ze všech materiálů v jednotlivých ročních obdobích roků 2009 a 2010 je zobrazen v tab. 22 a grafu 26. Nejvyšší celkový záchyt ESBL *K. pneumoniae* je zaznamenán na jaře roku 2010 (n=594).

Tab. 23 ESBL celkový záchyt v závislosti na ročním období, rok 2009 a 2010

	Období			
	jaro	léto	podzim	zima
2009	411	384	373	377
2010	594	340	470	312



Graf 26 ESBL celkový záchyt v závislosti na ročním období, rok 2009 a 2010

IX. DISKUZE

Výskyt multirezistentních klebsiel v klinickém materiálu je v posledních letech velmi aktuální. Výsledky prvních studií jsou datovány již od 90.- tých let 20. století. Rok 2009 a 2010 byl vybrán s ohledem na nový laboratorní informační systém, který umožňoval statistické zpracování dat a byl v provozu od roku 2008. Ačkoli výskyt komunitních infekcí ESBL *K. pneumoniae* je aktuálním tématem, moje práce byla zaměřená pouze na nozokomiální výskyt, a proto materiály od pacientů praktických lékařů nebyly zařazeny do studie.

Celkový výskyt ESBL *K. pneumoniae* v klinických materiálech je obtížně srovnatelný se světovými studiiemi pro rozdílnou metodiku práce. Studie EARSS koordinována ECDC (Evropské centrum pro prevenci a kontrolu infekčních onemocnění) je zaměřená pouze na invazivní infekce. Do sběru dat EARSS jsou zařazovány pouze klinické kmeny izolované z hemokultur a rezistence *K. pneumoniae* v ČR je sledována od roku 2005. Výskyt širokospektrých beta-laktamáz je v tomto programu zastoupen rezistencí k cefalosporinům III. generace. Od roku 2005, kdy byl výskyt rezistentních kmenů v ČR 32,4%, každoročně docházelo k navýšení o další procenta. Výskyt *K. pneumoniae* rezistentních k cefalosporinům III. generace v hemokultivacích (z velké části reprezentovaných produkcí ESBL nebo AmpC beta-laktamázy) v roce 2009 byl 46 %, což je nižší než procento udávané EARSS v ČR v roce 2009 (52,1 %). Výrazný 17% vzestup v roce 2010 (57 %) ve FN HK odpovídá vzrůstajícímu trendu výskytu kmenů rezistentních k cefalosporinům III. generace v hemokultivacích. Tuto vzrůstající tendenci sleduje i celkový výskyt pozitivních materiálů ESBL *K. pneumoniae* (1545 v roce 2009, 1716 v roce 2010).

V roce 1999 Tenover et al. publikoval, že i přes obrovské riziko, které sebou přináší ESBL, si mnoho klinických mikrobiologických laboratoří „nedělá hlavu“ s detekcí gram-negativních bakterií, nebo ji provádějí neefektivně (Tenover et al., 1999). Od této doby se mnohé změnilo, metodika detekce ESBL prošla rozsáhlým vývojem a stále se inovuje. Test detekce ESBL DDST, který byl použit i v době sběru mých dat, je v současné době nejčastější screeningovou metodou využívanou v rutinní mikrobiologické praxi. Při pochybnostech je test potvrzován diluční metodou nebo diskovou metodou s kombinací cefalosporin/klavulanát.

Nejčastěji pozitivním materiálem je moč (33-38 %) a vzorky z dolních dýchacích cest (23-27 %), což odpovídá výsledku multicentrické studie Koláře et al. z roku 2004 (Kolář et

al., 2005), která udává, že nejčastějšími infekcemi vyvolanými ESBL pozitivními kmeny byly bronchopneumonie (30 %) a infekce močových cest (29 %). Mírný rozdíl výsledků je pravděpodobně způsoben metodikou mé práce, která neodlišuje kolonizaci a infekci, a v souboru jsou zařazeny všechny izolované kmeny. Nejčastěji opakovaně pozitivním materiálem je moč (396x v roce 2009 a 440x v roce 2010), což může mít souvislost s kolonizací zavedených permanentních močových katetrů nebo s opakovanými močovými infekcemi.

ESBL *K. pneumoniae* je ze všech klinik v rámci FN HK nejhojněji zastoupena na klinice Gerontologické a metabolické, která je oddělením interního lékařství. Tento stav je pravděpodobně způsoben skladbou pacientů hospitalizovaných na tomto oddělení (starší pacienti vyžadující dlouhodobou hospitalizaci, chronická onemocnění s přidruženými komplikacemi, časté močové katetry, chronické rány- dekubity, bércové vředy). Při bližší specifikaci této kliniky bylo odhaleno, že nejvyšší podíl ESBL I. záchytů *K. pneumoniae* byl na jednotkách intenzivní péče (JIP A a B), ale i na standardním lůžkovém oddělení A. K vysvětlení by bylo potřeba podrobnější analýzy chodu tohoto oddělení.

V menší míře je pozorován záchyt na klinikách Kardiochirurgie, Chirurgie, Neurochirurgie, což je pravděpodobně způsobeno výskytem na JIP těchto klinik. Nejvyšší vzestup výskytu (z 18 na 50) ESBL pozitivních pacientů byl zaznamenán na Klinice plicní a byl způsoben outbreakem ESBL infekcí na podzim roku 2010 s pravděpodobným nozokomiálním přenosem kmenů.

Ačkoliv výskyt na II. Interní klinice hematologické nebyl nejvyšší (24- 34 I. záchytů), je každý záchyt od těchto pacientů vzhledem k jejich imunopresi alarmující a velmi často právě kolonizace může vést k infekci.

ESBL infekce nejsou tak výrazným problémem chirurgických oborů, protože až trojnásobná ESBL pozitivita je pozorována v nechirurgických oborech. Výsledek je způsoben vyšším poměrným zastoupením nechirurgických lůžek ve FN HK, vysokou pozitivitou na klinikách: Gerontologické a metabolické, Plicní, KARIM, II. Interní klinice hematologické, které jsou spojeny dlouhodobou péčí nebo výskytem na odděleních JIP.

Vyšší zastoupení ESBL pozitivních pacientů je zaznamenán na pracovištích intenzivní péče v obou sledovaných letech, což odpovídá studiím Pena et al. (z roku 1998) a Koláře et al. (z roku 2004). Ve srovnání s rokem 2009 nejsou v roce 2010 pozorovány velké rozdíly ve výskytu (JIP 232 na 240, standardní péče 157 na 175). Vyšší ESBL pozitivita na JIP je pravděpodobně spojena se skladbou pacientů, kteří jsou kriticky nemocní v ohrožení života. Tito pacienti jsou velmi často pro svůj zdravotní stav a sníženou obranyschopnost nejdříve

kolonizování a poté infikování ESBL *K. pneumoniae*. Častým rizikovým faktorem je také použití umělé plicní ventilace a invazivních terapeutických prostředků (centrální venózní katetry, močové cévky, hrudní dreny, intrakraniální čidla atd.). U kriticky nemocných pacientů jsou také používána rezervní antibiotika, která způsobují vyšší selekci multirezistentních kmenů..

Dalším rizikovým faktorem je vyšší věk pacientů, což bylo potvrzeno i v mém souboru. Nejvyšší zastoupení ESBL pozitivních pacientů bylo zaznamenáno ve věkové kategorii 50 až 90 let. Také v souboru pacientů s invazivní infekcí byl nejčastější záchyt ESBL *K. pneumoniae* pozitivních hemokultur sledován ve věkové kategorii 61-70 let v obou letech.

Nejvíce I. záchytů ESBL *K. pneumoniae* bylo hlášeno v lednu obou let a trvalejší vzestup v podzimních měsících obou let. To by mohlo naznačovat souvislost s nízkou obložeností oddělení v měsících, kdy probíhají dovolené (prosinec, letní měsíce).

Hlavním opatřením proti vzniku a šíření ESBL je vytvoření jasných interních postupů v péči o pacienty kolonizované nebo infikované multirezistentními kmeny. Povinností zdravotnických zaměstnanců by mělo být dodržování předepsaných pokynů, ať už v rámci prevence, nebo již ve vzniklém ohnisku infekce. Tyto pokyny by měly být specifikovány vzhledem k charakteristikám přenosu ESBL *K. pneumoniae* (časté střevní nosičství, kolonizace močových cévek a horních cest dýchacích).

Střevní nosičství je způsobeno selekčním tlakem antibiotik způsobujícím rozvrat normální lidské intestinální flóry, což umožní klebsiele adherovat na střevní epitelie a dlouhodobě je kolonizovat (Di Martino et al., 1997). Existuje tedy riziko přenosu při kontaktu s výměšky pacientů. V literatuře jsou popisována též ohniska infekcí s přenosem přes bronchoskopy, ultrazvuky, tlakové manžety, infuzní roztoky a umyvadla (Paterson, 2005).

X. Závěr

Infekce *Klebsiellou pneumoniae* jsou celosvětově diskutovaným problémem z hlediska diagnostiky, terapie i prevence přenosu. Výskyt multirezistentních kmenů je spojen s nadužíváním antibiotik. Proto by přísná indikace zvláště rezervních antibiotik a dodržování správné antibiotické praxe mělo být prvním krokem v boji proti infekcím způsobeným multirezistentními kmeny. Ustavení Národního programu antibiotické politiky v roce 2009, který koordinuje práci antibiotických středisek v celé ČR a propaguje zásady správné antibiotické politiky, je důležitým krokem v prevenci šíření ESBL kmenů.

XI. Seznam tabulek, grafiky, zkratk a literatury

Seznam obrázků, tabulek a grafů

- Obr. 1** Kultivace *K. pneumoniae* (Krevní agar), str. 8
- Obr. 2** Hydrolýza serinovou beta-laktamázou, str. 13
- Obr. 3** Přenos rezistence pomocí konjugace, str. 13
- Obr. 4** Vznik SHV-ESBL variant z SHV-1, str. 17
- Obr. 5** Diskový difúzní test, str. 22
- Obr. 6** Běžný mikrodiluční test, str. 23
- Obr. 7** DDST ESBL+ , str. 25
- Obr. 8** E-test kmene produkujícího ESBL, str. 26
- Obr. 9** DNA mikročipy, str. 29
- Obr. 10** Stupeň rozšíření izolátů *K. pneumoniae*, rezistentní k III. generaci cefalosporinů v roce 2009, str. 32
-
- Tab. 1** Klasifikační schéma dle Bushe-Jacobyho-Medeirose, str. 15
- Tab. 2** Charakteristika SHV-typů beta-laktamáz, str. 18
- Tab. 3** Přehled break-pointů pro cefotaxim a ceftazidim, str. 20-21
- Tab. 4** Přehled zařazených materiálů podle systémů, str. 38
- Tab. 5** Rozdělení klinik ve FN HK, str. 39
- Tab. 6** Rozdělení chirurgické vs. nechirurgické obory ve FN HK, str. 39
- Tab. 7** Zařazení oddělení do intenzivní péče ve FN HK, str. 40
- Tab. 8** Počet pozitivního materiálu celkově, 2009 a 2010, str. 40
- Tab. 9** Výskyt ESBL pozitivního materiálu podle I. záchyty (2009 a 2010), str. 42
- Tab. 10** Pozitivní materiál 2009 (celkově, I. záchyt, opakovaně), str. 43
- Tab. 11** Pozitivní materiál 2010 (celkově, I. záchyt, opakovaně), str. 43
- Tab. 12** Srovnání roku 2009 a 2010 ve výskytu ESBL pozitivního materiálu podle I. záchyty, str. 45
- Tab. 13** Pozitivní záchyt ESBL, AmpC a non-ESBL *K. pneumoniae* z hemokultur v letech 2009 a 2010, str. 46
- Tab. 14** Výskyt *K. pneumoniae* ESBL na jednotlivých klinikách podle I. záchyty u pacienta v roce 2009, 2010, str. 47
- Tab. 15** Srovnání klinik s nejvyššími počty I. záchyty v letech 2009-2010, str. 49

Tab. 16 Počet pozitivních pacientů na jednotlivých odděleních Gerontologie a metabolické kliniky v roce 2009 a 2010 (I. záchyt), str. 50

Tab. 17 Četnost výskytu ESBL na chirurgických a nechirurgických pracovištích, 2009 a 2010 (I. záchyt), str. 51

Tab. 18 Četnost výskytu ESBL na JIP (jednotka intenzivní péče) a standardních pracovištích, 2009 a 2010 (I. záchyt), str. 52-53

Tab. 19 Četnost výskytu ESBL pozitivních pacientů na jednotlivých JIP 2009 a 2010, str. 53

Tab. 20 Počet ESBL a non-ESBL hemokultur podle věku pacientů, 2009 a 2010, str. 55

Tab. 21 Četnost výskytu ESBL v jednotlivých měsících, 2009 (celkově, I. a opakovaný záchyt), str. 56

Tab. 22 Četnost výskytu ESBL v jednotlivých měsících, 2010 (celkově, I. a opakovaný záchyt), str. 57

Tab. 23 ESBL celkový záchyt v závislosti na ročním období, rok 2009 a 2010, str. 59

Graf 1 Procentuální ESBL pozitivita jednotlivých materiálů 2009 (n=1545), str. 41

Graf 2 Procentuální ESBL pozitivita jednotlivých materiálů 2010 (n=1716), str. 41

Graf 3 Procentuální ESBL pozitivita jednotlivých materiálů, 2009 (I. pozit. záchyt, n= 388), str. 42

Graf 4 Procentuální pozitivita jednotlivých materiálů, 2010 (I. pozit. záchyt, 415), str. 43

Graf 5 Pozitivní materiál 2009 (celkově, I. záchyt), str. 44

Graf 6 Pozitivní materiál 2010 (celkově, I. záchyt), str. 44

Graf 7 Srovnání roku 2009 a 2010 ve výskytu ESBL pozitivního materiálu podle I., str. 45

Graf 8 Zastoupení ESBL, AmpC a non-ESBL *K. pneumoniae* pozitivních hemokultur v roce 2009, str. 46

Graf 9 Zastoupení ESBL, AmpC a non-ESBL *K. pneumoniae* pozitivních hemokultur v roce 2010, str. 46

Graf 10 Výskyt *K. pneumoniae* ESBL na jednotlivých klinikách podle I. záchytu, 2009, str. 48

Graf 11 Výskyt *K. pneumoniae* ESBL na jednotlivých klinikách podle I. záchytu, 2010, str. 48

Graf 12 Srovnání mezi I. záchyty *K. pneumoniae* ESBL v roce 2009 a 2010 na jednotlivých klinikách FN HK, str. 49

Graf 13 Počet ESBL pozitivních pacientů na jednotlivých odděleních Gerontologické a metabolické kliniky v roce 2009 a 2010 (I. záchyt), str. 50

Graf 14 a 15 Četnost výskytu ESBL na chirurgických a nechirurgických pracovištích, 2009 a 2010 (I. záchyt), str. 51

Graf 16 a 17 Výskyt ESBL na JIP a na odděleních standardní péče 2009, 2010 (I. záchyt), str. 52

Graf 18 Výskyt ESBL pozitivních pacientů na jednotlivých odd. JIP (I. záchyt, 2009 a 2010), str. 53

Graf 19 Četnost pozitivivity I. záchytu ESBL podle věku pacientů v roce 2009, str. 54

Graf 20 Četnost pozitivivity I. záchytu ESBL podle věku pacientů v roce 2009, str. 54

Graf 21 ESBL a non-ESBL hemokultury podle věku pacientů (2009), str. 55

Graf 22 ESBL a non-ESBL hemokultury podle věku pacientů (2010), str. 56

Graf 23 Srovnání ESBL pozitivit podle I. a opakovaných záchytů v jednotlivých měsících, rok 2009, str. 57

Graf 24 Srovnání ESBL pozitivit podle I. a opakovaných záchytů v jednotlivých měsících, rok 2010, str. 58

Graf 25 Srovnání prvního pozitivního ESBL záchytu v jednotlivých měsících v letech 2009, 2010, str. 58

Graf 26 ESBL celkový záchyt v závislosti na ročním období, rok 2009 a 2010, str. 59

Seznam zkratk a znaků

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute

c koncentrace

DCD Dolní cesty dýchací

DDT Diskový difuzní test

DDST Double disk synergy test

DNA Deoxy-ribonucleotid acid (ss DNA sigle strand, ds DNA double strand)

ELFO elektroforéza

HCD Horní cesty dýchací

IRS Inhibitor-rezistentní SHV beta-laktamáza

IRT Inhibitor-rezistentních TEM beta-laktamáza

JIP Jednotka intenzivní péče

kB kilo bajt

MIC minimální inhibiční koncentrace

mm milimetr

NAM N-acetylmuramidová kyselina

NAG N-acetylglukosamin
např. například
NNIS National Nosocomial Infection Surveillance
PCR Polymerázová řetězová reakce
LCR Ligase chain reaction
RFLP Restriction fragment length polymorphism, restrikční fragmenty délkového polymorfismu
SNP Single nucleotide polymorphism
spp. species (druh)
SSCP Single strand conformational polymorphism, jednořetězcový konformační polymorfismus

Seznam literatury

- Abinash Virk, M. D. and James M. Steckelberg, M. D.** 2000. Clinical Aspects of Antimicrobial Resistance. *Mayo Clin Proc.* 75, 200-214
- Antimicrobial resistance surveillance in Europe.** 2009. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)
- Asma M. Al-Jasser.** 2006. Extended spectrum beta-lactamases (ESBLs): A Global Problem. *Kuwait Medical Journal.* 38 (3), 171-185
- Ardanuy C., Linares J., Dominguez MA., Hernandez-Alles S., Benedi VJ., Martinez-Martinez L.** 1998. Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1636-1640
- Babini G. S. and Livermore D. M.** 2000. Are SHV β -Lactamases Universal in *Klebsiella pneumoniae*? *Antimicrob Agents Chemother.* 44, 2230
- Bell J. M., Turnidge J. D., Gales A. C., Pfaller M. A., Jones R. N.; Sentry APAC Study Group.** 2002. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-99). *42(3)*, 193-8
- Bonnet R.** 2004. Growing group of extended-spectrum betalactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 48, 1-14
- Bonomo R. A., S. A. Rudin and D. M. Shlaes.** 1997. Tazobactam is a potent inactivator of selected inhibitor-resistant class A β -lactamases. *FEMS Microbiol. Lett.* 148, 59–62

- Bush K., Jacoby G. A. and Medeiros A. A.** 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 39, 1211–1233
- Carpenter J. L.** 1990. *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev. Infect. Dis.* 12, 672-682
- Chromá M., Kolář M.** 2010. Genetetic methods for detection of antibiotic resistance: Focus on extended-spectrum b-lactamases. Department of Microbiology. Palacky University Olomouc. 154(4), 289-296
- Clinical Laboratory Standards Institute.** 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth information supplement. CLSI Document M-100-S-16, PA USA.
- Cormican M. G., Marshall S. A., Jones R. N.** 1996. Detection of extended - spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. *J Clin Microbiol.* 34, 1880-1889
- Coudron P. E.** 2005. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC b-lactamases in *Klebsiella* spp., *E. coli* and *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4163-4167
- D. L. Paterson and R. A. Bonomo.** 2005. Extended- Spectrum B- Lactamases: a Clinical Update. 18, 657-686
- Di Martino P., Cafferini N., Joly B., Darfeuille-Michaud A.** 2003. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pilli facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Res. Microbiol.* 154, 9-16
- Doc. MUDr. Milan Kolář.** 2007. *Interní medicína.* 5, 213-216
- Domenech-Sanchez A., Hernandez-Alles S., Martinez-Martinez L., Benedi V. J., Alberti S.** 1999. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: Its role in β -lactam antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 181, 2726-2732
- Du Bois S. K., M. S. Marriott and S. G. Amyes.** 1995. TEM- and SHV- derived extended-spectrum beta-lactamases: relationship between selection, structure and function. *J. Antimicrob. Chemother.* 35, 7–22
- ESBL Guideline.** November 2006; Review date November 2008 (Clinical Services Committee, Dr. TP Enevoldson), Liverpool Institute of Infectional Global Health
- František Hampl, Jitka Moravcová, Jana Čopíková, Lubomír Opletal, Oldřich Lapčík a Pavel Drašař.** 2009. Krása a rozmanitost struktur přírodních antibiotik. *Chem. listy.* 103, 15–27

- Flagas M. E., Karageorgopolous D. E.** 2009. Extended-spectrum b-lactamase-producing organism. *Journal of Hospital Infection.* 73, 345-354
- French G. L., Shannon K. P., Simmons N.** 1996. Hospital Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Resistant to Broad-Spectrum Cephalosporins and beta-Lactam-betaLactamase Inhibitor Combinations by Hyperproduction of SHV-5 beta-Lactamase. 34, 358-363
- Goffin C. and J. M. Ghuysen.** 1998. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1079–1093
- Haeggman S., Löfdahl S., Burman LG.** 1997. An allelic variant of the chromosomal gene for class A β -lactamase K2, specific for *Klebsiella pneumoniae*, is the ancestor of SHV-1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 2705-2709
- Hart C. A.** 1993. *Klebsiellae* and neonates. *J. Hosp. Infect.* 23, 83–86
- Hooper D. C.** 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat.* 2, 38–55
- Huletsky A., J. R. Knox and R. C. Levesque.** 1993. Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of 3rd-generation cephalosporins by SHV-type beta-lactamases probed by site directed mutagenesis and 3-dimensional modeling. *J. Biol. Chem.* 268, 3690–3697
- Chaibi E. B., D. Sirot, G. Paul and R. Labia.** 1999. Inhibitor-resistant TEM-b-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J. Antimicrob. Chemother.* 43, 447–458
- Jacoby G. A., and A. A. Medeiros.** 1991. More extended-spectrum betalactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 1697–1704
- Jacoby G. A. and P. Han.** 1996. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 34, 908–911
- Jarlier V., M. Nicolas, G. Fournier and A. Philippon.** 1988. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10, 867–878
- Jedličková Anna.** 2004. Antimikrobiální profylaxe. Maxdorf, Praha. 331 s.
- Karadenzili A., Mutlu B., Okay E., Kolayi F., Vahaboglu H.** 2001. Piperacillin with and without tazobactam against extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a rat thigh abscess model. *Chemotherapy.* 47, 292-296
- Kim J., and H. - J. Lee.** 2000. Rapid discriminatory detection of genes coding for SHV β -lactamases by ligase chain reaction. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1860–1864
- Kolář M., Látal T., Čermák P., Bartoníková N., Chmelařová E., Sauer P., Kesselová M. a výzkumná skupina** (Bazgerová E., Běbrová E., Bergerová T., Burgetová D., Dovalová M., Horová B., Jedličková A., Ježek P., Jirsa R., Lovečková Y., Nyč O., Puchálková B.,

- Rumlerová M., Smolíková M., Šťastná E.). 2005. Prevalence ESBL pozitivních kmenů *Klebsiella pneumoniae* v České republice a jejich molekulárně biologická analýza. *Klinická Mikrobiologie a Infekční Lékařství*. 11, 92-99
- Livermore D. M.** 1995. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 8, 557-584
- Ma L., Ishii Y., Ishiguro M., Matsuzawa H., Yamaguchi K.** 1998. Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A β -lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother.* 42, 1181-1186
- Mabilat C. and P. Courvalin.** 1990. Development of “oligotyping” for characterization and molecular epidemiology of TEM β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 2210–2216
- Manzoor Ahmed Thokar, Bashir Ahmed Fomda, Peer Maroof, Kaiser Ahmed, Deeba Bashir, G. Bashir.** 2010. Proliferation of extended spectrum β -lactamases (ESBL) producing Gram negative bacteria, diagnostic inputs and impact on selection of antimicrobial therapy. 4, 25- 31
- Martinez-Martinez L., Pascual A., Conejo MC., Garcia I., Joyanes P., Domenech-Sanchez A., Benedi VJ.** 2002. Energy-dependent accumulation of Norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum β -lactamase production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3926-3932.
- Marty L. and V. Jarlier.** 1998. Surveillance of multiresistant bacteria: justification, role of the laboratory, indicators, and recent French data. *Pathol. Biol. (Paris)*. 46, 217–226
- Massova I. and S. Mobashery.** 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1–17
- Medeiros A. A.** 1997. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* 24 Suppl. 1, S19–45
- M'Zali F. H., J. Heritage, D. M. Gascoyne-Binzi, A. M. Snelling and P. M. Hawkey.** 1998. PCR single strand conformational polymorphism can be used to detect the gene encoding SHV-7 extended-spectrum β -lactamase and to identify different SHV genes within the same strain. *J. Antimicrob. Chemother.* 41, 123–125
- National Nosocomial Infections Surveillance.** 2002. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 to June 2002, issued August 2002. *Am. J. Infect. Control.* 30, 458–475

- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15th informational supplement (M100–S15). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa
- Nordmann P, Nass T.** 1994. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 38, 104-114
- Oliver A., L. M. Weigel, J. K. Rasheed, J. E. McGowan Junior, P. Raney and F. C. Tenover.** 2002. Mechanisms of decreased susceptibility to cefpodoxime in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3829–3836
- Paterson D. L.** 1999. Beta lactamases inhibitors and new beta lactamases. *Current treatments options in infectious diseases.* 1, 85-87
- Paterson D. L., K. M. Hujer, A. M. Hujer, B. Yeiser, M. D. Bonomo, L. B. Rice and R. A. Bonomo.** 2003. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3554–3560
- Paterson D. L., Ko W. C., VonGottberg A. et al.** 2004. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis.* 39, 31-37
- Paterson D. L., Bonomo R. A.** 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a Clinical update. 18, 657-686
- Patricia A. Bradford.** 2001. Extended-Spectrum beta-lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat; 933-951
- Pena C., Pujol M., Ardanuy C. et al.** 1998. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 42, 53-58.
- Piroth L., Aube H., Doise J. M., Vincent - Martin M.** 1998. Spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: are beta-lactamase inhibitors of therapeutic value? *Clin Infect Dis.* 27-76
- Queenan A. M., B. Foleo, C. Gownley, E. Wira and K. Bush.** 2004. Effects of inoculum and beta-lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using National Committee for Clinical Laboratory Standards ESBL methodology. *J. Clin. Microbiol.* 42, 269–275

- Poir L., Nass T., Guibert M., Chaibi B., Labia R., Nordmann P.** 1999. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 43, 573-581
- Rodriguez-Bano J., Lopez-Cerero L., Navarro M. D., Diaz de Alba P., Pascual A.** 2008. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *E.coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemoter.* 62, 1142-1149
- Saier MH Jr.** 2000. Bacterial diversity and the evolution of differentiation. *AMS News.* 66, 337-343
- Sanders C. C., A. L. Barry, J. A. Washington, C. Shubert, E. S. Moland, M. M. Traczewski, C. Knapp and R. Mulder.** 1996. Detection of extended-spectrum- beta-lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* with Vitek ESBL test. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2997–3001
- Sirot D., C. Recule, E. B. Chaibi, L. Bret, J. Croize, C. Chanal-Claris, R. Labia and J. Sirot.** 1997. A complex mutant of TEM-1 beta-lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1322–1325
- Stapleton P., K. P. Shannon and G. L. French.** 1999. Construction and characterization of mutants of the TEM-1 β -lactamase containing amino acid substitutions associated with both extended-spectrum resistance and resistance to beta-lactamase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1881–1887
- Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P.** 2002. Biochemical analysis of the ceftazidime hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J Antimicrob Chemother.* 50, 1031-1034
- Prinarakis E. E., V. Miriagou, E. Tzelepi, M. Gazouli and L. S. Tzouvelekis.** 1997. Emergence of an inhibitor-resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 838–840
- Tenover F. C., M. J. Mohammed, T. S. Gorton and Z. F. Dembek.** 1999. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum betalactamases: survey of laboratories in Connecticut. *J. Clin. Microbiol.* 37, 4065–4070
- Thomson K. S. and C. C. Sanders.** 1992. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: Comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 1877–1882

- Toleman M. A., K. Rolston, R. N. Jones and T. R. Walsh.** 2003. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2859–2863
- Tzouvelekis L. S. and R. A. Bonomo.** 1999. SHV-type β -lactamases. *Curr. Pharm. Des.* 5, 847–864
- Tzouvelekis L. S., A. C. Vatopoulos, G. Katsanis and E. Tzelepi.** 1999. Rare case of failure by an automated system to detect extended-spectrum beta-lactamase in a cephalosporin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2388
- Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ.** 2000. CTX-M type beta-lactamases: an emerging group of extended spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents.* 14, 137-142
- Zapun A., C. Contreras-Martel and T. Vernet.** 2008. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 361–385