

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav mikrobiologie



**IDENTIFIKACE A TYPIZACE BAKTERIÍ S PRODUKČÍ
ŠIROKOSPEKTRÝCH BETA-LAKTAMÁZ**

Doktorská disertační práce

Olomouc 2012

Mgr. Vendula Husičková

Poděkování

Děkuji svému školiteli prof. MUDr. Milanu Kolářovi, Ph.D. za pomoc během doktorského studia, za ochotu, vstřícnost, odborné vedení a cenné rady při zpracování této práce.

Děkuji rovněž paní doc. MUDr. Dagmar Koukalové, CSc. za poskytnutí zázemí pro provedení experimentální části, stejně jako svým kolegům Ing. Magdaléně Chromé, Ph.D., Mgr. Kristýně Hricové, Mgr. Taťáně Štosové, Ph.D. a dalším, kteří se podíleli na realizaci této disertační práce.

Ráda bych touto cestou poděkovala také Bc. Pavlíně Husičkové a Ing. Vladimíru Pudovi za výraznou morální podporu.

Čestné prohlášení

Čestně prohlašuji, že jsem předloženou doktorskou disertační práci s názvem „Identifikace a typizace bakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz“ vypracovala samostatně. V předložené práci jsem použila jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne 11. 5. 2012

podpis

Studium a předložená disertační práce byly realizované za finanční podpory vnitřního grantu Univerzity Palackého LF_2012_006 a výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR MSM 6198959223.

OBSAH

1 ÚVOD	8
1.1 BAKTERIÁLNÍ REZISTENCE - VÁŽNÝ PROBLÉM SOUČASNÉ MEDICÍNY	8
1.2 MECHANISMY REZISTENCE BAKTERIÍ K ANTIMIKROBIÁLNÍM PŘÍPRAVKŮM	11
1.2.1 <i>Genetická podstata bakteriální rezistence</i>	11
1.2.1.1 Mutace	12
1.2.1.2 Horizontální přenos genů	13
1.2.2 <i>Biochemická podstata bakteriální rezistence</i>	13
1.2.2.1 Inaktivace antibiotika	14
1.2.2.2 Změna cílového místa.....	14
1.2.2.3 Snížený příjem antibiotika nebo jeho aktivní vyčerpávání z buňky	15
1.2.2.4 Nahrazení vyřazené metabolické dráhy jinou	16
1.3 BAKTERIÁLNÍ BETA-LAKTAMÁZY.....	16
1.3.1 <i>Klasifikace beta-laktamáz a jejich klinický význam</i>	16
1.3.2 <i>ESBL a AmpC</i>	19
1.3.2.1 Bakteriální beta-laktamázy typu ESBL	19
1.3.2.2 Bakteriální beta-laktamázy typu AmpC.....	20
1.3.3 <i>Společný výskyt genů kódujících beta-laktamázy ESBL a AmpC s dalšími geny rezistence</i>	22
2 CÍLE PRÁCE	25
3 MATERIÁL A METODY	26
3.1 NEJČASTĚJŠÍ BAKTERIÁLNÍ DRUHY S PRODUKČÍ ŠIROKOSPEKTRÝCH BETA-LAKTAMÁZ V KLINICKÉM MATERIÁLU HOSPITALIZOVANÝCH PACIENTŮ	26
3.1.1 <i>Sběr, izolace a identifikace bakterií</i>	26
3.1.1.1 ESBL-pozitivní enterobakterie z klinického materiálu hospitalizovaných pacientů	26
3.1.1.2 Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy z klinického materiálu novorozenců	26
3.1.1.3 Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy v gastrointestinálním traktu hospitalizovaných osob	27
3.1.2 <i>Fenotypová detekce produkce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL</i>	27
3.1.3 <i>Fenotypová detekce produkce širokospektrých beta-laktamáz typu AmpC</i>	28
3.2 NEJČASTĚJŠÍ BAKTERIÁLNÍ DRUHY S PRODUKČÍ ŠIROKOSPEKTRÝCH BETA-LAKTAMÁZ V NEMOCNIČNÍM PROSTŘEDÍ.....	29
3.2.1 <i>Sběr, izolace a identifikace bakterií</i>	29
3.2.2 <i>Fenotypová detekce produkce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL</i>	30
3.2.3 <i>Fenotypová detekce produkce širokospektrých beta-laktamáz typu AmpC</i>	30
3.3 NEJČASTĚJŠÍ BAKTERIÁLNÍ DRUHY S PRODUKČÍ ŠIROKOSPEKTRÝCH BETA-LAKTAMÁZ V KLINICKÉM MATERIÁLU OSOB V KOMUNITNÍM PROSTŘEDÍ.....	31
3.3.1 <i>Sběr, izolace a identifikace bakterií</i>	31
3.3.2 <i>Fenotypová detekce produkce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL</i>	31
3.3.3 <i>Fenotypová detekce produkce širokospektrých beta-laktamáz typu AmpC</i>	31
3.4 GENETICKÁ ANALÝZA ŠIROKOSPEKTRÝCH BETA-LAKTAMÁZ	31
3.4.1 <i>Genetická detekce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL</i>	32
3.4.1.1 Izolace DNA	32
3.4.1.2 Polymerázová řetězová reakce.....	32
3.4.1.3 Elektroforetická analýza amplikonů	33
3.4.1.4 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů	34
3.4.2 <i>Genetická detekce širokospektrých beta-laktamáz typu AmpC</i>	34
3.4.2.1 Izolace DNA	34
3.4.2.2 Polymerázová řetězová reakce.....	34
3.5 STANOVENÍ IDENTITY/PODOBNOTI BAKTERIÁLNÍCH IZOLÁTŮ S PRODUKČÍ ŠIROKOSPEKTRÝCH BETA-LAKTAMÁZ	36
3.5.1 <i>Izolace DNA pro restrikční analýzu</i>	36
3.5.2 <i>Restrikce celogenomové DNA</i>	37
3.5.3 <i>Pulzní gelová elektroforéza</i>	37
3.6 STANOVENÍ VÝSKYTU PMQR GENŮ U ESBL-POZITIVNÍCH IZOLÁTŮ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	37
3.6.1 <i>Výběr ESBL-pozitivních izolátů pro analýzu</i>	37
3.6.2 <i>Genetická detekce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL</i>	38

3.6.2.1 Izolace DNA	38
3.6.2.2 Multiplex PCR	38
3.6.2.3 Analýza PCR amplikonů	39
3.6.2.4 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů	40
3.6.3 <i>Genetická detekce qnr genů</i>	40
3.6.3.1 Izolace DNA	40
3.6.3.2 Multiplex PCR	40
3.6.3.3 Elektroforetická analýza amplikonů	41
3.6.4 <i>Charakterizace plazmidů</i>	41
3.6.4.1 Izolace plazmidové DNA	41
3.6.4.2 Typizace plazmidů pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR-based replicon typing)	42
3.6.4.3 Elektroforetická analýza amplikonů	45
3.6.5 <i>Stanovení identity/podobnosti izolátů</i>	45
3.6.6 <i>Stanovení citlivosti k antibiotikům</i>	45
4 VÝSLEDKY	46
4.1 NEJČASTĚJŠÍ BAKTERIÁLNÍ DRUHY S PRODUKČÍ ŠIROKOSPEKTRÝCH BETA-LAKTAMÁZ V KLINICKÉM MATERIÁLU HOSPITALIZOVANÝCH PACIENTŮ	46
4.1.1 <i>ESBL-pozitivní enterobakterie z klinického materiálu hospitalizovaných pacientů</i>	46
4.1.2 <i>Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy z klinického materiálu novorozenců</i>	49
4.1.3 <i>Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy v gastrointestinálním traktu hospitalizovaných osob</i>	49
4.2 NEJČASTĚJŠÍ BAKTERIÁLNÍ DRUHY S PRODUKČÍ ŠIROKOSPEKTRÝCH BETA-LAKTAMÁZ V NEMOCNIČNÍM PROSTŘEDÍ.....	50
4.3 NEJČASTĚJŠÍ BAKTERIÁLNÍ DRUHY S PRODUKČÍ ŠIROKOSPEKTRÝCH BETA-LAKTAMÁZ V KLINICKÉM MATERIÁLU OSOB V KOMUNITNÍM PROSTŘEDÍ.....	51
4.4 GENETICKÁ ANALÝZA ŠIROKOSPEKTRÝCH BETA-LAKTAMÁZ	52
4.4.1 <i>Genetická detekce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL</i>	52
4.4.1.1 <i>Bakterie produkující ESBL beta-laktamázy z klinického materiálu novorozenců</i>	52
4.4.1.2 <i>Bakterie produkující ESBL beta-laktamázy v gastrointestinálním traktu hospitalizovaných osob</i>	53
4.4.1.3 <i>Bakterie s produkcí ESBL beta-laktamáz v nemocničním prostředí</i>	55
4.4.1.4 <i>Bakterie s produkcí ESBL beta-laktamáz v klinickém materiálu osob v komunitním prostředí</i>	55
4.4.2 <i>Genetická detekce širokospektrých beta-laktamáz typu AmpC</i>	56
4.4.2.1 <i>Bakterie produkující AmpC beta-laktamázy z klinického materiálu novorozenců</i>	56
4.4.2.2 <i>Bakterie produkující AmpC beta-laktamázy v gastrointestinálním traktu hospitalizovaných osob</i>	58
4.4.2.3 <i>Bakterie s produkcí AmpC beta-laktamáz v nemocničním prostředí</i>	58
4.4.2.4 <i>Bakterie s produkcí AmpC beta-laktamáz v klinickém materiálu osob v komunitním prostředí</i>	58
4.5 STANOVENÍ IDENTITY/PODOBNOTI BAKTERIÁLNÍCH ISOLÁTŮ S PRODUKČÍ ŠIROKOSPEKTRÝCH BETA-LAKTAMÁZ	59
4.5.1 <i>Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy z klinického materiálu novorozenců</i>	59
4.5.2 <i>Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy v gastrointestinálním traktu hospitalizovaných osob</i>	60
4.5.3 <i>Bakterie s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v nemocničním prostředí</i>	62
4.6 STANOVENÍ VÝSKYTU PMQR GENŮ U ESBL-POZITIVNÍCH ISOLÁTŮ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	65
4.6.1 <i>Genetická detekce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL</i>	65
4.6.2 <i>Genetická detekce qnr genů</i>	65
4.6.3 <i>Charakterizace plazmidů</i>	66
4.6.4 <i>Stanovení identity/podobnosti ESBL-pozitivních izolátů Klebsiella pneumoniae</i>	69
4.6.5 <i>Stanovení citlivosti k antibiotikům</i>	72
5 DISKUZE	73
5.1 NEJČASTĚJŠÍ BAKTERIÁLNÍ DRUHY S PRODUKČÍ ŠIROKOSPEKTRÝCH BETA-LAKTAMÁZ V KLINICKÉM MATERIÁLU HOSPITALIZOVANÝCH PACIENTŮ	73
5.1.1 <i>ESBL-pozitivní enterobakterie z klinického materiálu hospitalizovaných pacientů</i>	73
5.1.2 <i>Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy z klinického materiálu novorozenců</i>	74
5.1.3 <i>Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy v gastrointestinálním traktu hospitalizovaných osob</i>	76
5.2 NEJČASTĚJŠÍ BAKTERIÁLNÍ DRUHY S PRODUKČÍ ŠIROKOSPEKTRÝCH BETA-LAKTAMÁZ V NEMOCNIČNÍM PROSTŘEDÍ.....	77
5.3 NEJČASTĚJŠÍ BAKTERIÁLNÍ DRUHY S PRODUKČÍ ŠIROKOSPEKTRÝCH BETA-LAKTAMÁZ V KLINICKÉM MATERIÁLU OSOB V KOMUNITNÍM PROSTŘEDÍ.....	79
5.4 GENETICKÁ ANALÝZA ŠIROKOSPEKTRÝCH BETA-LAKTAMÁZ	81

5.4.1 Genetická detekce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL.....	81
5.4.2 Genetická detekce širokospektrých beta-laktamáz typu AmpC.....	84
5.5 STANOVENÍ IDENTITY/PODOBNOTI BAKTERIÁLNÍCH IZOLÁTŮ S PRODUKČÍ ŠIROKOSPEKTRÝCH BETA-LAKTAMÁZ	87
5.5.1 Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy z klinického materiálu novorozenců	87
5.5.2 Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy v gastrointestinálním traktu hospitalizovaných osob.....	88
5.5.3 Bakterie s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v nemocničním prostředí.....	89
5.6 STANOVENÍ VÝSKYTU PMQR GENŮ U ESBL-POZITIVNÍCH IZOLÁTŮ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	90
6 ZÁVĚRY	93
7 SOUHRN	96
8 SUMMARY	99
9 POUŽITÁ LITERATURA.....	103
10 PUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY.....	114
10.1 PUBLIKACE V ČASOPISECH S IMPAKT FAKTOREM.....	114
10.2 PUBLIKACE V RECENZOVANÝCH ČASOPISECH BEZ IMPAKT FAKTORU.....	114
10.3 PŘEDNÁŠKY A POSTERY S ABSTRAKTEM	114
11 SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ A GRAFŮ.....	116
12 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	119

1 ÚVOD

1.1 Bakteriální rezistence - vážný problém současné medicíny

Nové poznatky v oblasti medicíny v posledních letech výrazně rozšířily a nadále rozšiřují možnosti a kvalitu diagnostických i léčebných postupů, které jsou mnohdy invazivnější než dříve. Současně se zvyšující se invazivitou těchto zákroků výrazně roste i riziko mikrobiálních infekcí, jejichž závažnost neustále stoupá. Rostoucí význam bakteriálních infekcí souvisí rovněž se zvyšujícím se počtem imunokompromitovaných osob a s přibýváním pacientů s nejrůznějšími náhradami z umělých materiálů. Neméně důležitou úlohu však sehrává i nárůst počtu rezistentních bakteriálních izolátů.

Zavedení antibiotik do klinické praxe před 70 lety znamenalo obrovský přelom a umožnilo se vypořádat s řadou do té doby smrtelných bakteriálních infekcí. Nicméně téměř současně s používáním antimikrobiální látky ve větší míře došlo i k rozšíření bakteriálních izolátů rezistentních vůči ní. Krátce po zavedení penicilinu se objevily první penicilin-rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus*. Použití streptomycinu v léčbě tuberkulózy následoval objev mutantního kmene *Mycobacterium tuberculosis* rezistentního k terapeutickým dávkám tohoto antibiotika [1, 2]. Rovněž vývoj celé řady dalších antibiotik v 50. až 70. letech 20. století byl velmi rychle následován vznikem rezistentních bakterií. Velký podíl na této skutečnosti má počáteční optimismus, kdy se zdálo, že díky antibiotikům se bakteriální infekce stanou minulostí. Neuvážená aplikace antibiotik a názor, že antibiotikum je lépe podat i v nejasných případech, však vedl k vytvoření výrazného selekčního tlaku, který přispěl k významnému nárůstu odolnosti bakterií vůči antibiotické léčbě [3]. Selekční tlak antibiotika jako důležitý faktor podílející se na nárůstu počtu rezistentních bakteriálních izolátů byl doložen řadou odborných prací. Urbánek a kolegové popsali statisticky významný nárůst počtu izolátů *Klebsiella pneumoniae* rezistentních k cefalosporinům III. generace v souvislosti se zvýšenou spotřebou těchto antibiotik v příslušném zdravotnickém zařízení [4]. V jiné studii bylo zaznamenáno zvýšení rezistence analyzovaných bakterií *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* spp., *Providencia rettgeri* a *Pseudomonas aeruginosa* k cefalosporinům III. generace, fluorochinolonům a meropenemu [5]. Tento problém však není omezen pouze na zdravotnická zařízení.

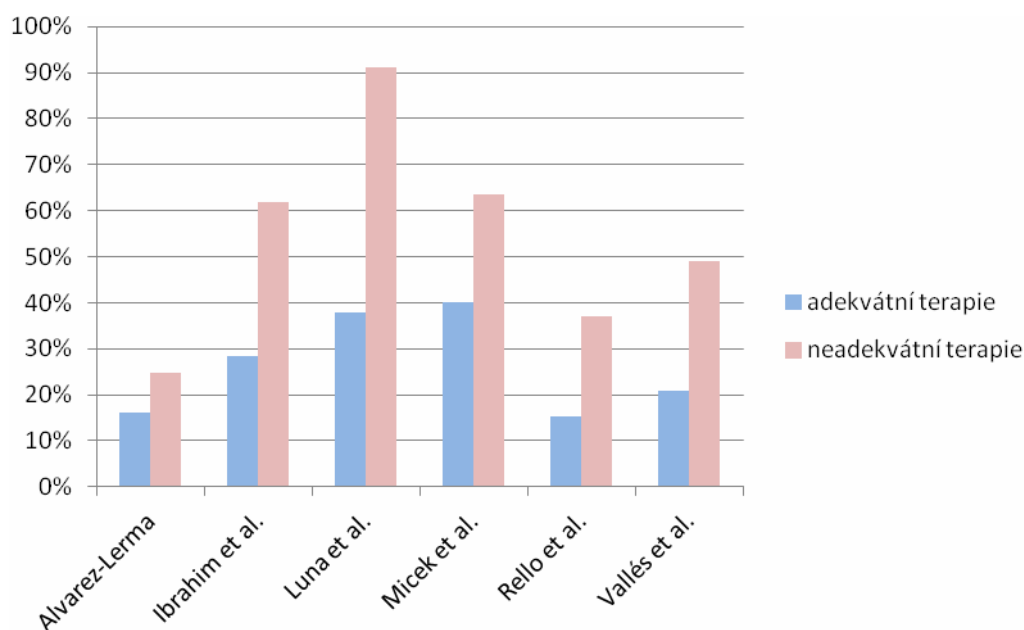
Výrazný selekční tlak vytvořilo rovněž nerozvážené používání antibiotik v zemědělství nejen pro terapii, ale také jako profylaxe vzniku bakteriálních infekcí a prostředků podporujících růst. Využívání antimikrobiálních přípravků ve veterinární oblasti tak velkou měrou přispělo k rozšíření rezistentních bakteriálních izolátů [6]. Důležitou úlohu v šíření rezistence bakterií sehrávají mobilní genetické elementy (především plazmidy a transpozony), které se mohou v bakteriálních populacích snadno přenášet nejenom v rámci jednoho druhu, ale i mezi druhy nebo různými rody. Stále častěji se v poslední době objevuje nový přístup k této problematice, který je založen na metogenomice. Zaměřuje se přitom na bakterie přítomné v prostředí a snaží se získat přehled o diverzitě, distribuci a původu genů rezistence [7].

Oblast rezistence bakterií k antibiotikům je velice rozsáhlá a představuje komplexní problém, který se netýká pouze mikrobiologů, ale významně zasahuje řadu dalších medicínských oborů a má rovněž výrazný ekonomický dopad. Vysoké náklady spojené s léčbou infekcí vyvolaných rezistentními bakteriemi jsou spojené nejenom s nutností využití dražších antimikrobiálních přípravků, ale souvisí i s prodloužením doby hospitalizace, vyšším rizikem komplikací a zvýšenou mortalitou. Výdaje zvyšují rovněž preventivní opatření a nezbytná izolace pacientů infikovaných vysoce rezistentními mikroorganismy. Například v roce 1995 přesáhly náklady na zdravotní péči ve Spojených státech amerických, která souvisela s infekcemi vyvolanými rezistentními bakteriemi, 4 biliony dolarů [8]. O dva roky později byl odhad 7 biliónů dolarů [9]. V roce 1995 se výdaje spojené s epidemií MRSA (metilicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*) v jedné britské nemocnici vyšplhaly na 400 tisíc liber [9, 10]. Lautenbach a kolegové zaznamenali téměř trojnásobné zvýšení nákladů spojené s prodloužením délky hospitalizace pacientů infikovaných ESBL-pozitivními bakteriemi *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae* ve srovnání s pacienty s infekcí ESBL-negativními kmeny [11].

V odborné literatuře byla publikována celá řada prací, které dokládají vyšší morbiditu a mortalitu u infekcí vyvolaných rezistentními bakteriemi. Velmi významný je tento fakt zejména u kriticky nemocných pacientů na jednotkách intenzivní péče, kde je nutné začít s léčbou co nejdříve. Počáteční antibiotická terapie tak často musí být zahájena bez znalosti etiologického agens a jeho vlastností, což v případě infekce vyvolané zejména multirezistentními kmeny výrazně zvyšuje riziko selhání zvoleného postupu. Například Alvarez-Lerma uvádí u pacientů v intenzivní péči se získanou pneumonií 16%

mortalitu v případě adekvátní iniciální antibiotické terapie narozdíl od 25% mortality v případě léčby neadekvátní [12]. Vysokou mortalitu pacientů s ventilátorovou pneumonií s počáteční neadekvátní terapií (91 %) ve srovnání s terapií adekvátní (38 %) popisuje rovněž Luna a kolegové [13]. Souvislost mezi vyšší mortalitou a nevhodnou iniciální antibiotickou terapií pacientů s ventilátorovou pneumonií byla publikována i v další studii. Neadekvátní léčba byla spojena s 37% mortalitou, u adekvátní to bylo 15 % [14]. Statisticky významný rozdíl v mortalitě mezi pacienty na jednotkách intenzivní péče s počáteční adekvátní (28 %) a neadekvátní (62 %) antibiotickou terapií byl zaznamenán také v případě infekcí krevního řečiště [15]. Vallés a kolegové, kteří se zaměřili na infekce krevního řečiště získané v komunitě, rovněž poukázali na rozdíly v počtu úmrtí mezi skupinami pacientů s iniciální vhodnou a nevhodnou antibiotickou léčbou. Obzvláště velký dopad mělo zahájení terapie neadekvátním antibiotikem na skupinu pacientů v septickém šoku, kde byla popsána téměř 87% mortalita. Po 48 hodinách byl počet přeživších pacientů se septickým šokem v případě adekvátní léčby 79 % ve srovnání s 51 % s nevhodnou terapií [16]. Vyšší mortalitu u pacientů v těžké sepsi při neadekvátní iniciální terapii v porovnání s použitím účinného antibiotika prokázali také Micek a kolegové (63 % vs. 40 %) [17]. Data týkající se dopadu počáteční antibiotické léčby na pacienty s vážnými infekcemi přehledně shrnuje graf 1. Nevhodně zvolená iniciální antibiotická terapie má však významný dopad i na pacienty s mnohem méně závažnými infekcemi, jak dokládá například práce zaměřená na nekomplikované infekce močových cest. Pacientky s infekcí vyvolanou rezistentními mikroorganismy měly déle trvající symptomy, byla u nich častěji nutná opětovná návštěva lékaře, předepsání dalších antibiotik a v průběhu následujícího měsíce u nich byla zaznamenána významná bakteriurie [18].

Graf 1: Mortalita pacientů se závažnými infekcemi v závislosti na iniciální antibiotické terapii [12-17]



1.2 Mechanismy rezistence bakterií k antimikrobiálním přípravkům

1.2.1 Genetická podstata bakteriální rezistence

Rezistenci bakterií k antibiotikům je možné definovat jako schopnost bakteriální populace přežít účinek definované koncentrace antibiotika. Existují v podstatě dva základní typy bakteriální rezistence, a to rezistence přirozená (primární) a rezistence získaná (sekundární), která je z klinického hlediska mnohem závažnější. Primární rezistence souvisí s nepřítomností nebo nižší citlivostí cílové struktury daného antibiotika. Klasickým příkladem tohoto typu rezistence je neúčinnost beta-laktamových antibiotik na mykoplasmata, která nemají pevnou buněčnou stěnu, netvoří peptidoglykan a chybí jim PBP (penicilin vázající proteiny), takže se beta-laktamové antibiotikum nemá na co navázat [19]. Neúčinnost glykopeptidových antibiotik na gramnegativní bakterie souvisí s přítomností lipopolysacharidové vrstvy vnější membrány, která chrání peptidoglykanové prekurzory, proti nimž jsou glykopeptidy namířeny [20]. Daleko nebezpečnější je ovšem

rezistence získaná, kdy se původně citlivá bakterie stane odolná. Riziko, které souvisí s tímto typem rezistence, představuje vyšší pravděpodobnost selhání antibiotické terapie [19]. Důležitou roli při vývoji sekundární odolnosti hraje selekční tlak používaných antimikrobiálních látek. Podstatou získané rezistence je změna v genomu bakterie, která je způsobena buď mutací stávajících genů, nebo získáním nové genetické výbavy prostřednictvím mobilních genetických elementů.

1.2.1.1 Mutace

Mutace jsou přirozeným jevem, k němuž dochází v průběhu replikace molekuly DNA s frekvencí jedné chyby na 10^7 bází. Vzhledem k velikosti bakteriálního genomu, rychlosti buněčného cyklu a replikace molekuly DNA, není výskyt mutací žádnou vzácnou výjimkou. Řada mutací může být pro buňku fatální, na druhou stranu však některé změny DNA mohou zvýšit odolnost příslušné bakteriální buňky vůči působení antimikrobiálních látek. Taková bakterie pak v prostředí s antibiotikem získává výhodu, přežívá a postupně vytěsňuje citlivou populaci [21]. Spontánní mutace mohou zajistit rezistenci bakterie několika způsoby. Jednou z možností je mutace v genech kódujících cílovou strukturu proti níž je namířená antimikrobiální látka. Změna ve struktuře cílového proteinu, která modifikuje nebo eliminuje vazebné místo znemožní vazbu antibiotika. Další možností je změna na úrovni regulace různých genů. Může dojít například k mutaci, která zvýší expresi genů, jejichž produkty antibiotikum inaktivují. Zvýšena může být také exprese genů kódujících membránové proteiny, jež se podílejí na aktivním vyčerpávání antibiotika z buňky. Nebo naopak může dojít ke snížení produkce membránových proteinů, které fungují jako kanály umožňující vstup látek do buňky. Získaná rezistence, jež se vyvíjí jako důsledek chromozomálních mutací a selekčního tlaku, se označuje termínem vertikální evoluce [22]. Klíčovým mechanismem vzniku bakteriální rezistence jsou mutace například u druhu *Mycobacterium tuberculosis*, kde je rezistence k používaným antituberkulotikům založena na mutaci v genech *rpoB* (rezistence k rifampicinu), *katC*, *inhA*, *oxyR*, *ahpC*, *furA* (isoniazidu), *rrs*, *rpsL* (streptomycinu), *pncA* (pyrazinamidu), *embB* (ethambutolu), *gyrA* a *gyrB* (fluorochinolonům). Chromozomální mutace jsou zodpovědné za rezistenci bakterie *Helicobacter pylori* k tetracyklinům, metronidazolu, amoxicilinu [23]. Velký význam sehrávají mutace také v evoluci genů rezistence. Ukázkovým příkladem může být počet

širokospektrých beta-laktamáz, kde je v současné době popsáno více než 160 typů TEM a 140 typů SHV enzymů [24].

1.2.1.2 Horizontální přenos genů

Druhý základní způsob, jakým bakterie získávají odolnost vůči antimikrobiálním látkám, představuje vedle mutací přenos genů rezistence pomocí mobilních genetických elementů. Těmi nejdůležitějšími jsou plazmidy, transpozony a integrony, které umožňují přenos genů nejen mezi různými DNA systémy v rámci jedné buňky (chromozomem a plazmidem), ale také z jedné bakterie do druhé [25]. Získ rezistence spojený s přenosem genetického materiálu z buňky do buňky se nazývá horizontální evoluce. Existují tři mechanismy, kterými bakterie mohou získat novou genetickou výbavu, a to konjugace, transdukce a transformace. U gramnegativních bakterií dochází během konjugace ke spojení dvou buněk prostřednictvím specifické struktury označované jako pilus a přenosu genů nesených na plazmidu z jedné „donorové“ buňky do druhé „recipientní“. V případě grampozitivních bakterií začíná konjugace zpravidla produkcí sexuálních feromonů, které usnadňují „shluknutí“ donorové a recipientní buňky a výměnu DNA. Transdukce představuje proces, při kterém dochází k přenosu genu z jedné bakteriální buňky do druhé prostřednictvím bakteriofága (bakteriálního viru). Bakterie rovněž může získat část genetické informace přímo z prostředí, kam se mohou molekuly DNA uvolnit po rozpadu buňky. Tento způsob přenosu se označuje jako transformace [22].

1.2.2 Biochemická podstata bakteriální rezistence

Bakteriální rezistence je spojena se změnami v genomu bakteriální buňky, které jsou způsobeny buď mutací stávajících genů, nebo získáním nové genetické výbavy prostřednictvím mobilních genetických elementů. Přestože je počet a rozmanitost genů, jež se podílejí na odolnosti bakterií vůči antimikrobiálním látkám, velmi vysoký, z biochemického hlediska lze jejich působení rozdělit na pouhé čtyři základní kategorie. Těmito čtyřmi mechanismy jsou (1) inaktivace antibiotika, (2) změna cílového místa, (3) snížený příjem antibiotika nebo jeho aktivní vyčerpávání z buňky a (4) nahrazení vyřazené metabolické dráhy jinou.

1.2.2.1 Inaktivace antibiotika

Asi nejznámější mechanismus rezistence bakterií k antibiotikům představuje inaktivace těchto látek pomocí enzymů, které je štěpí nebo nějakým způsobem modifikují. Typický příklad enzymů s hydrolytickou aktivitou představují bakteriální beta-laktamázy. Tyto enzymy štěpí čtyřčlenný kruh beta-laktamových antibiotik (penicilinů, cefalosporinů, monobaktamů a karbapenemů) a tím je inaktivují. Zároveň patří k jednomu z nejdéle známých mechanismů rezistence, protože první penicilinázy byly popsány již v roce 1940, tedy před rozsáhlejším zavedením penicilinu do klinické praxe [2]. V současnosti jsou známy stovky beta-laktamáz, které jsou na základě hydrolytického spektra, citlivosti k inhibitorům, sekvence a umístění kódujících genů klasifikovány do několika skupin.

Vedle rozštěpení může být antibiotikum inaktivováno také prostřednictvím přenosu některých skupin, které následně znemožní jeho vazbu na cílovou strukturu. Tímto způsobem vyřazují antibiotikum z funkce enzymy označované obecně jako transferázy. K nejčastěji přenášeným patří adenylóvá, fosforylová a acetylová skupina, které se uplatňují například při inaktivaci aminoglykosidů, chloramfenikolu, makrolidů, rifampicinu nebo streptograminu. K modifikaci antibiotika může dojít také prostřednictvím glykosylace, ribosylace nebo přenosem thiolové skupiny. Poměrně vzácná je inaktivace antibiotika na základě jeho oxidace nebo redukce [26-28].

1.2.2.2 Změna cílového místa

Jedním z předpokladů účinnosti antibiotika na bakteriální buňku je existence cílové struktury v buňce, na kterou se naváže. Touto strukturou mohou být například peptidoglykanové prekurzory nezbytné pro syntézu buněčné stěny. Záměna aminokyseliny na C-konci peptidoglykanového prekurzoru je příčinou rezistence grampozitivních koků k vankomycinu. Glykopeptidová antibiotika jako vankomycin a teikoplanin se vážou na dipeptid D-Ala-D-Ala na konci peptidoglykanových prekurzorů, což vede k inhibici syntézy buněčné stěny a zastavení růstu a dělení bakteriální buňky. Záměna koncové aminokyseliny D-alaninu za D-laktát (fenotyp VanA, VanB, VanD) nebo D-serin (VanC, VanE, VanG) znemožní vazbu antibiotika a přivede bakterie ke glykopeptidům [20].

Změna cílového místa se často uplatňuje také v případě rezistence vůči antimikrobiálním látkám zaměřeným na syntézu bakteriálních proteinů. Například mutace

nebo posttranskripční modifikace 23S rRNA, která tvoří součást 50S bakteriální ribozomální podjednotky, je příčinou rezistence bakterií k makrolidům, linkosamidům nebo streptograminu B. Mutace v oblasti 16S rRNA způsobuje rezistenci k aminoglykosidům [28].

Rezistence spojená s modifikací cílového místa hraje roli také u antibiotik zaměřených na syntézu bakteriální DNA. Příkladem mohou být fluorochinolony a rezistence vyvolaná mutací v genech *gyrA*, *gyrB*, *parC* a *parE* kódujících podjednotky bakteriálních enzymů DNA gyrázy a topoizomerázy IV [29].

1.2.2.3 Snížený příjem antibiotika nebo jeho aktivní vyčerpávání z buňky

Další důležitý mechanismus zapojený v rezistenci bakterií k antibiotikům představují změny v propustnosti bakteriální membrány nebo membránové pumpy, které mohou významně snížit množství antibiotika, jež se do buňky dostane nebo v ní zůstane a omezit tak jeho vazbu na cílové struktury. To se týká zejména antibiotik namířených proti syntéze DNA nebo proteinů jako jsou fluorochinolony, makrolidy nebo tetracykliny, jejichž cílové struktury leží uvnitř bakterie. Vnější membrána gramnegativních bakterií tvořená vnitřní vrstvou fosfolipidů a vnější vrstvou obsahující lipopolysacharid představuje důležitou bariéru, která chrání bakterii před průnikem řady látek. Změna propustnosti membrány pak souvisí jednak se strukturálními změnami lipopolysacharidu, ale také s transmembránovými proteiny tzv. poriny, což jsou v podstatě kanály umožňující průchod hydrofilních molekul. Snížení počtu porinů, změna velikosti nebo selektivity pak může výrazně ovlivnit množství antibiotika, které se do buňky dostane [30]. Byla detekována například rezistence k cefoxitinu a ceftazidimu u klinických izolátů *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli* způsobená ztrátou porinu Omp K35 [31].

Významnou úlohu při snižování koncentrace antibiotika uvnitř buňky mají rovněž membránové proteiny označované jako pumpy, které jsou schopny z buňky aktivně vyčerpávat široké spektrum látek. V současné době jsou bakteriální membránové transportéry rozděleny do pěti skupin: MFS (major facilitator superfamily) a ABC (adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette), které jsou velmi početné a tři menší rodiny SMR (small multidrug resistance), RND (resistance-nodulation-cell division) a MATE (multidrug and toxic compound extrusion). Kromě toho jsou efluxní pumpy děleny na jednosložkové a vícesložkové. Zapojení více složek do efluxu je typické

pro gramnegativní bakterie, kde účast dalších proteinů jako je periplasmatický membránový fúzní protein (MFP) a protein vnější membrány (OMP) zajistí průchod látky celým buněčným obalem [30]. Dobře popsány jsou například transportní systémy MexAB-OprM a MexXY-OprM u druhu *Pseudomonas aeruginosa*, které mají velmi široké spektrum a významně zvyšují odolnost vůči celé řadě látek [32].

1.2.2.4 Nahrazení vyřazené metabolické dráhy jinou

Čtvrtým způsobem umožňujícím bakteriím eliminovat účinek dané antimikrobiální látky je tzv. „bypass“. To znamená, že vedle citlivé struktury buňka tvoří i alternativní molekulu (zpravidla enzym) se sníženou citlivostí. Pozměněný enzym pak bakteriální buňce umožní přežít působení antibiotika tím, že převezme funkci původního proteinu. Zařazena do této kategorie může být například rezistence k trimetoprimu a sulfonamidům, která je důsledkem snížení senzitivity a afinity pozměněných enzymů dihydropteroátsyntetázy a dihydropteroátreduktázy k těmto látkám [33].

1.3 Bakteriální beta-laktamázy

Produkce enzymů označovaných obecně jako beta-laktamázy představuje jeden z nejdůležitějších mechanismů rezistence bakterií k beta-laktamovým antibiotikům (penicilinům, cefalosporinům, monobaktamům a karbapenemům).

1.3.1 Klasifikace beta-laktamáz a jejich klinický význam

Beta-laktamázy jsou klasifikovány jako enzymy hydrolyzující amidy, amidiny a další C-N vazby. Dnes jsou popsány desítky beta-laktamáz, které jsou rozčleněny na základě různých parametrů do několika skupin. První rozdělení beta-laktamáz podle funkce na penicilinázy a cefalosporinázy se objevuje už v roce 1968. Další klasifikace z roku 1973 řadí beta-laktamázy již do pěti skupin na základě jejich substrátového profilu. Dalším parametrem, který byl použit při tvorbě klasifikačního schématu, se stal isoelektrický bod. V současné době jsou preferovány dva systémy dělení beta-laktamáz a to klasifikace podle Bushové-Jacobyho-Medeirose, která dělí enzymy podle jejich substrátové specifity a citlivosti k inhibitorům, a Amblerovo schéma založené na molekulární struktuře [34].

Amblerova klasifikace beta-laktamáz vychází se znalosti sekvence aminokyselin tvořících molekulu enzymu a člení beta-laktamázy do čtyř tříd označených písmeny A až D. Třídy A, C a D obsahují enzymy, jež mají v aktivním místě serin na rozdíl od třídy B, která obsahuje metaloenzymy, kde je v aktivním místě zapojen minimálně jeden ion kovu, nejčastěji zinku. Rozdělení beta-laktamáz založené na jejich molekulární struktuře představuje asi nejobjektivnější parametr, jak rozčlenit množství popsaných enzymů. Na druhé straně však klasifikace enzymů vycházející z jejich funkce může být velice výhodná z hlediska posouzení jejich role a klinického dopadu [35].

Systém Bushové-Jacobyho-Medeirose členil beta-laktamázy na čtyři skupiny označené číselně 1-4 [34], v poslední době se skupina 4 vynechává [35]. Skupina 1 zahrnuje cefalosporinázy, které jsou řazeny do molekulární třídy C podle Amblera. Až na výjimky nejsou inhibovány kyselinou klavulanovou a patří sem například AmpC beta-laktamázy. Nově je vyčleněna podskupina 1e s vyšší účinností vůči ceftazidimu a dalším oxyimino-beta-laktamovým antibiotikům. Do skupiny 2 jsou řazeny serinové beta-laktamázy spadající do molekulární třídy A a D. Společnou vlastností je většinou dobrá citlivost k inhibitorům beta-laktamových antibiotik. Tato skupina je nejpočetnější a původně byla členěna na 8 podskupin (2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e, 2f) podle preferovaných substrátů. Dnes jsou definovány další čtyři podskupiny (2ber, 2ce, 2de, 2df). Patří sem například beta-laktamázy TEM a SHV, a to jak původní enzymy s úzkým spektrem účinku (TEM-1, SHV-1 - podskupina 2b), tak od nich odvozené širokospektré beta-laktamázy ESBL (zařazené do skupiny 2be). Skupinu 3 představují metalo-beta-laktamázy, které hydrolyzují velké množství beta-laktamových antibiotik včetně karbapenemů a jsou jen velice málo citlivé ke klasickým inhibitorům s výjimkou kyseliny ethylendiaminotetraoctové (EDTA) a p-chloromerkuribenzoátu (pCMB). V současnosti jsou také metalo-beta-laktamázy rozděleny do podskupin (3a, 3b, 3c). Původně definovaná skupina 4, kam byly řazeny málo četné penicilinázy, které nejsou inhibovány kyselinou klavulanovou, se v poslední době vynechává a upřednostňuje se jejich zařazení do jedné z předchozích skupin [34, 35].

Dalším kritériem pro členění beta-laktamáz může být jejich umístění, a to buď na chromozomu, nebo na plazmidech. Tento úhel pohledu má velký význam zejména z epidemiologického hlediska, protože enzymy kódované geny uloženými na plazmidech se mohou snadno šířit.

Velkou pozornost si v rámci velice početné rodiny beta-laktamáz zasluhují zejména enzymy se širokým spektrem účinku typu ESBL a AmpC, jejichž počet se neustále zvyšuje. Výrazný je tento trend zejména u skupiny 2 (podle Bushové-Jacobyho-Medeirose) (molekulární třída A, D podle Amblera), kde se množství popsaných beta-laktamáz za posledních dvacet let zdesetinásobilo [35]. Vedle rostoucího počtu nově popsaných beta-laktamáz narůstá také množství bakteriálních izolátů s touto genetickou výbavou. Šíření bakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy se odráží i ve výsledcích sledovaných v rámci EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network). Ty ukazují, že frekvence enterobakterií rezistentních k cefalosporinům III. generace v posledních letech v Evropě stoupá. Například v případě *Escherichia coli* se rezistence k cefalosporinům III. generace v České republice zvýšila ze 2 % v roce 2005 na 10 % v roce 2010, u *Klebsiella pneumoniae* došlo ve stejném období k nárůstu počtu rezistentních izolátů z 32 % na 48 % [36].

Produkce širokospektrých beta-laktamáz není okrajovou záležitostí, ale má stejně jako jiné typy rezistence, výrazný klinický dopad. U gramnegativních bakterií představuje dokonce nejvýznamnější mechanismus rezistence k beta-laktamovým antibiotikům. Odolnost bakterií vůči antibiotikům spojená s produkcí těchto enzymů může vést k selhání antibiotické terapie a s tím souvisejícímu zvýšení morbidit a mortality. Trojnásobně vyšší mortalitu pacientů s infekcemi krevního řečiště způsobenými ESBL-pozitivními bakteriemi v důsledku počáteční neadekvátní terapie dokládá retrospektivní analýza Tumbarella a kolegů [37]. Studie vedená Schwaberem ukazuje, že infekce vyvolané ESBL-pozitivními bakteriemi jsou spojeny se zvýšenou mortalitou, prodloužením doby hospitalizace a vyššími ekonomickými náklady. Konkrétní čísla odhalila 30% mortalitu pacientů s bakteriemi vyvolanou ESBL-pozitivními kmeny *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. a *Proteus* spp. U pacientů s etiologickou rolí ESBL-negativních enterobakterií byla zjištěna mortalita 16 %. Náklady spojené s léčbou a hospitalizací byly u infekcí ESBL-pozitivní etiologie ve srovnání s infekcemi způsobenými ESBL-negativními kmeny téměř trojnásobné [38]. Statisticky významný rozdíl selhání antibiotické léčby (73 % vs. 17 %) u pacientů se spontánní bakteriální peritonitidou vyvolanou ESBL-pozitivními a ESBL-negativními kmeny *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae* prokázala také studie Kanga a kolegů. Kromě toho byla u pacientů infikovaných ESBL-pozitivními bakteriemi prokázána vyšší třicetidenní mortalita (60 %) ve srovnání s pacienty s infekcí vyvolanou ESBL-

negativními bakteriemi (23 %) [39]. Vysoký podíl selhání antibiotické terapie byl zaznamenán i u AmpC-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* [40].

1.3.2 ESBL a AmpC

1.3.2.1 Bakteriální beta-laktamázy typu ESBL

Zkratka ESBL vychází z anglického termínu „extended-spectrum beta-lactamases“ a označuje enzymy s tzv. rozšířeným spektrem účinku. Tyto beta-laktamázy jsou schopny hydrolyzovat a tím pádem inaktivovat nejenom peniciliny a cefalosporiny I. a II. generace, ale štěpí rovněž cefalosporiny III. a IV. generace a aztreonam. Naopak je omezen jejich účinek na cefamyciny (např. cefoxitin) a karbapenemy. Druhou základní vlastností, která spojuje tuto velice početnou skupinu, je citlivost těchto enzymů k působení inhibitorů beta-laktamáz, především pak ke kyselině klavulanové [41]. V rámci klasifikace Bushové-Jacobyho-Medeirose jsou ESBL beta-laktamázy řazeny do skupiny 2be a 2d, které odpovídají molekulárním třídám A a D podle Amblera [35]. Společným znakem beta-laktamáz typu ESBL je jejich časté umístění na plazmidech, které navíc přispívá k jejich snadnému šíření. První beta-laktamáza s rozšířeným spektrem účinku byla identifikována v roce 1983, velice brzy po zavedení oxyiminocefalosporinů do klinické praxe. Byla nalezena v Německu u izolátu *Klebsiella ozaenae* a označena jako SHV-2 [42]. Schopnost štěpit cefalosporiny III. generace je u enzymu SHV-2 výsledkem mutace a záměny jediné aminokyseliny oproti původní beta-laktamáze SHV-1 s úzkým spektrem účinku. Brzy následoval objev dalších derivátů enzymu SHV-1 schopných štěpit širokospektré cefalosporiny a dnes jejich počet přesahuje 140. K obdobným mutacím a vzniku řady nových variant s rozšířeným spektrem účinku došlo i v případě enzymu TEM-1. Tato plazmidem-kódovaná beta-laktamáza byla identifikována u gramnegativních bakterií na počátku 60. let 20. století a dnes je popsáno více než 160 jejích derivátů [24, 43].

Vedle početné skupiny derivátů TEM a SHV beta-laktamáz však v poslední době narůstá význam jiných ESBL enzymů, a to beta-laktamáz typu CTX-M [44]. Označení CTX-M odráží vysokou hydrolytickou aktivitu těchto enzymů vůči cefotaximu [41]. Bylo popsáno 40 beta-laktamáz CTX-M, které byly na základě homologie sekvencí rozděleny do 5 skupin a to CTX-M-1 (zahrnuje enzymy CTX-M-1, -3, -10, -12, -15, -22, -23, -28 a FEC-1), CTX-M-2 (-2, -4, -4L, -5, -6, -7, -20, Toho-1), CTX-M-8, CTX-M-9 (-9, -13, -14, -16,

-17, -19, -21, -27, Toho-2) a CTX-M-25 (-25, -26). Většina genů kódujících beta-laktamázy typu CTX-M má původ v chromozomálních genech bakterií rodu *Kluyvera*, které se dostaly na mobilní genetické elementy, což umožnilo jejich další rozrůznění a snadný přenos na jiné bakterie [45]. Například beta-laktamáza KLUG-1 se širokým spektrem účinku, která je kódována genem uloženým na chromozómu bakterie *Kluyvera georgiana*, se v 99 % shoduje s aminokyselinovou sekvencí plazmidem kódované beta-laktamázy CTX-M-8 [46].

V devadesátých letech minulého století převládal výskyt kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí SHV a TEM variant, přičemž tyto kmeny byly často izolovány od nemocničních pacientů, především na jednotkách intenzivní péče [47]. V posledních letech se však situace dramaticky změnila a hlavními producenty ESBL se staly kmeny *Escherichia coli* s produkcí CTX-M-typu beta-laktamáz, které jsou navíc stále častěji izolovány z komunitního prostředí [48].

Další skupinu beta-laktamáz zařazených do kategorie ESBL tvoří enzymy typu OXA. Označení vychází z jejich schopnosti štěpit oxacilin a v klasifikaci Bushové-Jacobyho-Medeirose jsou řazeny do skupiny 2d. Na rozdíl od výše jmenovaných typů TEM, SHV a CTX-M je jejich citlivost ke klasickým inhibitorům beta-laktamáz jako například ke kyselině klavulanové proměnlivá [35]. Poprvé byla OXA beta-laktamáza detekovaná u druhu *Pseudomonas aeruginosa* a vývoj dalších variant s rozšířeným spektrem účinku z původního enzymu s užším spektrem je analogický s evolucí enzymů typu TEM a SHV [49].

Byly objeveny a popsány také další typy beta-laktamáz molekulární třídy A, které se šíří pomocí plazmidů nebo jsou asociovány s integrony. Patří sem například enzymy PER, VEB, BES, GES a další [41].

1.3.2.2 Bakteriální beta-laktamázy typu AmpC

Další důležitou skupinu enzymů, které umožňují bakteriím odolat účinku beta-laktamových antibiotik, představují enzymy AmpC. V rámci Amblerovy molekulární klasifikace jsou zařazeny do třídy C, v systému Bushové-Jacobyho-Medeirose patří do skupiny 1 [35]. AmpC beta-laktamázy hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny včetně oxyiminocefalosporinů (ceftazidim, cefotaxim, ceftriaxon), cefamyciny (cefoxitin, cefotenan) a monobaktamy (aztreonam). Na rozdíl od předcházejících beta-laktamáz typu ESBL nejsou AmpC enzymy inhibovány kyselinou klavulanovou a ve většině případů ani

sulbaktamem nebo tazobaktamem. Rovněž na ně nepůsobí pCMB nebo EDTA, což je logické, protože v aktivním místě figuruje serin, nikoli ionty kovů [50].

Geny kódující AmpC beta-laktamázy se nacházejí na chromozomu celé řady bakteriálních druhů z čeledi *Enterobacteriaceae* například *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Providencia stuartii*, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica*, ale i bakterií z jiných skupin jako je *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Psychrobacter immobilis* a další. U řady enterobakterií je exprese genu *ampC* nízká, ale může být indukována v souvislosti s vystavením bakterie působení beta-laktamového antibiotika. Poškození bakteriální buněčné stěny vede k hromadění peptidoglykanových meziproductů (oligopeptidů N-acetalglukosamin-1,6-anhydro-N-acetylmuramové kyseliny), které pak ovlivňují expresi dalších genů *ampR*, *ampD*, *ampG* a společně se podílí na regulaci produkce AmpC enzymu [50, 51]. Mutace v některém z genů zahrnutých v expresi AmpC beta-laktamáz může vést ke změně inducibilní produkce na trvalou. V klinických izolátech bývá nejčastější příčinou zvýšené exprese AmpC proteinu mutace v genu *ampD*, která způsobí hyperinducibilitu nebo konstitutivní hyperprodukcí AmpC. Jinak je to v případě druhu *Escherichia coli*, který postrádá regulační gen *ampR*. U této bakterie je exprese genu řízena prostřednictvím promotorové oblasti genu *ampC* a atenuátorového mechanismu [52].

Druhou skupinu AmpC beta-laktamáz tvoří enzymy kódované geny umístěnými na plasmidech. Stejně jako chromozomální AmpC nejsou inhibovány klasickými inhibitory a poskytují rezistenci k velkému počtu beta-laktamových antibiotik. Plazmidově kódované beta-laktamázy AmpC se často nacházejí u druhů, které nenesou chromozomální gen *ampC* jako je *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* nebo zástupci rodu *Salmonella*. Identifikovány ovšem byly i u bakterií, jež chromozomální gen mají, například u izolátů *Escherichia coli* nebo *Enterobacter* spp. [51]. Některé geny kódující AmpC beta-laktamázy jsou na plazmidu přenášeny společně s regulačním genem *ampR* a jsou proto inducibilní, u jiných je exprese většinou konstitutivní a je regulována promotorovou oblastí. Obdobně jako beta-laktamázy ESBL jsou i plazmidově kódované AmpC enzymy rozděleny do několika skupin na základě rozdílů v sekvenci aminokyselin [50].

1.3.3 Společný výskyt genů kódujících beta-laktamázy ESBL a AmpC s dalšími geny rezistence

V současné době je zřejmé, že produkce širokospektrých beta-laktamáz je velice závažným jevem. Problematika možného selhání antibiotické terapie u infekcí vyvolaných rezistentními bakteriemi a s tím spojená vyšší morbidita a mortalita pacientů byla diskutována v předcházejících odstavcích. Navíc dnes není tento problém omezen pouze na vysoce riziková nemocniční pracoviště, jako například jednotky intenzivní péče, ale stále častěji se rezistentní izoláty objevují také v komunitním prostředí. Zatímco ve druhé polovině 20. století nebyla volba vhodného antibiotika u infekcí vyvolaných například enterobakteriemi příliš složitá, protože cefalosporiny i fluorochinolony byly považovány za spolehlivé, v současné době se situace významně zkomplikovala [53]. Produkce širokospektrých beta-laktamáz výrazně omezuje možnosti léčby, protože z volby vyřazuje velice početnou skupinu beta-laktamových antibiotik. Vedle toho narůstá také počet ESBL- a AmpC-pozitivních izolátů, které jsou rezistentní i k dalším antimikrobiálním látkám například ciprofloxacinu, trimetoprimu nebo gentamicinu [54]. Existence zkřížené rezistence navíc zvyšuje selekční tlak antimikrobiálních látek, protože působení jedné látky selektuje izoláty, které jsou rezistentní i k dalším látkám.

Do popředí zájmu se dostává současná rezistence bakterií k beta-laktamovým antibiotikům a fluorochinolonům, jak dokládá řada nedávno publikovaných prací [55-63]. Vzhledem k tomu, že fluorochinolony patří mezi další často používané přípravky v terapii bakteriálních infekcí způsobených gramnegativními tyčinkami, je tento trend velmi nepříznivý. Velký podíl na této skutečnosti má rozšíření plazmidově kódovaných genů rezistence k chinolonům, které se mohou snadno přenášet. Základní mechanismus rezistence bakterií k fluorochinolonům je založen na kumulaci chromozomálních mutací genů kódujících podjednotky DNA gyrázy (*gyrA*) a DNA topoizomerázy IV (*parC*). Rovněž byla popsána rezistence související se sníženou permeabilitou buněčné stěny nebo zvýšeným efluxem antibiotika z buňky [64, 65]. Rostoucí frekvence bakteriálních izolátů rezistentních k fluorochinolonům je však těsně provázána s dalšími mechanismy rezistence kódovanými geny na plazmidech. Poprvé byl tento mechanismus zaznamenán v roce 1998 a od té doby se počet popsáných genů a jejich variant značně rozrostl [66]. Samotné plazmidem přenášené PMQR (plasmid-mediated quinolone resistance) geny

zvyšují rezistenci k chinolonovým antibiotikům pouze mírně, ovšem umožňují bakterii vystavené nižším koncentracím v přítomnosti antibiotika přežít. Vytváří se tak podstatný selekční tlak, který zvyšuje pravděpodobnost vzniku a uplatnění se mutací spojených s úplnou rezistencí. Existuje několik plazmidem kódovaných mechanismů rezistence, a to proteiny qnr, aminoglykosidacetyltransferáza AAC(6′)-Ib-cr, efluxní pumpy QepA a OqxAB [67]. Qnr jsou definovány jako proteiny, v jejichž struktuře se opakuje motiv 5 aminokyselin, které snižují citlivost ke kyselině nalidixové a/nebo fluorochinolonům. V současné době je popsáno pět typů qnr proteinů (qnrA, qnrB, qnrC, qnrD a qnrS) a je známo více než 50 jejich variant [68]. Fungují jako ochrana DNA gyrázy a topoizomerázy IV, protože znemožňují vazbu chinolonů na tyto enzymy. Protein AAC(6′)-Ib-cr je variantou enzymu AAC(6′)-Ib (rezistence k aminoglykosidům) a acetyluje norfloxacin a ciprofloxacin, které tímto způsobem inaktivuje. Proteiny QepA a OqxAB pracují jako efluxní pumpy a vyčerpávají fluorochinolony z buňky [69].

PMQR geny jsou celosvětově značně rozšířeny a byly identifikovány v řadě zemí. Publikované práce navíc ukazují jejich častý společný výskyt s plazmidově kódovanými širokospektrými beta-laktamázy. Například Jeong a kolegové prokázali přítomnost minimálně jedné beta-laktamázy ESBL nebo AmpC u 38 ze 47 (81 %) qnr-pozitivních izolátů [55]. Prevalence genů kódujících beta-laktamázy byla sledována také u PMQR-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* z čínské nemocnice. Mezi 59 zástupci *Klebsiella pneumoniae* nesoucími minimálně jeden PMQR gen byly geny *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} a *bla*_{DHA} detekovány v 51 %, 92 %, 56 %, 59 % a 22 %. U všech bakterií s genem *qnrB* byla zachycena beta-laktamáza DHA. Autoři rovněž poukázali na častější výskyt genů *qnr* společně s geny *bla*_{CTX-M} a *bla*_{DHA} [56]. Výskyt *qnr* genů a genů kódujících enzymy ESBL a AmpC byl sledován rovněž u izolátů *Klebsiella pneumoniae* získaných od dětských pacientů. Z celkového počtu 410 klinických izolátů bylo 92 qnr-pozitivních (22 %). Detekovány byly geny *qnrA* (10 izolátů), *qnrB* (25) i *qnrS* (62). U 82 z 92 qnr-pozitivních izolátů (88 %) byl identifikován minimálně jeden gen pro beta-laktamázu TEM, SHV, CTX-M nebo DHA-1 [57]. Jiná studie odhalila mezi 47 ESBL-pozitivními izoláty dva nesoucí gen *qnrS* a 12 s genem AAC(6′)-Ib-cr [58]. Pai a kolegové detekovali gen *qnrB* u 100 % (54/54) izolátů *Klebsiella pneumoniae* nesoucích plazmidově kódovanou beta-laktamázu DHA-1 a u 22 % (10/45) s genem pro beta-laktamázu SHV-12. Celkově mezi 158

ESBL- a AmpC-pozitivními klinickými izoláty *Klebsiella pneumoniae* odhalili 44 % nesoucích gen *qnr*. V rámci druhu *Escherichia coli* (81 izolátů) zaznamenali geny *qnr* v 5 % [59]. Prevalence PMQR genů u ESBL-pozitivních bakterií byla studována i ve Švédsku. Mezi 319 enterobakteriemi získanými z klinického materiálu pacientů v letech 2001 až 2008 bylo 12 *qnr*-pozitivních (1 *qnrA1*, 2 *qnrB1*, 3 *qnrB2*, 1 *qnrB4*, 1 *qnrB6* a 4 *qnrS1*) a žádný z nich nebyl izolován před rokem 2006. Poměrně nízká byla prevalence *qnr* genů u druhu *Escherichia coli* (2 %) ve srovnání se zástupci *Klebsiella pneumoniae* (16 %) a *Enterobacter cloacae* (67 %) [60]. Také italská studie ukázala vyšší zastoupení *qnr* genů u druhu *Klebsiella pneumoniae*. Autoři analyzovali celkem 232 klinických izolátů čeledi *Enterobacteriaceae* rezistentních k ciprofloxacinu nebo produkujících ESBL a identifikovali mezi nimi 40 bakterií (17 %) nesoucích některý z genů *qnr*. Gen *qnr* byl detekován u 68 % izolátů *Klebsiella pneumoniae* (32/47) a u 5 % *Escherichia coli* (8/157). U jiných druhů nebyli *qnr* geny zaznamenány [61]. Naopak práce jiného kolektivu zaměřená na prevalenci PMQR genů u izolátů enterobakterií z krve, rezistentních k cefotaximu a zároveň k ciprofloxacinu, odhalila přítomnost genu *qnrA* nejen u zástupců druhu *Klebsiella pneumoniae*, ale i *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* a *Enterobacter cloacae*. Celkově bylo zachyceno 32 % *qnrA*-pozitivních izolátů (15/47) a u 11 z nich byl detekován gen pro širokospektrou beta-laktamázu SHV-12 [62]. Výskyt PMQR genů u ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli* mapovali Jiang a kolegové. V rámci 362 analyzovaných izolátů odhalili 29 nesoucích některý z genů *qnr* a 36 s genem *AAC(6′)-Ib-cr*. Rovněž poukázali na možný přenos plazmidů nesoucích geny *qnr* prostřednictvím konjugace spolu s dalšími geny rezistence kódujícími beta-laktamázy ESBL a enzym *AAC(6′)-Ib-cr* [63].

2 CÍLE PRÁCE

Cílem předložené disertační práce byla identifikace a typizace bakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz. Konkrétní témata lze definovat následujícími body:

1. Nejčastější bakteriální druhy s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v klinickém materiálu hospitalizovaných pacientů.
2. Nejčastější bakteriální druhy s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v nemocničním prostředí.
3. Nejčastější bakteriální druhy s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v klinickém materiálu osob v komunitním prostředí.
4. Genetická analýza širokospektrých beta-laktamáz.
5. Stanovení identity/podobnosti bakteriálních izolátů s produkcí širokospektrých beta-laktamáz.
6. Stanovení výskytu PMQR genů u vybraných ESBL-pozitivních izolátů.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Nejčastější bakteriální druhy s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v klinickém materiálu hospitalizovaných pacientů

3.1.1 Sběr, izolace a identifikace bakterií

3.1.1.1 ESBL-pozitivní enterobakterie z klinického materiálu hospitalizovaných pacientů

Do studie byly zahrnuty bakteriální izoláty získané z klinického materiálu (tracheální endosekret, bronchoalveolární laváž, sputum, krev, moč, hnis, punktát, sekret z rány) pacientů hospitalizovaných ve třech různých zdravotnických zařízeních v České republice, a to konkrétně ve Fakultní nemocnici Olomouc (1406 lůžek, z toho 155 na JIP), ve Fakultní nemocnici Ostrava (1389 lůžek, 181 na JIP) a v Krajské nemocnici T. Bati ve Zlíně (1046 lůžek, 74 na JIP) v období 1. 1. - 31. 12. 2009. Enterobakterie byly identifikovány standardními mikrobiologickými postupy včetně Enterotestu16 (Erba-Lachema s.r.o., Česká republika) a ve vybraných případech byl využit automatizovaný systém Phoenix (Becton Dickinson, USA). Od každého pacienta byl zařazen vždy jen jeden izolát daného druhu, a to ten, který byl z příslušného klinického materiálu získán jako první. Pro další analýzu byly vybrané izoláty uchovávány v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80 °C za použití ITEST Kryobanka B (ITEST plus s.r.o., Česká republika).

3.1.1.2 Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy z klinického materiálu novorozenců

Enterobakterie byly izolovány z klinického materiálu novorozenců (stěry z nosu, krku a rekta; hemokultura; moč; stěry z okolí pupečního pahýlu a axily; bronchalveolární laváž) hospitalizovaných na Novorozeneckém oddělení Fakultní nemocnice Olomouc v časovém období dvou roků od 1. 4. 2008 do 1. 4. 2010. Novorozenecké oddělení Fakultní nemocnice Olomouc je částí Perinatologického centra se spádovou oblastí 7000 porodů za rok. Oddělení neonatální intenzivní a resuscitační péče (NICU) má dvanáct plně vybavených lůžek pro nejtěžší patologické stavy, oddělení následné péče má čtrnáct lůžek. V uvedeném období bylo hospitalizováno na NICU celkem 622 novorozenců, z toho 141 dětí s porodní hmotností pod 1500 gramů. V rámci mikrobiologických vyšetření jsou na NICU standardně odebírány stěry z krku, nosu a rekta dvakrát týdně u všech dětí.

Na oddělení následné péče jsou stejné odběry prováděny jedenkrát týdně. V případě podezření na infekční onemocnění a u dětí s invazivními výkony jsou odebírány další vzorky - hemokultura, moč, stěry z okolí pupečního pahýlu a axily, bronchalveolární laváž. Identifikace enterobakterií, jejich výběr a uchování pro následnou analýzu bylo shodné s postupem uvedeným v kapitole 3.1.1.1.

3.1.1.3 Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy v gastrointestinálním traktu hospitalizovaných osob

V období od 1. 3. 2010 do 1. 5. 2010 byly izolovány enterobakterie z rektálních výtěrů pacientů hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Olomouc (FNOL). Od každé osoby byl zpracován jen jeden rektální výtěr. Výtěry byly inokulovány na selektivní ChromIDTM ESBL agar (BioMérieux, Francie). Narostlé kolonie byly identifikovány standardními mikrobiologickými postupy včetně Enterotestu16 (Erba-Lachema s.r.o., Česká republika) a současně pomocí automatizovaného systému Phoenix (Becton Dickinson, USA) a uchovávány způsobem popsáním v kapitole 3.1.1.1.

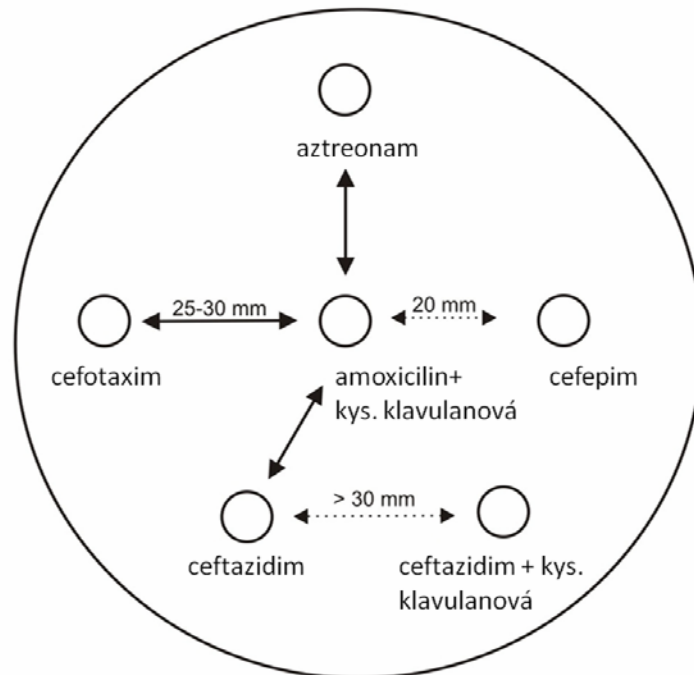
3.1.2 Fenotypová detekce produkce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL

U izolátů z klinického materiálu hospitalizovaných pacientů a z klinického materiálu novorozenců (kapitoly 3.1.1.1 a 3.1.1.2) byla stanovena citlivost k antibiotikům standardní diluční mikrometodou [70, 71]. K protokolované kontrole kvality sloužily referenční kmeny *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218 a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Všechny izoláty enterobakterií, u nichž přesáhla minimální inhibiční koncentrace alespoň jednoho z testovaných cefalosporinů III. generace (cefotaxim, ceftazidim, cefoperazon) hodnotu $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, byly podrobeny fenotypové analýze pro detekci produkce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL. Ze selektivního média ChromIDTM ESBL byly fenotypové analýze produkce ESBL podrobeny všechny izoláty (kapitola 3.1.1.3).

K fenotypové detekci ESBL byl použit modifikovaný Double Disk Synergy Test (DDST) (obrázek 1), který ve srovnání s klasickým DDST testem podle Jarliera obsahuje navíc disk s cefepimem a disk s ceftazidimem s kyselinou klavulanovou [72-74]. Výhodou zařazení disku s cefepimem je jeho odolnost vůči beta-laktamázám typu AmpC, která

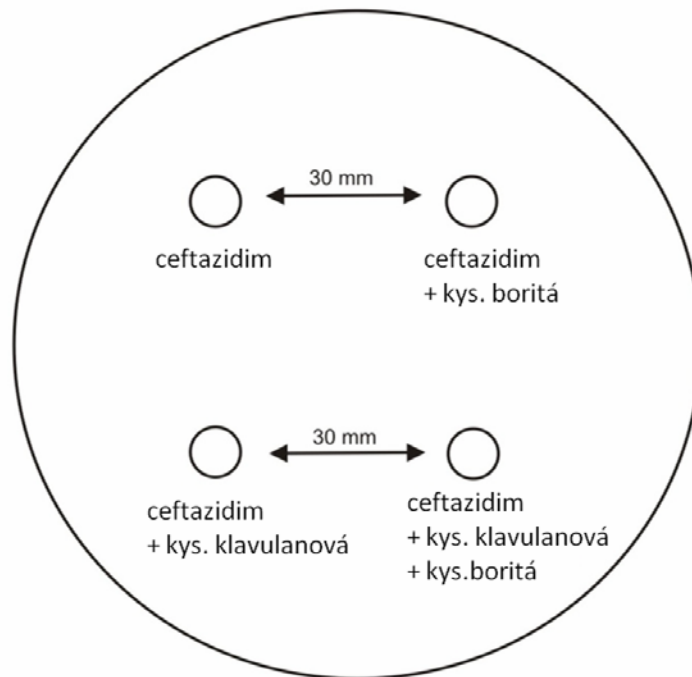
usnadňuje detekci ESBL enzymů v případě, že testovaný bakteriální izolát produkuje vedle ESBL i AmpC enzym [75]. Produkce ESBL se při tomto uspořádání projeví jako rozšíření klasické inhibiční zóny směrem k disku obsahujícímu inhibitor nebo rozšířením zóny o více než 5 mm okolo disku s inhibitorem.

Obrázek 1: Modifikovaný Double Disk Synergy Test [73]



3.1.3 Fenotypová detekce produkce širokospektrých beta-laktamáz typu AmpC

Stanovení citlivosti k antibiotikům a výběr izolátů pro fenotypovou analýzu byly provedeny stejně jako v případě bakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy typu ESBL (viz kapitola 3.1.2). K fenotypové detekci AmpC beta-laktamáz byl použit AmpC diskový test s kyselinou 3-aminofenylboritou, který je schematicky znázorněn na obrázku 2 [73, 74, 76]. Kyselina 3-aminofenylboritá funguje jako inhibitor AmpC beta-laktamáz, takže rozšíření inhibiční zóny o 5 mm okolo disku se 400 µg této kyseliny oproti disku bez kyseliny značí produkci beta-laktamáz typu AmpC.

Obrázek 2: AmpC diskový test [73]

3.2 Nejčastější bakteriální druhy s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v nemocničním prostředí

3.2.1 Sběr, izolace a identifikace bakterií

V průběhu dvou měsíců (listopad-prosinec 2010) bylo provedeno jednorázové epidemiologické šetření mikrobiální kontaminace vzduchu, povrchů a zdravotnického personálu (výtěr z obou nosních dírek a stěr pravé ruky bez rukavice) ve FNOL. Epidemiologické šetření proběhlo na lůžkovém zařízení Kliniky anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny (KARIM, 10 lůžek) a Oddělení intenzivní péče chirurgických oborů (IPCHO, 12 lůžek).

Mikrobiální kontaminace vzduchu byla stanovena pomocí aeroskopu Merck-100. Odběry byly provedeny celkem na 10 místech na každém oddělení. Ve všech případech bylo odebráno 100 litrů vnitřního ovzduší po dobu 1 minuty.

Mikrobiální kontaminace povrchů byla stanovena pomocí sterilní výtěrovky smočené ve sterilním fyziologickém roztoku. Stěr byl proveden z plochy o velikosti 10x10 cm ve dvou směrech na sebe kolmých, v případě výpustí umyvadel a dřezů byl proveden stěr z jejich vnitřního povrchu. Na každém oddělení bylo takto vyšetřeno 30 různých ploch (parapety, madla postele, ovládací panel infuzní pumpy, žaluzie, dřezy, umyvadla, šibenice na hadice, roztoky pro proplach).

Sliznice nosu zdravotnického personálu byly vyšetřeny jednorázovým výtěrem obou nosních dírek pomocí sterilní výtěrovky smočené ve sterilním fyziologickém roztoku. Kůže pravé ruky bez rukavice byla vyšetřena stěrem kůže těch míst, která bývají při hygienickém zabezpečení rukou ve zdravotní péči opomíjena, a to oblast palce a meziprstní prostory z horní i spodní části. Také v tomto případě byl stěr proveden sterilní výtěrovkou smočenou ve sterilním fyziologickém roztoku. Na každém oddělení bylo vyšetřeno 15 osob.

Kultivace vzorků a identifikace bakterií probíhala standardními mikrobiologickými postupy včetně Enterotestu¹⁶ (Erba Lachema s.r.o., Česká republika). Ve vybraných případech byl k identifikaci použit systém Phoenix (Becton Dickinson, USA) a MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, USA). Izolované bakterie byly skladovány způsobem uvedeným v kapitole 3.1.1.1.

Pro porovnání byly enterobakterie izolovány rovněž z klinického materiálu (tracheální endosekret, bronchoalveolární laváž, sputum, krev, moč, hnis, punktát, sekret z rány) pacientů hospitalizovaných v uvedeném období na KARIM a IPCHO ve FNOL. Výběr kmenů byl realizován tak, že od jednoho pacienta byl zařazen vždy jen jeden kmen daného druhu, který byl izolován z příslušného materiálu jako první.

3.2.2 Fenotypová detekce produkce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL

Výběr izolátů z nemocničního prostředí a fenotypová detekce produkce ESBL enzymů byla provedena stejně jako je uvedeno v kapitole 3.1.2.

3.2.3 Fenotypová detekce produkce širokospektrých beta-laktamáz typu AmpC

Výběr izolátů z nemocničního prostředí a fenotypová detekce produkce AmpC enzymů byla provedena postupem uvedeným v kapitole 3.1.3.

3.3 Nejčastější bakteriální druhy s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v klinickém materiálu osob v komunitním prostředí

3.3.1 Sběr, izolace a identifikace bakterií

Bakterie byly izolovány z rektálních výtěrů komunitních pacientů žijících na území Olomouckého kraje v období od 1. 3. 2010 do 1. 5. 2010. Od každé osoby byl zpracován jen jeden rektální výtěr. Výtěry byly inokulovány na selektivní ChromIDTM ESBL agar (BioMérieux, Francie). Identifikace vypěstovaných enterobakterií a jejich uchování bylo totožné s postupem popsaným v kapitole 3.1.1.3.

3.3.2 Fenotypová detekce produkce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL

Všechny izolované enterobakterie byly podrobeny fenotypové analýze pro detekci produkce ESBL enzymů shodné s popisem v kapitole 3.1.2.

3.3.3 Fenotypová detekce produkce širokospektrých beta-laktamáz typu AmpC

Všechny izolované enterobakterie byly podrobeny fenotypové analýze pro detekci produkce AmpC enzymů, která již byla popsána v kapitole 3.1.3.

3.4 Genetická analýza širokospektrých beta-laktamáz

Přítomnost genů kódujících jednotlivé typy širokospektrých beta-laktamáz byla stanovena u výše uvedených skupin izolátů enterobakterií získaných z klinického materiálu pacientů hospitalizovaných ve FNOL, od komunitních pacientů z oblasti Olomouckého kraje a bakterií izolovaných z nemocničního prostředí v letech 2008 až 2010. Podrobnější údaje, blíže specifikující jednotlivé skupiny enterobakterií, pacientů, materiálů a časové období, ve kterém probíhal sběr, uvádí kapitoly 3.1.1.2, 3.1.1.3, 3.2.1 a 3.3.1. Genetické analýze byly podrobeny izoláty, u nichž byl pozitivní ESBL nebo AmpC diskový test (provedení testů viz kapitoly 3.1.2 a 3.1.3).

3.4.1 Genetická detekce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL

3.4.1.1 Izolace DNA

DNA pro genetickou detekci širokospektrých beta-laktamáz byla izolována z bakteriální kultury čerstvě narostlé na Mueller-Hintonově agaru (MH agar) (Trios, s.r.o., Česká republika). Jednotlivé bakteriální izoláty, které byly uloženy v hlubokomrazícím boxu, byly nejprve přeočkovány na MH agar a kultivovány aerobně při 37 °C 18 hodin. Následně byly 1-2 vyrostlé kolonie resuspendovány ve 100 µl sterilní destilované vody, buněčná suspenze byla zahřáta po dobu 10 minut na 95 °C a poté centrifugována 2 minuty při 13000×g. Získaný supernatant obsahující DNA byl použit jako templát pro polymerázovou řetězovou reakci.

3.4.1.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla zaměřena na detekci genů kódujících beta-laktamázy typu TEM, SHV a CTX-M, které se u enterobakterií vyskytují nejčastěji. Použity byly primerové páry (syntetizované firmou East Port Praha, Česká republika) specificky rozpoznávajících geny *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M} [77-79]. Sekvence použitých oligonukleotidů je přehledně uvedena v tabulce 1. PCR probíhala v objemu 25 µl a byla provedena na přístroji Robocycler Gradient 96 Temperature Cycler (Stratagene, Kanada). Složení reakční směsi a podmínky amplifikace shrnují tabulky 2 a 3. Pro ověření průběhu PCR byly použity kmeny *Escherichia coli* s produkcí TEM-1 a CTX-M-15 enzymu (Ústav mikrobiologie LF UP v Olomouci) a *Klebsiella pneumoniae* CCM 4985 produkující beta-laktamázu SHV-18 (CCM Brno, Česká republika) jako pozitivní kontroly. Jako negativní kontrola sloužila zkumavka, kde byla templátová DNA nahrazena PCR vodou.

Tabulka 1: Nukleotidové sekvence primerů pro detekci genů *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M}

cílový gen	primer	sekvence nukleotidů 5'→3'	velikost produktu	literatura
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-F	ATGAGTATTCAACATTTCCG	858 bp	77
	TEM-R	CCAATGCTTAATCAGTGAGG		
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F	CTTTACTCGCCTTTATCG	475 bp	78
	SHV-R	TCCCGCAGATAAATCACCA		
<i>bla</i> _{CTX-M}	MU1	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	593 bp	79
	MU2	TGGGTRAARTARGTSACCAGA		

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro detekci jednotlivých genů *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M}

složky reakce	zásobní koncentrace	konečná koncentrace
10× pufr (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25 °C), 500 mM KCl, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl ₂) (Top-Bio, Česká republika)	10×	1×
dNTP's (Promega, USA)	25 mM	0,2 mM
primer F (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	1 μM
primer R (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	1 μM
Taq polymeráza (Top-Bio, Česká republika)	5U/ml	1U/reakce
PCR voda (Top-Bio, Česká republika)	-	-
templátová DNA	-	-

Tabulka 3: Podmínky PCR pro detekci genů *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M}

fáze reakce	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	95 °C	5 min	1
denaturace	95 °C	1 min	30
nasednutí primerů (annealing)	58 °C	1 min	
amplifikace	72 °C	1 min	
závěrečná amplifikace	72 °C	5 min	1

3.4.1.3 Elektroforetická analýza amplikonů

Produkty PCR byly elektroforeticky rozděleny v 1,5% (w/v) agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem (1 μg.ml⁻¹) (Sigma-Aldrich, Německo) a zdokumentovány prostřednictvím zobrazovacího zařízení (Transluminátor DiscoveryTM (UltraLum, USA)). Gel byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství agarózy (Serva, Německo) v TBE pufru (Biotech, Česká republika), zahřátím a následným ochlazením. Separace probíhala po zatuhnutí gelu v TBE pufru v elektroforetických vaničkách Easy-Cast (model B2, Owl; Thermo Scientific, Velká Británie). Velikost separovaných amplikonů byla stanovena srovnáním s DNA markerem s velikostí fragmentů v rozsahu 200-1500 bp (Top-Bio, Česká republika).

3.4.1.4 Polymorfismus délky restričních fragmentů

U izolátů s pozitivní PCR reakcí detekující geny *bla*_{TEM} nebo *bla*_{SHV} byla provedena restriční analýza. TEM produkty byly štěpeny enzymy *MseI*, *Sau3AI*, *MspI* a *HphI* (NewEngland BioLabs, USA) (odhalení nejčastějších mutací v pozicích 104, 164, 238 a 240 zodpovídajících za rozšíření spektra účinku u beta-laktamáz typu TEM) a výsledné fragmenty DNA byly separovány ve 2,5% (w/v) agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem (1 µg.ml⁻¹) [77]. Pro restrikci SHV produktů byly použity endonukleázy *NheI*, *DdeI* a *SacII* (NewEngland BioLabs, USA; Fermentas, Kanada) pro záchyt případných mutací v pozicích 238, 35 a 179 nejčastěji zodpovídajících za vznik ESBL fenotypu u beta-laktamáz SHV typu [78]. Rozštěpené fragmenty DNA byly rozděleny ve 2% (w/v) agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem (1 µg.ml⁻¹).

3.4.2 Genetická detekce širokospektrých beta-laktamáz typu AmpC

3.4.2.1 Izolace DNA

Příprava DNA pro PCR detekující geny kódující beta-laktamázy je podrobněji popsána v kapitole 3.4.1.1.

3.4.2.2 Polymerázová řetězová reakce

Přítomnost genů kódujících beta-laktamázy typu AmpC byla stanovena pomocí dvou multiplex PCR reakcí, umožňujících současnou detekci typu ACC společně s typem CIT a DHA, nebo typu EBC spolu s typy FOX a MOX. Pro PCR byly použity primery (syntetizované firmou East Port Praha, Česká republika) umožňující detekci AmpC beta-laktamáz patřících do jedné ze šesti výše popsaných skupin [80]. Reakce byla provedena v objemu 25 µl na přístroji Robocycler Gradient 96 Temperature Cycler (Stratagene, Kanada). Sekvence primerů, koncentrace jednotlivých složek reakce a reakční podmínky jsou přehledně shrnuty v tabulkách 4 až 6. Jako pozitivní kontrola byl použit kmen *Klebsiella pneumoniae* produkující beta-laktamázu typu DHA a kmen *Escherichia coli* s produkcí enzymu EBC (Ústav mikrobiologie LF UP v Olomouci). U negativní kontroly byla do zkumavky k reakční směsi pipetována místo templátové DNA jen PCR voda.

Tabulka 4: Nukleotidové sekvence primerů pro detekci genů *bla*_{AmpC}

cílový gen	primer	sekvence nukleotidů 5'→3'	velikost produktu	literatura
MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 až CMY-11	MOX-F	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520 bp	80
	MOX-R	CACATTGACATAGGTGTGGTGC		
LAT-1 až LAT-4, CMY-2 až CMY-7, BIL-1	CIT-F	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462 bp	
	CIT-R	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC		
DHA-1, DHA-2	DHA-F	AACTTTCACAGGTGTGCTGGG T	405 bp	
	DHA-R	CCGTACGCATACTGGCTTTGC		
ACC	ACC-F	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346 bp	
	ACC-R	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC		
MIR-1T, ACT-1	EBC-F	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302 bp	
	EBC-R	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT		
FOX-1 až FOX-5b	FOX-F	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190 bp	
	FOX-R	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG		

Tabulka 5: Složení reakční směsi multiplex PCR pro detekci jednotlivých genů *bla*_{AmpC}

složky reakce	zásobní koncentrace	konečná koncentrace
10× pufr (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25 °C), 500 mM KCl, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl ₂) (Top-Bio, Česká republika)	10×	1×
dNTP's (Promega, USA)	25 mM	0,2 mM
primer F ₁ (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	1 μM
primer F ₂ (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	1 μM
primer F ₃ (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	1 μM
primer R ₁ (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	1 μM
primer R ₂ (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	1 μM
primer R ₃ (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	1 μM
Taq polymeráza (Top-Bio, Česká republika)	5U/ml	1U/reakce
PCR voda (Top-Bio, Česká republika)	-	-
templátová DNA	-	-

pozn.: byly provedeny 2 multiplex PCR s následujícími kombinacemi primerů:
multiplex 1: ACC, CIT, DHA; multiplex 2: EBC, FOX, MOX

Tabulka 6: Podmínky PCR pro detekci genů *bla*_{AmpC}

fáze reakce	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	95 °C	5 min	1
denaturace	95 °C	40 s	30
nasednutí primerů (annealing)	64 °C	40 s	
amplifikace	72 °C	60 s	
závěrečná amplifikace	72 °C	10 min	1

3.4.2.3 Elektroforetická analýza amplikonů

Produkty PCR reakce detekující geny kódující AmpC beta-laktamázy byly analyzovány stejně jako produkty PCR zaměřené na detekci genů kódujících ESBL enzymy, postup je uveden v kapitole 3.4.1.3.

3.5 Stanovení identity/podobnosti bakteriálních izolátů s produkcí širokospektrých beta-laktamáz

3.5.1 Izolace DNA pro restrikční analýzu

DNA byla izolována z bakteriální kultury inkubované aerobně po dobu 18 hodin při 37 °C ve 20 ml Mueller-Hintonova bujónu. Buňky byly centrifugovány při 4000×g 10 minut a pelet byl třikrát promyt promývacím roztokem (10 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 M NaCl; pH 7,5). Následně byly bakterie naředěny promývacím roztokem na optickou denzitu 0,2-0,3 při 600 nm a 10 ml této suspenze bylo centrifugováno. Buňky byly resuspendovány ve 100 µl promývacího roztoku, smíchány se stejným objemem 2 % „low melting point“ agarózy (Bio-Rad, USA) a napipetovány do tvořítka bločků. Hotové agarózové bločky byly přeneseny do 1 ml lyzačního roztoku (6 mM Tris/HCl, 100 mM EDTA, 1 M NaCl, 0,5% BRIJ, 0,2% Na-deoxycholát, 0,5% laurylsarkosin; pH 7,6) s lysozymem (0,5 mg.ml⁻¹) (Sigma-Aldrich, Německo) a inkubovány přes noc při 37 °C. Následně byly bločky přeneseny do 1 ml deproteinizačního roztoku s proteinázou K (0,5 mg.ml⁻¹) (Thermo Fisher Scientific, Finsko) a inkubovány při 55 °C 24 hodin. Proteináza K byla inaktivována promytím bločků v 10 ml TE pufru (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA; pH 7,8) 24 hodin při 4 °C.

3.5.2 Restrikce celogenomové DNA

Z každého agarózového bločku (obsahujícího DNA a připraveného dle postupu v kapitole 3.5.1) byl ukrojen tenký proužek (o tloušťce asi 1 mm), který byl přenesen do 50 μ l restrikčního roztoku (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 50 mM NaCl, 0,01% BSA) s 15 U restrikční endonukleázy *Xba*I (Takara Biotechnology, Japonsko) a inkubován po dobu 24 h při 37 °C.

3.5.3 Pulzní gelová elektroforéza

Agarózové proužky s naštěpenou DNA byly přeneseny do jamek 1,2% agarózového gelu připraveného rozpuštěním 1,2 g „Pulsed Field Certified“ agarózy (Bio-Rad, USA) ve 100 ml 0,5 \times TBE pufru (Bio-Rad, USA), zahřátím a následným ochlazením. Získané fragmenty DNA byly separovány pulzní gelovou elektroforézou (PFGE) prostřednictvím přístroje CHEF-DRII System (Bio-Rad, USA). Pro analýzu byly zvoleny parametry 24 h, 6V.cm⁻¹ a pulzní časy 2-35 s. Gel s rozdělenými fragmenty DNA byl inkubován 90 minut ve vodní lázni s ethidium bromidem (0,75 μ g.ml⁻¹) (Sigma-Aldrich, Německo). Po obarvení byly výsledné restrikční profily zdokumentovány pomocí zobrazovacího zařízení (Transluminátor DiscoveryTM (UltraLum, USA)) a porovnány prostřednictvím počítačového programu GelCompar II (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

3.6 Stanovení výskytu PMQR genů u ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae*

3.6.1 Výběr ESBL-pozitivních izolátů pro analýzu

Pro stanovení výskytu plazmidem kódovaných genů podílejících se na rezistenci k fluorochinolonům byly bakterie vybrány ze sbírky enterobakterií vytvořené na Ústavu mikrobiologie FNOL a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v letech 2008 až 2011, u nichž byla fenotypově detekována produkce ESBL enzymů (fenotypová detekce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL viz kapitola 3.1.2). Pro analýzu bylo vybráno celkem 100 izolátů *Klebsiella pneumoniae* získaných z klinického materiálu (bronchoalveolární laváž, endosekret, hemokultura, likvor, moč, sputum, stěry a výtěry z krku, nosu, perianální oblasti a ran) pacientů hospitalizovaných ve FNOL v období

od 1. 1. 2008 do 31. 1. 2011. Zvoleny byly izoláty od pacientů hospitalizovaných na jednotkách intenzivní péče několika klinik (II. interní; III. interní; dětská; hematologická; I. chirurgická; kardiologická; neurochirurgická; neurologická; KARIM a JIP novorozeneckého oddělení), přičemž od každého pacienta byl zařazen pouze jeden izolát jmenovaného druhu.

3.6.2 Genetická detekce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL

3.6.2.1 Izolace DNA

DNA pro genetickou detekci širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL byla izolována postupem popsaným v kapitole 3.4.1.1.

3.6.2.2 Multiplex PCR

Pro detekci genů *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M} [79, 81-83] byla použita multiplex PCR se specifickými primery, jejichž sekvence přehledně uvádí tabulka 7. Složení reakční směsi a podmínky PCR shrnují tabulky 8 a 9. PCR probíhala v objemu 25 μl a byla provedena na přístroji Rotor-Gene 6000 (QIAGEN, Německo). Pro ověření průběhu PCR byly použity pozitivní kontroly v podobě DNA izolované z kmenů se známou produkcí ESBL enzymů, a to konkrétně z kmene *Escherichia coli* s produkcí TEM-1 a CTX-M-15 enzymu (Ústav mikrobiologie LF UP v Olomouci) a *Klebsiella pneumoniae* CCM 4985 produkující beta-laktamázu SHV-18 (CCM Brno, Česká republika). Jako negativní kontrola byla místo templátové DNA do zkumavky s reakční směsí pipetována pouze PCR voda.

Tabulka 7: Nukleotidové sekvence primerů pro multiplex PCR detekující geny *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M}

cílový gen	primer	sekvence nukleotidů 5'→3'	velikost produktu	literatura
<i>bla</i> _{TEM}	TEM2-F	TTCTTGAAGACGAAAGGGC	1150 bp	82
	TEM2-R	ACGCTCAGTGGAAACGAAAAC		
<i>bla</i> _{SHV}	SHV2-F	TCAGCGAAAAACACCTTG	475 bp	81
	SHV2-R	TCCCGCAGATAAATCACCA		
<i>bla</i> _{CTX-M}	MU1	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	593 bp	79
	MU2	TGGGTRAARTARGTSACCAGA		

Tabulka 8: Složení reakční směsi pro multiplex PCR detekující geny *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M}

složky reakce	zásobní koncentrace	konečná koncentrace
10× pufr bez MgCl ₂ (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25 °C), 500 mM KCl, 1% Triton X-100) (Top-Bio, Česká republika)	10×	1×
LCGreen Plus+ (Idaho Technology, USA)	10×	0,4×
MgCl ₂ (Top-Bio, Česká republika)	25 mM	2 mM
dNTP's (Promega, USA)	25 mM	0,2 mM
primer TEM2-F (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	0,8 μM
primer SHV2-F (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	0,8 μM
primer MU1 (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	0,4 μM
primer TEM2-R (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	0,8 μM
primer SHV2-R (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	0,8 μM
primer MU2 (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	0,4 μM
Taq polymeráza (Top-Bio, Česká republika)	5U/ml	2U/reakce
PCR voda (Top-Bio, Česká republika)	-	-
templátová DNA	-	-

Tabulka 9: Podmínky multiplex PCR detekující geny *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M}

fáze reakce	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	95 °C	7 min	1
denaturace	95 °C	30 s	35
nasednutí primerů (annealing)	58 °C	30 s	
amplifikace	72 °C	60 s	
závěrečná amplifikace	72 °C	7 min	1

3.6.2.3 Analýza PCR amplikonů

PCR produkty byly charakterizovány na základě analýzy křivky tání (high resolution melting analyse - HRMA) provedené na přístroji Rotor-Gene 6000 (QIAGEN, Německo). Analýza probíhala v teplotním rozmezí 75 až 99 °C s rychlostí teplotního přechodu 0,1°C za sekundu. Výsledky byly zpracovány prostřednictvím počítačových programů Rotor-Gene operating software a Rotor-Gene ScreenClust HRM Software (QIAGEN, Německo).

3.6.2.4 Polymorfismus délky restričních fragmentů

Restriční analýza je podrobněji popsána v kapitole 3.4.1.4.

3.6.3 Genetická detekce *qnr* genů

3.6.3.1 Izolace DNA

Postup izolace DNA je uveden v kapitole 3.4.1.1.

3.6.3.2 Multiplex PCR

Pro PCR byly použity specifické primerové páry umožňující stanovení přítomnosti nejčastěji se vyskytujících genů *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* [84, 85]. PCR byla provedena v objemu 25 μ l na přístroji Robocycler Gradient 96 Temperature Cycler (Stratagene, Kanada). Podrobnější podmínky provedení PCR a nukleotidové sekvence použitých primerů jsou popsány v tabulkách 10 až 12.

Tabulka 10: Nukleotidové sekvence primerů pro detekci genů *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*

cílový gen	primer	sekvence nukleotidů 5'→3'	velikost produktu	literatura
<i>qnrA</i>	qnrA-F	TTCTCACGCCAGGATTTG	521 bp	84
	qnrA-R	CCATCCAGATCGGCAAA		
<i>qnrB</i>	qnrB-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	261 bp	85
	qnrB-R	TTYGCBGYCGCCAGTCG		84
<i>qnrS</i>	qnrS-F	GTGAGTAATCGTATGTACTTTTGC	169 bp	
	qnrS-R	AAACACCTCGACTTAAGTCT		

Tabulka 11: Složení reakční směsi pro multiplex PCR detekující geny *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*

složky reakce	zásobní koncentrace	konečná koncentrace
10× pufr (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25 °C), 500 mM KCl, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl ₂) (Top-Bio, Česká republika)	10×	1×
dNTP's (Promega, USA)	25 mM	0,2 mM
primer qnrA-F (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	0,4 μM
primer qnrB-F (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	0,8 μM
primer qnrS-F (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	0,4 μM
primer qnrA-R (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	0,4 μM
primer qnrB-R (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	0,8 μM
primer qnrS-R (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	0,4 μM
Taq polymeráza (Top-Bio, Česká republika)	5U/ml	1U/reakce
PCR voda (Top-Bio, Česká republika)	-	-
templátová DNA	-	-

Tabulka 12: Podmínky multiplex PCR detekující geny *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*

fáze reakce	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	95 °C	10 min	1
denaturace	95 °C	60 s	30
nasednutí primerů (annealing)	60 °C	40 s	
amplifikace	72 °C	60 s	
závěrečná amplifikace	72 °C	5 min	1

3.6.3.3 Elektroforetická analýza ampliconů

PCR produkty byly separovány prostřednictvím gelové elektroforézy v 1,5% (w/v) agarózovém gelu stejně jako je uvedeno v kapitole 3.4.1.3.

3.6.4 Charakterizace plazmidů

3.6.4.1 Izolace plazmidové DNA

Plazmidy byly izolovány z bakteriálních kolonií narostlých na MH agaru (Trios, s.r.o., Česká republika) po 18 hodinové aerobní inkubaci při 37 °C. 1 až 2 vyrostlé kolonie byly resuspendovány v 90 μl roztoku RI (25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA-NaOH

(pH 8,0), 1% glukóza). K připravené bakteriální suspenzi bylo přidáno 180 μ l roztoku RII (0,2 M NaOH, 1% SDS) a vzorky byly 5-10 minut převráceny při laboratorní teplotě. Následovalo přidání 135 μ l ledově vychlazeného roztoku RIII (5 M CH_3COOK , ledová CH_3COOH 11,5% (w/v)) a inkubace 5 minut při laboratorní teplotě. Po přidání 180 μ l chloroformu a 180 μ l upraveného fenolu (Fluka Chemika, Švýcarsko) byly vzorky centrifugovány 8 minut při 10000 \times g. K vodní fázi bylo přidáno 350 μ l isopropanolu a 36 μ l 3 M octanu sodného a po 5 minutách byly zkumavky zcentrifugovány 15 minut při 10000 \times g. Pelet na dně zkumavky byl dvakrát promyt 300 μ l ledově vychlazeného 96% ethanolu a resuspendován ve 20 μ l TE pufru (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA-NaOH (pH 8,0)) s 1 μ l RNázy.

3.6.4.2 Typizace plazmidů pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR-based replicon typing)

Zařazení plazmidů do jedné z 18 hlavních inkompatibilních skupin (FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Iy, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F_{rep} , FII_A) nejčastěji se vyskytujících u čeledi *Enterobacteriaceae* bylo provedeno pomocí PCR se specifickými primery ohraničujícími oblasti replikačních počátků [86]. Jednotlivé primerové páry byly rozděleny do skupin umožňujících současnou detekci několika typů replikačních počátků najednou. Celkem bylo provedeno 5 multiplex PCR (multiplex 1: HI1, HI2, I1- Iy; multiplex 2: L/M, N, X; multiplex 3: FIA, FIB, W; multiplex 4: P, Y, FIC; multiplex 5: A/C, T, FII_A) a 3 simplex PCR (K; B/O; F_{rep}). Do reakce o celkovém objemu 25 μ l byla jako templát použita DNA izolovaná výše popsaným způsobem (kapitola 3.6.4.1). PCR probíhaly na přístroji Robocycler Gradient 96 Temperature Cycler (Stratagene, Kanada). Sekvence nukleotidů použitých primerových párů, složení reakčních směsí a podmínky, za kterých byly reakce provedeny, jsou přehledně uvedeny v tabulkách 13 až 16.

Tabulka 13: Nukleotidové sekvence primerů pro typizaci plazmidů

cílový gen	primer	sekvence nukleotidů 5' → 3'	velikost produktu	literatura
parA-parB	HI1-F	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	471 bp	86
	HI1-R	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA		
iterony	HI2-F	TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC	644 bp	
	HI2-R	GGCTCACATCGTTGTCATCCT		
RNAI	I1-F	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	139 bp	
	I1-R	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT		
ori γ	X-F	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	376 bp	
	X-R	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC		
repA, B, C	L/M-F	GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG	785 bp	
	L/M-R	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG		
repA	N-F	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	559 bp	
	N-R	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC		
iterony	FIA-F	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462 bp	
	FIA-R	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG		
repA	FIB-F	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	702 bp	
	FIB-R	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT		
repA	W-F	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG	242 bp	
	W-R	GGTGCGCGGCATAGAACCGT		
repA	Y-F	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	765 bp	
	Y-R	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT		
iterony	P-F	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	534 bp	
	P-R	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC		
repA2	FIC-F	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	262 bp	
	FIC-R	TTCTCCTCGTCGCCAACTAGAT		
repA	A/C-F	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	465 bp	
	A/C-R	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT		
repA	T-F	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	750 bp	
	T-R	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC		
repA	FII _S -F	CTGTGTAAGCTGATGGC	270 bp	
	FII _S -R	CTCTGCCACAACTTCAGC		
RNAI/repA	F _{repB} -F	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	270 bp	
	F _{repB} -R	GAAGATCAGTCACACCATCC		
RNAI	K/B-F	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	160 bp	
	K-R	TCTTTCACGAGCCCCGCAAA		
RNAI	B/O-R	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	159 bp	

Tabulka 14: Složení reakční směsi multiplex PCR pro typizaci plazmidů

složky reakce	zásobní koncentrace	konečná koncentrace
10× pufr bez MgCl ₂ (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25 °C), 500 mM KCl, 1% Triton X-100) (Top-Bio, Česká republika)	10×	1×
MgCl ₂ (Top-Bio, Česká republika)	25 mM	1,5 mM
dNTP's (Promega, USA)	25 mM	0,2 mM
primer F ₁ (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	1 μM
primer F ₂ (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	1 μM
primer F ₃ (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	1 μM
primer R ₁ (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	1 μM
primer R ₂ (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	1 μM
primer R ₃ (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	1 μM
Taq polymeráza (Top-Bio, Česká republika)	5U/ml	1U/reakce
PCR voda (Top-Bio, Česká republika)	-	-
templátová DNA	-	-

pozn.: bylo provedeno 5 multiplex PCR s následujícími kombinacemi primerů: multiplex 1: HI1, HI2, I1-Iγ; multiplex 2: L/M, N, X; multiplex 3: FIA, FIB, W; multiplex 4: P, Y, FIC; multiplex 5: A/C, T, FII_A)

Tabulka 15: Složení reakční směsi simplex PCR pro typizaci plazmidů

složky reakce	zásobní koncentrace	konečná koncentrace
10× pufr bez MgCl ₂ (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25 °C), 500 mM KCl, 1% Triton X-100) (Top-Bio, Česká republika)	10×	1×
MgCl ₂ (Top-Bio, Česká republika)	25 mM	1,5 mM
dNTP's (Promega, USA)	25 mM	0,2 mM
primer F (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	1 μM
primer R (East Port Praha, Česká republika)	100 μM	1 μM
Taq polymeráza (Top-Bio, Česká republika)	5U/ml	1U/reakce
PCR voda (Top-Bio, Česká republika)	-	-
templátová DNA	-	-

pozn.: simplex PCR probíhala s primery K; B/O; F_{rep}

Tabulka 16: Podmínky PCR pro typizaci plazmidů

fáze reakce	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	95 °C	5 min	1
denaturace	95 °C	60 s	30
nasednutí primerů (annealing)	60 °C	30 s	
amplifikace	72 °C	60 s	
závěrečná amplifikace	72 °C	5 min	1

pozn.: reakční podmínky byly shodné pro všech 5 multiplex PCR a simplex PCR s primery K nebo B/O; pro simplex PCR s primerovým párem F_{rep} byla použita teplota annealingu 52 °C

3.6.4.3 Elektroforetická analýza amplikonů

Elektroforetická separace PCR produktů umožňující detekovat velikost jednotlivých amplikonů probíhala v 1,5% (w/v) agarózovém gelu stejně jako je popsáno v kapitole 3.4.1.3.

3.6.5 Stanovení identity/podobnosti izolátů

Izolace DNA, její příprava, zpracování a provedení vlastní restrikční analýzy pro porovnání podobnosti/identity jednotlivých izolátů *Klebsiella pneumoniae* byla provedena stejně, jako je popsáno v kapitole 3.5.

3.6.6 Stanovení citlivosti k antibiotikům

Citlivost testovaných izolátů k antibiotikům byla stanovena standardní diluční mikrometodou [70, 71].

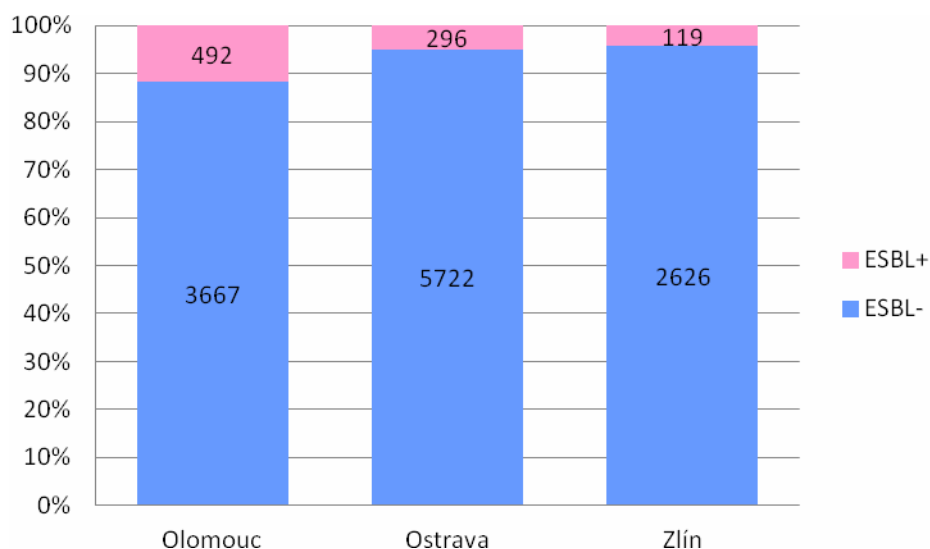
4 VÝSLEDKY

4.1 Nejčastější bakteriální druhy s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v klinickém materiálu hospitalizovaných pacientů

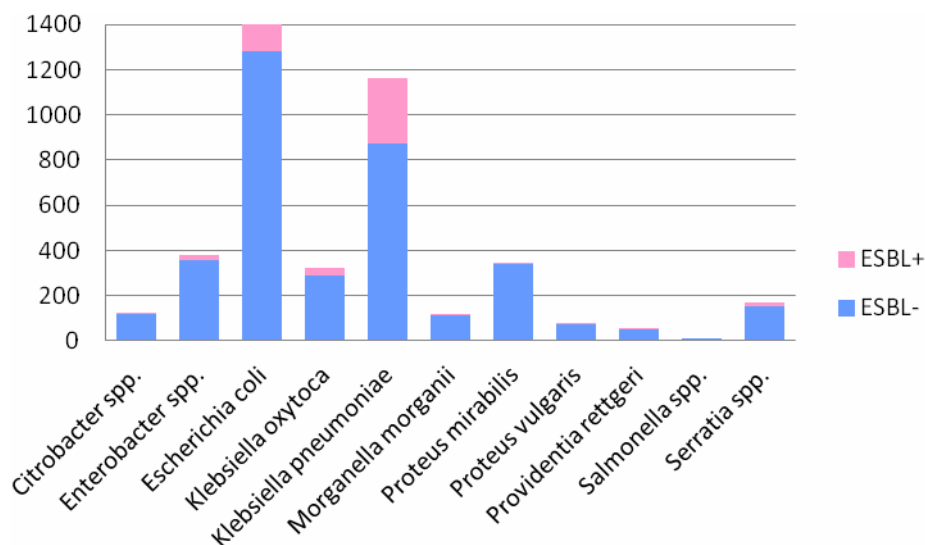
4.1.1 ESBL-pozitivní enterobakterie z klinického materiálu hospitalizovaných pacientů

V období od 1. 1. do 31. 12. 2009 bylo ve třech zdravotnických zařízeních (Fakultní nemocnici Olomouc, Fakultní nemocnici Ostrava a Krajské nemocnici T. Bati ve Zlíně) analyzováno celkem 12922 izolátů z čeledi *Enterobacteriaceae*. Fenotypové testy odhalily produkci ESBL enzymů u 907 z nich, což představuje 7,0 %. Prevalence ESBL-pozitivních izolátů mezi jednotlivými nemocnicemi se pohybovala v rozmezí 4,3-11,8 %. Nejčastěji byla produkce ESBL-enzymů zaznamenána u druhů *Klebsiella pneumoniae* (9,8-24,5 %), *Klebsiella oxytoca* (1,3-11,4 %) a *Escherichia coli* (2,5-8,3 %). Tyto tři druhy představují v celkovém počtu 93,5 % všech ESBL-pozitivních enterobakterií. Absolutní počty vyšetřovaných bakterií v jednotlivých zdravotnických zařízeních a podíl ESBL-pozitivních izolátů znázorňuje graf 2. Druhovému zastoupení shrnují grafy 3 až 5.

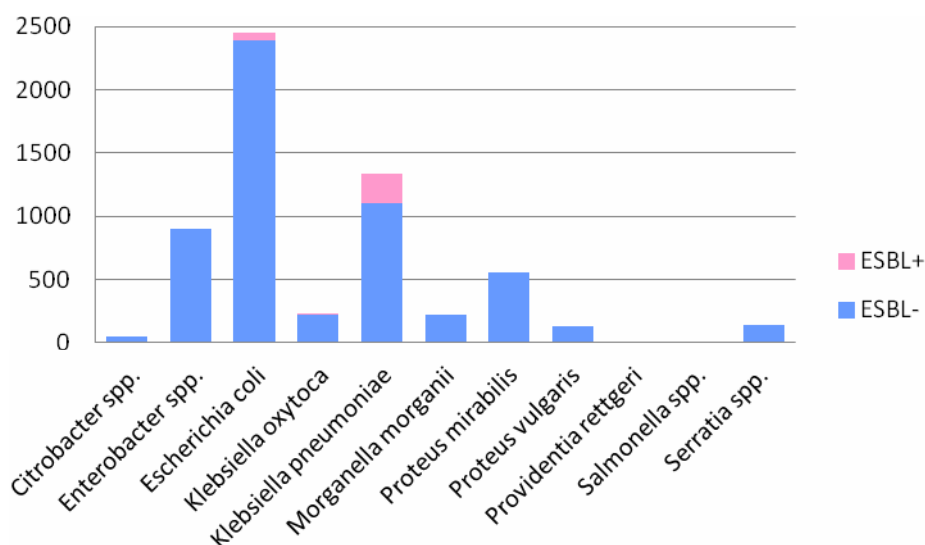
Graf 2: Počet enterobakterií izolovaných v období 1. 1. - 31. 12. 2009 ve třech zdravotnických zařízeních (Fakultní nemocnice Olomouc, Fakultní nemocnice Ostrava, Krajská nemocnice T. Bati ve Zlíně) a procentuelní vyjádření podílu ESBL-pozitivních izolátů



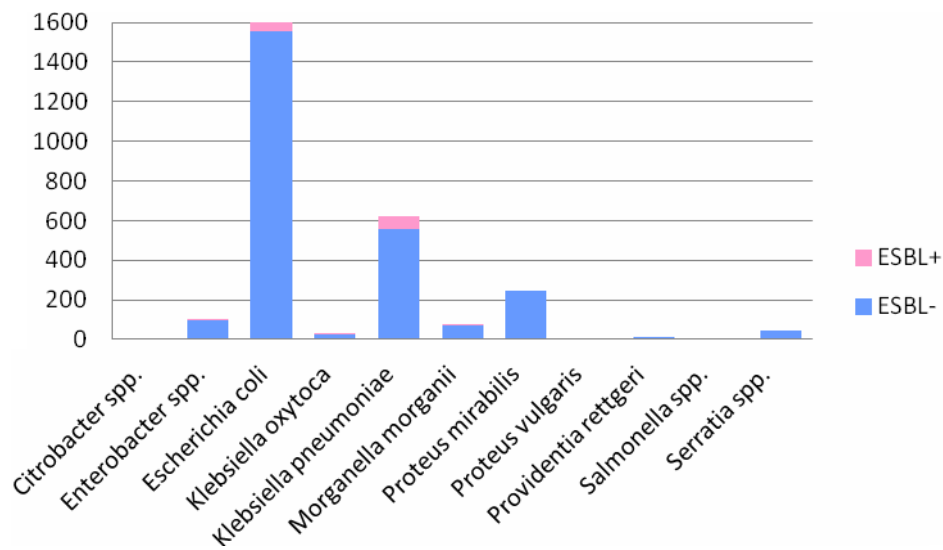
Graf 3: Druhové zastoupení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* včetně izolátů s produkcí enzymů typu ESBL v klinickém materiálu pacientů hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Olomouc



Graf 4: Druhové zastoupení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* včetně izolátů s produkcí enzymů typu ESBL v klinickém materiálu pacientů hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Ostrava



Graf 5: Druhové zastoupení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* včetně izolátů s produkcí enzymů typu ESBL v klinickém materiálu pacientů hospitalizovaných v Krajské nemocnici T. Bati ve Zlíně



Získané výsledky umožnily rovněž porovnání výskytu ESBL-pozitivních enterobakterií mezi jednotlivými odděleními. Ze tří výše zmíněných druhů, u nichž byla produkce ESBL enzymů zaznamenána nejčastěji, byly ESBL-pozitivní izoláty *Klebsiella pneumoniae* a *Klebsiella oxytoca* častěji zachyceny u pacientů hospitalizovaných na jednotkách intenzivní péče 53,3 % (JIP)/46,7 % (standardní oddělení), resp. 71,4 %/28,6 %. Naopak v případě druhu *Escherichia coli* se izoláty s produkcí ESBL vyskytovaly s vyšší frekvencí na standardních lůžkových odděleních 31,6 %/68,4 %.

V rámci vyšetřovaných klinických materiálů byly enterobakterie produkující enzymy typu ESBL ve větší míře izolovány z moče. Více než třetina (37,3 %) zachycených ESBL-pozitivních bakterií byla izolována právě z tohoto typu materiálu. V Krajské nemocnici T. Bati ve Zlíně pak podíl ESBL-pozitivních izolátů z moče přesáhl dokonce polovinu (52,9 %) z celkového počtu ESBL-pozitivních bakterií detekovaných v tomto zdravotnickém zařízení. Mezi klinickými materiály, z nichž byly izolovány bakterie produkující beta-laktamázy typu ESBL, byly častěji zastoupeny také vzorky z dolních cest dýchacích (12,6-19,3 %), stěry z ran (6,8-11,4 %) a hemokultury (4,1-9,2 %).

4.1.2 Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy z klinického materiálu novorozenců

Z klinického materiálu dětí hospitalizovaných na Novorozeneckém oddělení FNOL bylo v období 1. 4. 2008 - 1. 4. 2010 zachyceno celkem 1526 izolátů čeledi *Enterobacteriaceae*. Podrobnější údaje shrnuje tabulka 17. K nejčastěji izolovaným bakteriím patřily druhy *Escherichia coli* (29,3 %), *Klebsiella pneumoniae* (26,4 %) a *Klebsiella oxytoca* (25,0 %). Tyto vyjmenované druhy zaujímají 80,7 % z celkového počtu izolátů.

Tabulka 17: Přehled izolovaných enterobakterií na Novorozeneckém oddělení Fakultní nemocnice Olomouc v období 1. 4. 2008 - 1. 4. 2010

druh	počet izolátů (celkový počet)	ESBL-pozitivní izoláty	AmpC-pozitivní izoláty
<i>Citrobacter</i> spp.	82	0	2
<i>Enterobacter</i> spp.	156	3	6
<i>Escherichia coli</i>	447	24	6
<i>Klebsiella oxytoca</i>	382	14	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	403	13	2
<i>Morganella morganii</i>	6	0	1
<i>Proteus mirabilis</i>	3	0	0
<i>Serratia</i> spp.	47	1	0
celkem	1526	55	17

Z celkového počtu 1526 analyzovaných enterobakterií byla produkce beta-laktamáz typu ESBL fenotypově prokázána u 55 izolátů, což představuje 3,6 %. AmpC diskový test byl pozitivní v 17 případech (1,1 %). Mezi ESBL-pozitivními izoláty významně převažoval druh *Escherichia coli* (43,6 %). Zachycené enterobakterie produkující enzymy AmpC patřily zejména do druhů *Enterobacter* spp. (35,3 %) a *Escherichia coli* (35,3 %).

4.1.3 Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy v gastrointestinálním traktu hospitalizovaných osob

Ve sledovaném období 1. 3. 2010 - 1. 5. 2010 bylo analyzováno celkem 378 rektálních výtěrů od pacientů hospitalizovaných ve FNOL. Růst na selektivním médiu ChromIDTM ESBL byl zaznamenán u 35 z celkového počtu 378 vzorků. Následná fenotypová detekce potvrdila celkem 31 ESBL-pozitivních a 1 AmpC-pozitivní izolát patřící

do čeledi *Enterobacteriaceae*. Mezi ESBL-pozitivními izoláty jednoznačně převažovaly druhy *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae*, které představují 90,3 %. Jediná AmpC-pozitivní enterobakterie patřila k druhu *Klebsiella oxytoca*. Podrobnější druhové zastoupení zobrazuje tabulka 18.

Tabulka 18: Přehled ESBL- a AmpC-pozitivních izolátů zachycených v GIT osob hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Olomouc v období 1. 3. 2010 - 1. 5. 2010

druh	ESBL+ (počet)	AmpC+ (počet)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0
<i>Escherichia coli</i>	9	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19	0
Celkem	31	1

Získaná data tak ve sledovaném období odhalila v gastrointestinálním traktu osob (GIT) hospitalizovaných ve FNOL 8,2 % prevalenci bakterií produkujících beta-laktamázy typu ESBL a 0,3 % prevalenci AmpC-pozitivních enterobakterií.

4.2 Nejčastější bakteriální druhy s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v nemocničním prostředí

V průběhu dvou měsíců (listopad-prosinec 2010) byl na 10 místech lůžkového zařízení Kliniky anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny (KARIM) a na 10 místech Oddělení intenzivní péče chirurgických oborů (IPCHO) ve FNOL odebrán vzduch pro posouzení bakteriální kontaminace a dále bylo provedeno 60 stěrů z povrchů a 60 stěrů od personálu (stěr pravé ruky bez rukavice, výtěr obou nosních dírek). Z celkového počtu 140 vzorků bylo v 18 z nich zachyceno 21 bakteriálních izolátů z čeledi *Enterobacteriaceae*, 16 enterobakterií (1 izolát *Escherichia coli*; 3 *Enterobacter cloacae*; 2 *Klebsiella oxytoca*; 9 *Klebsiella pneumoniae*; 1 *Proteus vulgaris*) bylo izolováno ze stěrů z prostředí, zbývajících 5 izolátů (2 *Citrobacter koseri*; 1 *Escherichia coli*; 1 *Klebsiella oxytoca*; 1 *Klebsiella pneumoniae*) bylo nalezeno ve stěrech od personálu. Modifikovaný Double Disk Synergy test odhalil produkci ESBL enzymů u 4 izolátů. AmpC diskový test byl

pozitivní v 7 případech. Druhové zastoupení ESBL- a AmpC-positivních izolátů z prostředí shrnuje tabulka 19.

Tabulka 19: Druhové zastoupení ESBL- a AmpC-positivních enterobakterií zachycených v prostředí KARIM a IPCHO v období listopad-prosinec 2010

číslo	druh	typ vzorku		odd.	fenotyp
M1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	stěr z povrchu	parapet u hlavy pacienta	IPCHO	ESBL
M2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	stěr z povrchu	dřez výpust	IPCHO	ESBL
M3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	stěr z povrchu	umývadlo výpust, pokoj 6	KARIM	AmpC
M4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	stěr z povrchu	umývadlo výpust, pokoj 7	KARIM	AmpC
M5	<i>Enterobacter cloacae</i>	stěr z povrchu	roztok pro proplach, pokoj 6	KARIM	AmpC
M6	<i>Enterobacter cloacae</i>	stěr z povrchu	roztok pro proplach, postel 8	KARIM	AmpC
M8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	stěr z povrchu	madla postele, postel 8	KARIM	ESBL
M10	<i>Enterobacter cloacae</i>	stěr z povrchu	šibenice na hadice pacienta, postel 8	KARIM	AmpC
M11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	stěr z povrchu	roztok pro proplach, postel 9	KARIM	AmpC
M12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	stěr z povrchu	ovladač dávkovací pumpy, postel 9	KARIM	AmpC
M13	<i>Klebsiella oxytoca</i>	stěr z povrchu	dřez výpust pokoj 5	KARIM	ESBL

číslo - číslo vzorku; IPCHO - oddělení intenzivní péče chirurgických oborů; KARIM - klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny; odd. - oddělení

4.3 Nejčastější bakteriální druhy s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v klinickém materiálu osob v komunitním prostředí

Studie zaměřená na výskyt bakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy v GIT ambulantních pacientů proběhla od 1. 3. 2010 do 1. 5. 2010 souběžně se sledováním výskytu těchto bakterií v GIT pacientů hospitalizovaných ve FNOL (kapitola 4.1.3). V této době bylo zpracováno celkem 901 rektálních výtěrů od osob z komunitního prostředí olomouckého regionu. Nárůst na selektivním médiu ChromID™ ESBL byl patrný u 41 vzorků, z nichž u 39 byla fenotypově prokázána produkce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL (29 izolátů) nebo AmpC (10 izolátů). Ve sledovaném období tak prevalence ESBL- a AmpC-positivních bakterií v GIT komunitních pacientů dosáhla 3,2 % resp. 1,1 %. Naprostou většinu identifikovaných izolátů produkujících enzymy typu ESBL představovali zástupci druhu *Escherichia coli* (89,7 %). V rámci AmpC-positivních bakterií byly častěji zastoupeny izoláty *Escherichia coli* (30,0 %) a *Citrobacter freundii* (30,0 %).

Přehled všech ESBL- a AmpC-pozitivních izolátů zachycených v GIT ambulantních pacientů uvádí tabulka 20.

Tabulka 20: Přehled ESBL- a AmpC-pozitivních izolátů zachycených v GIT pacientů z komunitního prostředí olomouckého regionu v období 1. 3. 2010-1. 5. 2010

druh	ESBL+ (počet)	AmpC+ (počet)
<i>Citrobacter freundii</i>	0	3
<i>Citrobacter werkmanii</i>	0	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	2
<i>Escherichia coli</i>	26	3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	0
<i>Morganella morganii</i>	0	1
Celkem	29	10

4.4 Genetická analýza širokospektrých beta-laktamáz

4.4.1 Genetická detekce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL

4.4.1.1 Bakterie produkující ESBL beta-laktamázy z klinického materiálu novorozenců

Podrobnější genetická analýza byla provedena u 32 z 55 bakteriálních izolátů s ESBL fenotypem (kapitola 4.1.2), přičemž od jednoho novorozence byly zařazeny maximálně dva izoláty, získané z různých klinických materiálů. PCR reakce prokázala přítomnost genu *bla*_{CTX-M}, kódujícího beta-laktamázy typu CTX-M se širokým spektrem účinku u 27 (84,4 %) ze 32 analyzovaných ESBL-pozitivních izolátů, čímž byl u nich potvrzen výsledek předchozího fenotypového stanovení. Gen *bla*_{SHV} byl detekován u 12 izolátů a gen *bla*_{TEM} u 15. Podrobnější přehled záchytu *bla* genů uvádí tabulka 21.

Restrikční analýza PCR produktů TEM, zaměřená na odhalení nejčastějších změn v pozicích 104, 164, 238 a 240, které jsou zodpovědné za rozšíření spektra účinku u beta-laktamázy typu TEM, neprokázala žádnou z těchto mutací ani u jednoho izolátu. V případě SHV produktů byla mutace, spojená s rozšířením spektra účinku příslušné beta-laktamázy SHV, potvrzena prostřednictvím restrikční analýzy pouze u izolátu E33 (*Klebsiella pneumoniae*), u něhož byla detekována v pozici 35 a 238.

Tabulka 21: Výskyt *bla* genů kódujících jednotlivé typy beta-laktamázy u ESBL-pozitivních enterobakterií z klinického materiálu novorozenců

číslo vzorku	druh	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}
E3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-
E4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-
E5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-
E6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+
E7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+
E8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-
E9	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+
E10	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+
E11	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+
E12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+
E13	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+
E14	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+
E15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+
E16	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+
E17	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+
E18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+
E19	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+
E20	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+
E21	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	+
E22	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	+
E23	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+
E24	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+
E25	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+
E26	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+
E27	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+
E28	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+
E29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+
E30	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+
E31	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+
E32	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+
E33	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	-
E34	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+

* - mutace rozšiřující spektrum účinku detekovaná pomocí restriční analýzy

4.4.1.2 Bakterie produkující ESBL beta-laktamázy v gastrointestinálním traktu hospitalizovaných osob

Genetická analýza 31 bakterií s ESBL fenotypem izolovaných z rektálních výtěrů pacientů hospitalizovaných ve FNOL (kapitola 4.1.3) odhalila přítomnost genu *bla*_{CTX-M} u 29 izolátů (93,5 %), přičemž u 28 se jednalo o geny kódující beta-laktamázy ze skupiny CTX-M-1 a pouze v jednom případě byl detekován gen pro enzym ze skupiny CTX-M-9.

Gen *bla_{SHV}* byl detekován ve 20 případech (64,5 %) a gen *bla_{TEM}* u 23 izolátů (74,2 %). Zastoupení *bla* genů u jednotlivých izolátů uvádí tabulka 22. U jednoho zástupce *Klebsiella oxytoca* nebyl ESBL fenotyp prostřednictvím PCR potvrzen.

Tabulka 22: Výskyt *bla* genů kódujících jednotlivé typy beta-laktamáz u enterobakterií z GIT hospitalizovaných osob

číslo vzorku	druh	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{CTX-M-1-like}</i>	<i>bla_{CTX-M-9-like}</i>
3753/B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
3944/B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
3945/B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
4010/C a	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
4010/C b	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-
4011/C	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
4148/C	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	-
4159/C	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-	-
4184/C	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	-
4248/B	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-
4259/B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
4316/B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
4330/C	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+
4473/C	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
4563/A	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+*	+	-
5003/C	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
5053/C	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+*	-	-
5188/B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
5802/A a	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	+	-
5802/A b	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-
5866/A	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	-
6642/B	<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	+	-
6916/C	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	-
6963/C	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
7144/B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
7240/A	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
7399/B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
7473/C	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
7534/C a	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	-
7534/C b	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
8155/B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-

*- mutace rozšiřující spektrum účinku detekovaná pomocí restriční analýzy

Restriční analýza PCR produktů zaměřená na detekci nejčastějších mutací, které jsou zodpovědné za rozšíření spektra účinku příslušné beta-laktamázy, neodhalila

v případě produktů TEM žádnou z těchto změn ani u jednoho izolátu. U SHV produktů byla mutace spojená s rozšířením spektra účinku prokázána prostřednictvím restriční analýzy u dvou izolátů *Klebsiella pneumoniae* (4563/A a 5053/C).

4.4.1.3 Bakterie s produkcí ESBL beta-laktamáz v nemocničním prostředí

ESBL-pozitivní bakterie, zachycené v prostředí KARIM a IPCHO (kapitola 4.2), byly podrobeny genetické analýze zaměřené na detekci jednotlivých typů beta-laktamáz. Ta odhalila přítomnost genu bla_{TEM} u 3, genu bla_{SHV} u 2 a genu bla_{CTX-M} u všech 4 izolátů. U jednoho ze dvou izolátů *Klebsiella pneumoniae* nesoucích gen bla_{SHV} byla na základě restriční analýzy detekována mutace v pozici 238, spojená s rozšířením spektra účinku příslušné beta-laktamázy. U genů bla_{TEM} nebyly mutace rozšiřující spektrum účinku prostřednictvím analýzy délky restričních fragmentů prokázány. Všechny detekované geny bla_{CTX-M} patřily do skupiny CTX-M-1. Zastoupení bla genů u jednotlivých izolátů shrnuje tabulka 23.

Tabulka 23: Výskyt bla genů kódujících jednotlivé typy beta-laktamáz u enterobakterií z prostředí KARIM a IPCHO

číslo vzorku	druh	bla_{TEM}	bla_{SHV}	bla_{CTX-M}
M1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+
M2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	+
M8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+*	+
M13	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	+

* - mutace rozšiřující spektrum účinku detekovaná pomocí restriční analýzy

4.4.1.4 Bakterie s produkcí ESBL beta-laktamáz v klinickém materiálu osob v komunitním prostředí

Přítomnost bla genů byla analyzována u 29 bakterií s ESBL fenotypem izolovaných z rektálních výtěrů komunitních pacientů (kapitola 4.3). PCR detekovala bla_{CTX-M} u 28 izolátů (96,6 %), bla_{SHV} u 2 izolátů (6,9 %) a bla_{TEM} v 11 případech (37,9 %). U jednoho izolátu *Klebsiella oxytoca* nebyly výsledky fenotypové analýzy geneticky potvrzeny. Zastoupení genů u jednotlivých izolátů je přehledně uvedeno v tabulce 24.

Tabulka 24: Výskyt *bla* genů kódujících jednotlivé typy beta-laktamáz u enterobakterií z GIT pacientů z komunitního prostředí

číslo vzorku	druh	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M-1 like}	<i>bla</i> _{CTX-M-9 like}
924	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-
942	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+
983	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	-
998	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-	-
1002	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	-
1077	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+
1078	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+
1173	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	-
1206	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+
1307	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-
1320/1	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-
1435	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+
1437	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
1452	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+
1455	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+
1489	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+
1492	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	-
1554	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+
1589	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	-
1696	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+
1724	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	-
1760/2	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+
1761	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	-
1776	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+
1795	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	-
1807/1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
1812	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+
1855	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	-
1881/1	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+

restrikční analýza nepotvrdila žádnou mutaci rozšiřující spektrum účinku příslušné beta-laktamázy

4.4.2 Genetická detekce širokospektrých beta-laktamáz typu AmpC

4.4.2.1 Bakterie produkující AmpC beta-laktamázy z klinického materiálu novorozenců

Multiplex PCR, specializovaná na detekci AmpC beta-laktamáz, potvrdila AmpC fenotyp u 12 ze 17 zachycených izolátů (kapitola 4.1.2). U každého z nich byl detekován pouze jeden PCR produkt. U osmi izolátů byl zaznamenán amplicon o velikosti 302 bp, což se shoduje s beta-laktamázami typu EBC. PCR produkt o délce 462 bp spojený s typem CIT

byl zachycen u dvou izolátů, v jednom případě vznikl 405 bp velký amplifikační produkt odpovídající AmpC beta-laktamáze DHA typu a u jednoho kmene ampikon dlouhý 520 bp odpovídající MOX typu. U zbývajících pěti izolátů *Escherichia coli* byla multiplex PCR negativní. Pulzní gelová elektroforéza (postup popsán v kapitole 3.5) ukázala, že se jedná o identické izoláty se shodným restričním profilem, přičemž tři z této pětičky pocházely z různých materiálů jednoho novorozence a zbývajících dva od dalších dětí. Přehled jednotlivých typů AmpC beta-laktamáz u enterobakterií z klinického materiálu novorozenců shrnuje tabulka 25. Osekvenování promotorové oblasti chromozomálního genu *ampC* u izolátu A2 (*Escherichia coli*), zastupujícího výše jmenovanou pětičku s negativním výsledkem PCR, odhalilo mutace v pozicích -88, -82, -42, -18, -1, +32, +58, +110, které jsou spojeny se zvýšenou expresí a následnou nadprodukcí AmpC enzymu. To znamená, že i tomto případě byl geneticky potvrzen výsledek předcházejícího fenotypového stanovení.

Tabulka 25: Výskyt a typy AmpC beta-laktamáz u enterobakterií z klinického materiálu novorozenců

číslo vzorku	druh	<i>bla</i> _{AmpC}	typ AmpC
A1	<i>Citrobacter werkmanii</i>	+	CIT
A2	<i>Escherichia coli</i>	-	-
A3	<i>Escherichia coli</i>	-	-
A4	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	EBC
A5	<i>Escherichia coli</i>	-	-
A6	<i>Morganella morganii</i>	+	DHA
A7	<i>Escherichia coli</i>	-	-
A8	<i>Escherichia coli</i>	-	-
A9	<i>Citrobacter freundii</i>	+	CIT
A10	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	EBC
A11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	EBC
A12	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	EBC
A14	<i>Escherichia coli</i>	+	EBC
A15	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	EBC
A16	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	EBC
A17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	MOX
A18	<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	EBC

4.4.2.2 Bakterie produkující AmpC beta-laktamázy v gastrointestinálním traktu hospitalizovaných osob

Ve sledovaném období 1. 3. 2010 - 1. 5. 2010 byl v rámci 378 vyšetřovaných vzorků hospitalizovaných pacientů (kapitola 4.1.3) zaznamenán pouze jeden izolát s AmpC fenotypem. Jednalo se o bakterii *Klebsiella oxytoca*, u níž následně provedená genetická analýza odhalila přítomnost genu kódujícího AmpC beta-laktamázu typu DHA.

4.4.2.3 Bakterie s produkcí AmpC beta-laktamáz v nemocničním prostředí

Geny kódující enzymy typu AmpC byly zaznamenány celkem u všech 7 izolátů, u nichž byl pozitivní diskový test (kapitola 4.2). Ve všech případech (3 izoláty *Enterobacter cloacae*, 4 *Klebsiella pneumoniae*) byl detekován gen pro beta-laktamázu typu EBC.

4.4.2.4 Bakterie s produkcí AmpC beta-laktamáz v klinickém materiálu osob v komunitním prostředí

Detekce AmpC beta-laktamáz s využitím multiplex PCR potvrdila AmpC fenotyp u 8 z 10 izolátů. U každého izolátu byl zachycen pouze jeden PCR produkt. Nejčastěji byl detekován ampikon o délce 462 bp odpovídající beta-laktamázám typu CIT. V jednom případě byl zaznamenán PCR produkt odpovídající typu DHA a jedenkrát typ EBC. U dvou izolátů byla multiplex PCR opakovaně negativní. Výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulce 26.

Tabulka 26: Výskyt a typy AmpC beta-laktamáz u enterobakterií z GIT pacientů z komunitního prostředí

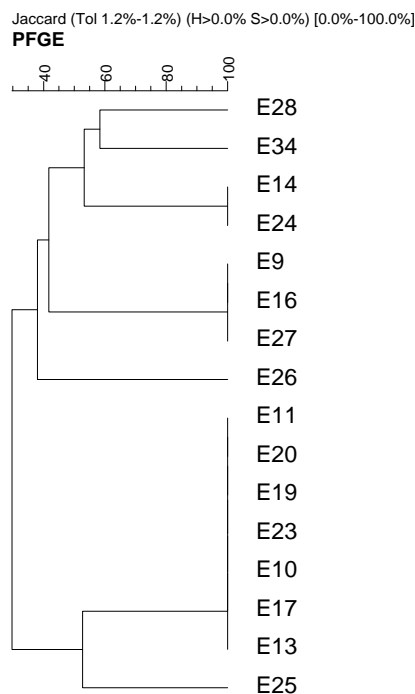
číslo vzorku	druh	<i>bla</i> _{AmpC}	typ AmpC
1229	<i>Citrobacter werkmanii</i>	+	CIT
1293	<i>Citrobacter freundii</i>	+	CIT
1349	<i>Escherichia coli</i>	+	CIT
1485	<i>Escherichia coli</i>	+	CIT
1661/1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-
1685	<i>Morganella morganii</i>	+	DHA
1710	<i>Citrobacter freundii</i>	+	CIT
1713	<i>Citrobacter freundii</i>	+	CIT
1743/1	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	EBC
1760/1	<i>Escherichia coli</i>	-	-

4.5 Stanovení identity/podobnosti bakteriálních izolátů s produkcí širokospektrých beta-laktamáz

4.5.1 Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy z klinického materiálu novorozenců

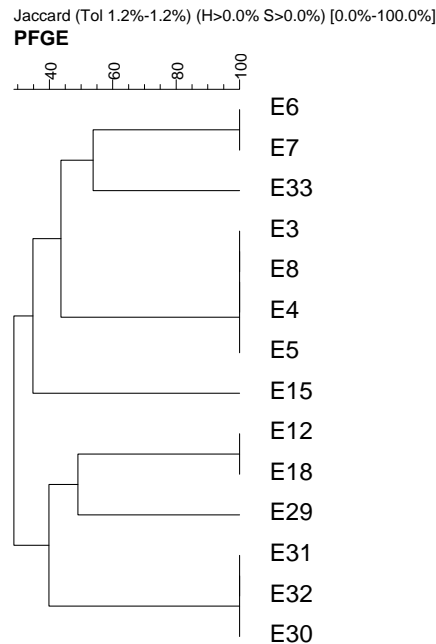
Pulzní gelová elektroforéza (PFGE) odhalila mezi 32 analyzovanými ESBL-pozitivními enterobakteriemi (kapitola 4.4.1.1) celkem 16 geneticky odlišných ESBL-pozitivních kmenů (7 kmenů *Escherichia coli*, 7 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Klebsiella oxytoca*, 1 *Enterobacter cloacae*). Z 16 analyzovaných izolátů *Escherichia coli* měly čtyři jedinečný restriční profil, dále byla nalezena 1 dvojice, 1 trojice a 7 izolátů se shodným profilem. Identické izoláty byly ve všech případech získány od různých pacientů a poukazují tak na klonální šíření (obr. 3). Mezi 14 izoláty *Klebsiella pneumonie* byla 1 čtveřice, 1 trojice a 2 dvojice s identickým restričním profilem; zbývající tři byly geneticky odlišné (obr. 4).

Obrázek 3: Dendrogram ESBL-pozitivních izolátů *Escherichia coli* z klinického materiálu novorozenců



Legenda: horizontální osa - podobnost bakteriálních izolátů v %; vertikální osa - označení izolátů

Obrázek 4: Dendrogram ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* z klinického materiálu novorozenců

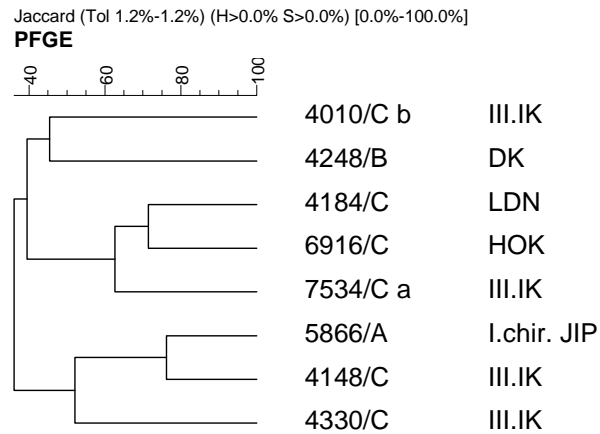


Legenda: horizontální osa - podobnost bakteriálních izolátů v %; vertikální osa - označení izolátů

4.5.2 Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy v gastrointestinálním traktu hospitalizovaných osob

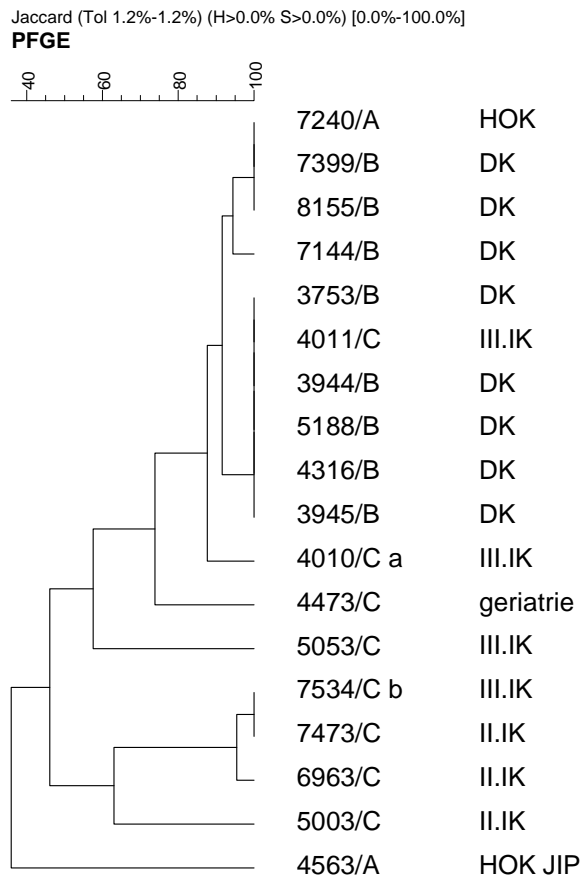
Podobnost, resp. identita kmenů byla pomocí PFGE analyzována celkem u 30 z 31 ESBL-pozitivních izolátů z GIT nemocničních pacientů (kapitola 4.1.3). Do porovnávání nebyl zahrnut izolát *Enterobacter aerogenes*, který byl jediný svého druhu. Výsledky srovnání jsou demonstrovány ve formě dendrogramů na obrázcích 5 a 6. Z 9 izolátů *Escherichia coli* mělo 8 jedinečný restriční profil, v jednom případě se ani opakovaně nepodařilo izolovat DNA v dostatečné kvalitě. Naopak v rámci druhu *Klebsiella pneumoniae* bylo nalezeno několik zcela identických izolátů a několik s velice podobným restričním profilem, který s vysokou pravděpodobností odpovídá jedné genetické změně. Shodný profil byl zaznamenán u 1 šestice, 1 trojice a 1 dvojice izolátů *Klebsiella pneumoniae*. Vzhledem k tomu, že identické izoláty byly ve všech případech získány od různých pacientů, poukazuje tato situace na klonální šíření. U jednoho izolátu *Klebsiella pneumoniae* se stejně jako v případě *Escherichia coli* opakovaně nepodařilo získat hodnotitelný restriční profil. Dva izoláty *Klebsiella oxytoca* byly geneticky odlišné.

Obrázek 5: Dendrogram ESBL-pozitivních izolátů *Escherichia coli* z gastrointestinálního traktu hospitalizovaných osob



Legenda: horizontální osa - podobnost bakteriálních izolátů v %; vertikální osa - označení izolátů a zkratky klinik (DK - dětská klinika; HOK - hemato-onkologická klinika; I. chir. JIP - jednotka intenzivní péče I. chirurgické kliniky; III. IK - III. interní klinika; LDN - léčebna dlouhodobě nemocných)

Obrázek 6: Dendrogram ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* z gastrointestinálního traktu hospitalizovaných osob



Legenda: horizontální osa - podobnost bakteriálních izolátů v %; vertikální osa - označení izolátů a zkratky klinik (DK - dětská klinika; HOK - hemato-onkologická klinika; HOK JIP - jednotka intenzivné péče hemato-onkologické kliniky; II. IK - II. interní klinika; III. IK - III. interní klinika)

4.5.3 Bakterie s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v nemocničním prostředí

ESBL- a AmpC-pozitivní izoláty z nemocničního prostředí (kapitola 4.2) byly podrobeny restriční analýze genomové DNA následované PFGE pro porovnání podobnosti resp. identity. Do tohoto srovnání byly zahrnuty i kmeny stejných druhů enterobakterií produkující širokospektré beta-laktamázy izolované z klinického materiálu pacientů hospitalizovaných na příslušných odděleních v období listopad až prosinec 2010. Seznam ESBL- a AmpC-pozitivních bakterií izolovaných z klinického materiálu pacientů ve sledovaném období přehledně uvádí tabulka 27.

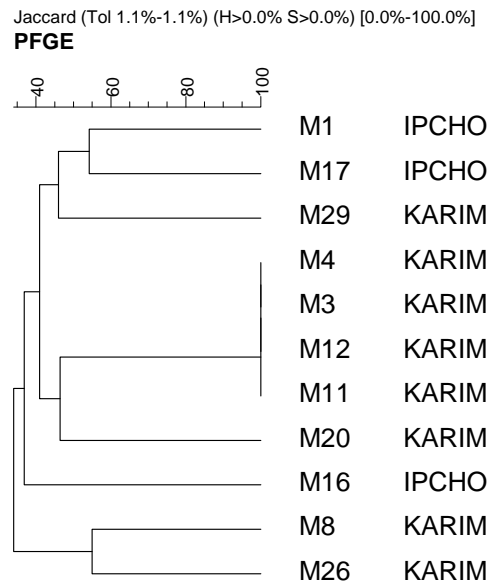
Tabulka 27: Přehled ESBL- a AmpC-pozitivních izolátů od pacientů

číslo vzorku	druh	typ materiálu	oddělení	fenotyp	typ beta-laktamázy
M16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	hemokultura	IPCHO	ESBL	CTX-M, SHV
M17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	stěr/výtěr rána	IPCHO	ESBL	CTX-M, SHV
M20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	kanyla	KARIM	ESBL	SHV*
M22	<i>Enterobacter cloacae</i>	stěr/výtěr dutina ústní	KARIM	AmpC	EBC
M23	<i>Enterobacter cloacae</i>	bronchoalveolární laváž	IPCHO	AmpC	EBC
M24	<i>Enterobacter cloacae</i>	endosekret	KARIM	AmpC	EBC
M25	<i>Enterobacter cloacae</i>	endosekret	KARIM	AmpC	EBC
M26	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	moč	KARIM	AmpC	DHA
M29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	stěr/výtěr rána	KARIM	ESBL	CTX-M, SHV, TEM
M34	<i>Enterobacter cloacae</i>	endosekret	KARIM	AmpC	EBC

* - mutace rozšiřující spektrum účinku detekovaná pomocí restriční analýzy; IPCHO - oddělení intenzivní péče chirurgických oborů; KARIM - klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny

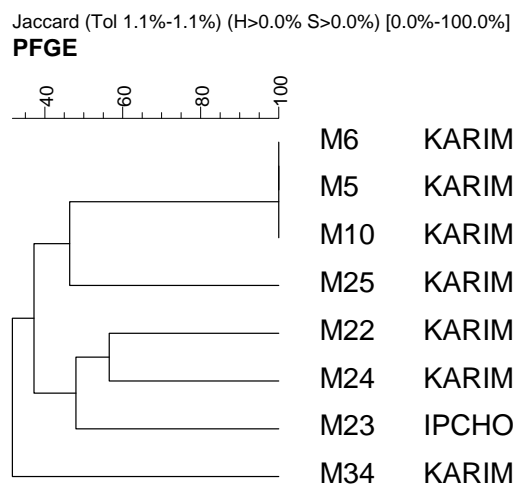
Mezi 11 izoláty *Klebsiella pneumoniae* (6 z prostředí/ 5 z materiálu pacientů - tabulka 19 a 27) byla na základě PFGE identifikována čtveřice se shodným restričním profilem, zbývajících 7 izolátů bylo geneticky odlišných. Identické izoláty byly zachyceny také v rámci druhu *Enterobacter cloacae* (3/5), kde byla nalezena shoda u jedné trojice. U obou druhů byly identické izoláty objeveny pouze mezi bakteriemi z nemocničního prostředí. Ve všech případech se jednalo o stěry z povrchů. Shoda mezi izoláty z prostředí a bakteriemi izolovanými od pacientů ve sledovaném období nebyla nalezena. Výsledky jsou demonstrovány ve formě dendrogramů na obrázcích 7 a 8.

Obrázek 7: Dendrogram ESBL- a AmpC-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* z nemocničního prostředí



Legenda: horizontální osa - podobnost bakteriálních izolátů v %; vertikální osa - označení izolátů a oddělení (IPCHO - oddělení intenzivní péče chirurgických oborů; KARIM - klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny)

Obrázek 8: Dendrogram AmpC-pozitivních izolátů *Enterobacter* spp. z nemocničního prostředí



Legenda: horizontální osa - podobnost bakteriálních izolátů v %; vertikální osa - označení izolátů a oddělení (IPCHO - oddělení intenzivní péče chirurgických oborů; KARIM - klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny)

4.6 Stanovení výskytu PMQR genů u ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae*

4.6.1 Genetická detekce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL

Souhrnné výsledky genetické analýzy zaměřené na detekci nejčastějších genů kódujících širokospektré beta-laktamázy u ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* z klinického materiálu pacientů hospitalizovaných ve FNOL v letech 2008 až 2011 (kapitola 3.6.1) uvádí tabulka 28. Multiplex PCR potvrdila přítomnost *bla*_{SHV} genu u 99 izolátů. U více než poloviny izolátů (59,0 %) byl zaznamenán současný výskyt všech tří genů *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} a *bla*_{TEM}. Izoláty, u kterých byl detekován pouze gen *bla*_{SHV}, nebo geny *bla*_{SHV} a *bla*_{TEM} byly podrobeny restriční analýze s využitím enzymu *Nhe*I. Ta odhalila mutaci v pozici 238 zodpovědnou za rozšíření spektra účinku příslušné beta-laktamázy u 15 z 20 izolátů nesoucích jen gen kódující beta-laktamázu typu SHV a u jednoho ze dvou izolátů s geny pro enzymy SHV a TEM.

Tabulka 28: Genetická analýza ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae*

<i>bla</i> geny	počet izolátů
SHV	20
SHV + TEM	2
SHV + CTX-M	18
SHV + CTX-M + TEM	59

4.6.2 Genetická detekce *qnr* genů

Multiplex PCR zaměřená na geny kódující proteiny *qnr* ukázala vysoký podíl těchto genů mezi ESBL-pozitivními izoláty. Konkrétně bylo detekováno 56 izolátů *Klebsiella pneumoniae* nesoucích současně s geny pro beta-laktamázu také gen *qnr*. Ve všech případech se jednalo o typ *qnr*B. Většina (55/56) z těchto izolátů nesla současně gen pro beta-laktamázu CTX-M a 43 z nich také pro enzym TEM.

4.6.3 Charakterizace plazmidů

Z 18 hlavních inkompatibilních skupin (Inc skupin) plazmidů nejčastěji se vyskytujících u čeledi *Enterobacteriaceae* byly mezi ESBL-pozitivními izoláty *Klebsiella pneumoniae* prostřednictvím PCR zachyceny plazmidy patřící do devíti různých inkompatibilních skupin. Nejvíce byly zastoupeny plazmidy ze skupiny FII_s, jež byly detekovány u 52 izolátů, z nichž u 46 (88,5 %) byl zachycen gen *qnrB*. Druhou početnější skupinu tvořily izoláty nesoucí plazmidy typu A/C, kterých bylo 19. Zaznamenány byly rovněž plazmidy ze skupin Y, P, F_{rep}, L/M, FIA, FIB a FIC. U 10 izolátů byly podle výsledků PCR současně přítomny plazmidy ze dvou různých skupin. Naopak u 16 izolátů se pomocí této metody nepodařilo plazmidy zařadit do žádné skupiny. Kompletní přehled zastoupení plazmidů a jejich zařazení do Inc skupiny u jednotlivých izolátů včetně přítomnosti genu *qnrB* a typu beta-laktamázy uvádí tabulka 29.

Tabulka 29: Přehled zastoupení plazmidů a jejich zařazení do Inc skupiny u jednotlivých izolátů *Klebsiella pneumoniae* včetně přítomnosti genu *qnrB* a typu beta-laktamázy

ozn	číslo	materiál	JIP- klinika/oddělení	typ beta-laktamázy	geny <i>qnr</i>	plazmidy
1	K22-81	sputum	II. interní	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
2	K2-80	moč	II. interní	TEM, SHV	-	A/C
3	K24-19	stěr/výtěr krk	III. interní	SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
4	K21-65	endosekret	III. interní	SHV	-	-
5	K24-06	stěr/výtěr krk	III. interní	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	-
6	K21-21	moč	dětská	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
7	K23-53	stěr/výtěr perianální	dětská	SHV	-	A/C
8	K10-07	stěr/výtěr perianální	dětská	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	P
9	K10-10	BAL	dětská	TEM, SHV, CTX-M	-	FII _S
10	K10-32	stolice	dětská	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
11	K10-37	stolice	dětská	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S , L/M
12	K1-16	kanyla	dětská	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
13	K19-44	stěr/výtěr rána	dětská	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
14	K19-51	stěr/výtěr krk	dětská	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	L/M
15	K19-53	moč	dětská	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
16	K24-18	stolice	dětská	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
17	K1-08	krk	HOK	SHV, CTX-M	-	F _{rep}
18	K1-55	krk	HOK	TEM, SHV, CTX-M	-	-
19	K1-64	stolice	HOK	SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
20	K21-03	stěr/výtěr krk	HOK	TEM, SHV, CTX-M	-	FII _S
21	K21-17	moč	HOK	SHV	-	Y
22	K21-35	hemokultura	HOK	TEM, SHV, CTX-M	-	FII _S
23	K21-51	stěr/výtěr krk	HOK	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
24	K23-66	stěr/výtěr krk	HOK	SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S , Y
25	K23-71	hemokultura	HOK	SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S , Y
26	K10-18	moč	HOK	SHV, CTX-M	-	P
27	K2-17	stolice	HOK	SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	A/C
28	K2-59	stolice	HOK	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
29	K-01	moč	HOK	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
30	K21-04	stěr/výtěr rána	I. chirurgická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
31	K22-59	stěr/výtěr rána	I. chirurgická	SHV*	-	A/C, Y
32	K24-01	hemokultura	I. chirurgická	TEM, SHV, CTX-M	-	Y
33	K22-07	stěr/výtěr rána	kardiologická	TEM, SHV, CTX-M	-	-
34	K2-27	endosekret	kardiologická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
35	K2-37	moč	kardiologická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
36	K1-09	uretra	kardiologická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
37	K1-63	BAL	kardiologická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
38	K21-05	endosekret	kardiologická	SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
39	K21-64	kanyla	kardiologická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	Y
40	K10-19	endosekret	KARIM	SHV*	-	A/C, Y
41	K10-20	endosekret	KARIM	TEM, CTX-M	<i>qnrB</i>	FIA, FIB, F _{rep}
42	K10-21	endosekret	KARIM	SHV*	-	A/C, Y
43	K10-29	endosekret	KARIM	TEM, SHV, CTX-M	-	-

ozn	číslo	materiál	JIP- klinika/oddělení	typ beta-laktamázy	geny <i>qnr</i>	plazmidy
44	K10-34	endosekret	KARIM	TEM, SHV, CTX-M	-	-
45	K10-35	endosekret	KARIM	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	Y
46	K10-41	endosekret	KARIM	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
47	K10-50	endosekret	KARIM	SHV	-	A/C, Y
48	K10-64	endosekret	KARIM	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
49	K10-66	endosekret	KARIM	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
50	K2-08	moč	KARIM	TEM, SHV*	-	A/C, FII _S , Y
51	K2-71	moč	KARIM	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
52	K1-13	endosekret	KARIM	TEM, SHV, CTX-M	-	-
53	K1-14	endosekret	KARIM	-	-	-
54	K1-35	moč	KARIM	SHV	<i>qnrB</i>	FII _S , Y
55	K1-78	endosekret	KARIM	TEM, SHV, CTX-M	-	-
56	K-50	krk	KARIM	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	-
57	K-07	endosekret	KARIM	TEM, SHV, CTX-M	-	-
58	K-29	moč	KARIM	TEM, SHV, CTX-M	-	FII _S
59	K-46	endosekret	KARIM	TEM, SHV, CTX-M	-	-
60	K-58	endosekret	KARIM	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
61	K19-11	kanyla - PMK	KARIM	SHV, CTX-M	-	-
62	K19-32	endosekret	KARIM	SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	Y
63	K20-78	endosekret	neurochirurgická	SHV, CTX-M	-	-
64	K21-01	BAL	neurochirurgická	SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
65	K21-20	endosekret	neurochirurgická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
66	K22-26	stolice	novorozenecké	SHV*	-	Y, A/C
67	K2-18	BAL	neurochirurgická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
68	K2-25	endosekret	neurochirurgická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
69	K2-72	endosekret	neurochirurgická	SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
70	K1-21	BAL	neurochirurgická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
71	K-06	BAL	neurochirurgická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
72	K22-50	BAL	neurochirurgická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	-
73	K23-02	endosekret	neurochirurgická	SHV, CTX-M	-	-
74	K23-43	likvor	neurochirurgická	SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
75	K10-70	moč	neurochirurgická	SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
76	K10-73	endosekret	neurochirurgická	TEM, SHV, CTX-M	-	-
77	K2-52	krk	neurochirurgická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
78	K21-27	BAL	neurochirurgická	TEM, SHV, CTX-M	-	-
79	K21-28	endosekret	neurochirurgická	SHV, CTX-M	-	FII _S , FIC
80	K1-01	spojivky	neurologická	SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
81	K1-37	kanyla	neurologická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
82	K1-53	krk	neurologická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
83	K1-54	kanyla	neurologická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
84	K-13	moč	neurologická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
85	K-14	hemokultura	neurologická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
86	K-16	BAL	neurologická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
87	K22-74	kanyla	neurologická	TEM, SHV, CTX-M	-	-
88	K2-06	kanyla	neurologická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
89	K2-38	kanyla-sputum	neurologická	TEM, SHV, CTX-M	<i>qnrB</i>	FII _S
90	K21-52	stěr/výtěr krk+nos	novorozenecké	SHV*	-	Y, A/C

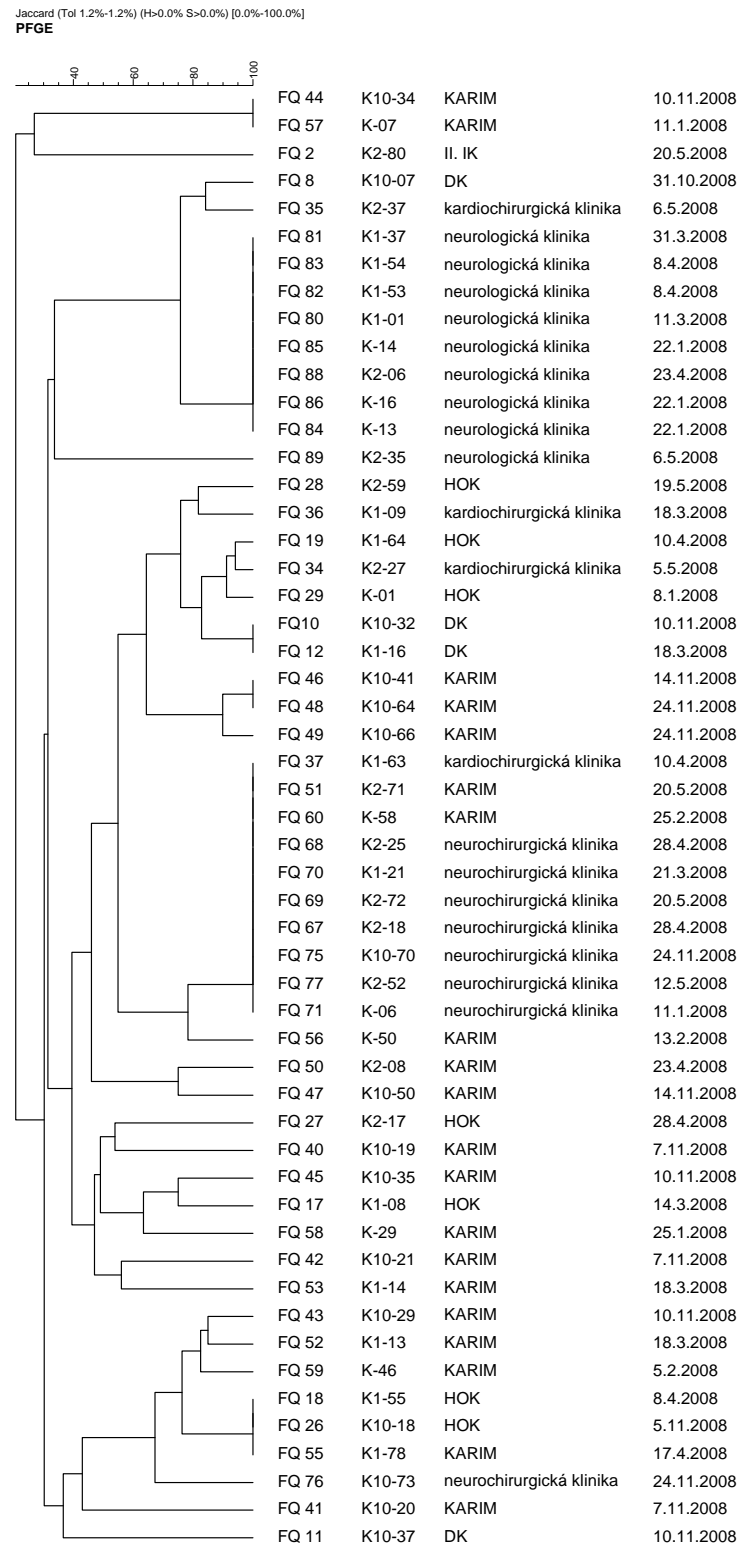
ozn	číslo	materiál	JIP- klinika/oddělení	typ beta-laktamázy	geny <i>qnr</i>	plazmidy
91	K21-59	moč	novorozenecké	SHV*	-	Y, A/C
92	K21-60	stolice	novorozenecké	SHV*	-	Y, A/C
93	K21-62	stolice	novorozenecké	SHV*	-	A/C
94	K21-63	stolice	novorozenecké	SHV*	-	A/C
95	K22-05	stolice	novorozenecké	SHV*	-	A/C
96	K22-13	stolice	novorozenecké	SHV*	-	A/C
97	K22-15	stolice	novorozenecké	SHV*	-	A/C
98	K22-20	stolice	novorozenecké	SHV*	-	A/C
99	K22-24	stolice	novorozenecké	SHV*	-	A/C
100	K22-25	stěr/výtěr krk+nos	novorozenecké	SHV*	-	A/C

ozn. - označení izolátu; číslo- číslo izolátu ve sbírce; * - mutace rozšiřující spektrum účinku detekovaná pomocí restrikční analýzy; HOK - hemato-onkologická klinika; KARIM - klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny

4.6.4 Stanovení identity/podobnosti ESBL-positivních izolátů *Klebsiella pneumoniae*

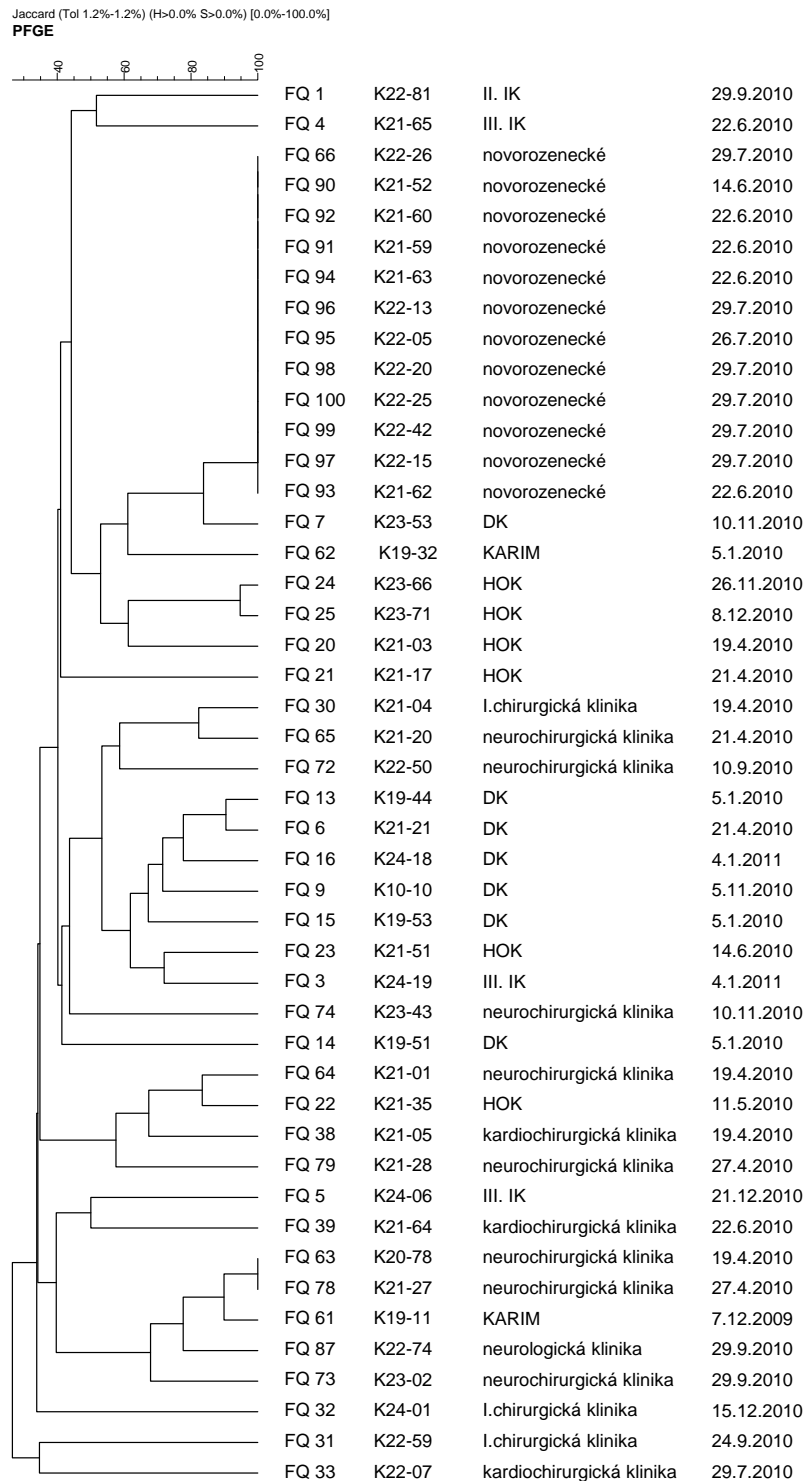
Výsledky analýzy podobnosti resp. identity jednotlivých izolátů *Klebsiella pneumoniae* získané srovnáním restrikčních fragmentů celogenomové DNA prostřednictvím PFGE jsou zobrazeny na obrázcích 9 a 10. Izoláty byly rozděleny do dvou skupin na základě data jejich izolace z klinického materiálu pacientů; porovnány mezi sebou tak byly zvláště izoláty z roku 2008 a 2010. Srovnání restrikčních profilů odhalilo několik případů klonálního šíření, a to konkrétně v roce 2008 na JIP neurologické kliniky a také na JIP kliniky neurochirurgické. V roce 2010 pak bylo nalezeno 12 identických izolátů na JIP novorozeneckého oddělení. Vedle několika zcela identických izolátů bylo odhaleno také několik s velice podobným restrikčním profilem, který s vysokou pravděpodobností odpovídá jedné genetické změně. Celkově bylo mezi 100 izoláty *Klebsiella pneumoniae* identifikováno 65 různých kmenů. U jednoho izolátu se nepodařilo získat hodnotitelný restrikční profil.

Obrázek 9: Dendrogram ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* izolovaných v roce 2008



Legenda: horizontální osa - podobnost bakteriálních izolátů v %; vertikální osa - označení izolátů, oddělení JIP (DK - dětská klinika; HOK - hemato-onkologická klinika; II. IK - II. interní klinika; KARIM - klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny) a datum izolace

Obrázek 10: Dendrogram ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* izolovaných v roce 2010



Legenda: horizontální osa - podobnost bakteriálních izolátů v %; vertikální osa - označení izolátů, oddělení JIP (DK - dětská klinika; HOK - hemato-onkologická klinika; II. IK - II. interní klinika; III. IK - III. interní klinika; KARIM - klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny) a datum izolace

4.6.5 Stanovení citlivosti k antibiotikům

Rezistence ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* k vybraným antimikrobním přípravkům je uvedena v tabulce 30. Z údajů vyplývá, že byla prokázána současná vysoká rezistence k fluorochinolonům, aminoglykosidům (především gentamicinu a tobramycinu) a kotrimoxazolu. Naopak citlivost byla prokázána ke kolistinu a meropenemu. Nižší frekvence rezistentních izolátů byla zaznamenána u tigecyklinu.

Tabulka 30: Rezistence ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* k antimikrobním přípravkům v procentech

antibiotikum	rezistence (%)	antibiotikum	rezistence (%)
ampicilin	100,0	piperacilin/tazobactam	46,0
ampicilin/sulbactam	91,0	cefoperazon	82,0
cefazolin	100,0	cefotaxim	82,0
cefuroxim	100,0	ceftazidim	96,0
gentamicin	92,0	cefepim	76,0
kotrimoxazol	83,0	cefoperazon/sulbactam	10,0
kolistin	2,0	meropenem	4,0
kyselina oxolinová	67,0	ciprofloxacin	67,0
ofloxacin	54,0	tigecyklin	8,0
tetracyklin	87,0	tobramycin	96,0
aztreonam	98,0	amikacin	20,0
piperacilin	100,0		

5 DISKUZE

5.1 Nejčastější bakteriální druhy s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v klinickém materiálu hospitalizovaných pacientů

5.1.1 ESBL-pozitivní enterobakterie z klinického materiálu hospitalizovaných pacientů

Produkce širokospektrých beta-laktamáz je klíčovým mechanismem rezistence gramnegativních bakterií k účinku beta-laktamových antibiotik. Bakterie produkující tyto enzymy jsou rozšířeny po celém světě, nicméně existují výrazné geografické rozdíly v jejich prevalenci, a to jak mezi jednotlivými zeměmi, tak i mezi jednotlivými zdravotnickými zařízeními v dané oblasti. To potvrzují i výsledky získané v rámci EARS-Net, kde lze vysledovat nízkou prevalenci izolátů *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli* rezistentních k cefalosporinům III. generace ve skandinávských zemích a mnohem vyšší prevalenci ve státech jižní Evropy [36]. Vzhledem k tomu, že beta-laktamová antibiotika patří mezi nejpoužívanější antimikrobiální přípravky, představuje znalost místní epidemiologické situace velice významnou a klíčovou informací pro zahájení iniciální antibiotické léčby obzvláště v případech, kdy není možné čekat na výsledky mikrobiologického vyšetření. První část disertační práce byla proto věnována prevalenci bakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy ve třech velkých moravských nemocnicích, které pokrývají spádovou oblast s téměř 2,5 miliony obyvatel.

V roce 2009 se prevalence ESBL-pozitivních enterobakterií ve třech sledovaných zdravotnických zařízeních (Fakultní nemocnici Olomouc, Fakultní nemocnici Ostrava a Krajské nemocnici T. Bati ve Zlíně) pohybovala v rozmezí 4 až 12 %. Ve srovnání s francouzskou studií z roku 2005, která popisuje 2% prevalenci ESBL-pozitivních izolátů, je toto číslo o něco vyšší [87]. Práce jiného autorského kolektivu zaměřená na produkci ESBL enzymů u gramnegativních bakterií izolovaných z klinického materiálu pacientů naopak uvádí 28% prevalenci ESBL-pozitivních enterobakterií [88]. Vyšší výskyt izolátů čeledi *Enterobacteriaceae* produkujících ESBL enzymy ve srovnání se získanými výsledky uvádí také další studie. Ko a kolegové zaznamenali v roce 2005 mezi 1484 enterobakteriemi 14 % ESBL-pozitivních izolátů [89]. V rámci jednotlivých druhů jsou však jejich údaje srovnatelné s našimi daty. Mezi nejčastější producenty ESBL enzymů patřily ve třech sledovaných moravských nemocnicích kmeny *Klebsiella pneumoniae* (10-24 %),

Klebsiella oxytoca (1-11 %) a *Escherichia coli* (2-8 %). Ko a kolegové potvrdili produkci širokospektrých beta-laktamáz ESBL u 22 % izolátů *Klebsiella pneumoniae*, 7 % *Klebsiella oxytoca* a 10 % izolátů *Escherichia coli* [89]. Nižší podíl ESBL-pozitivních izolátů mezi jmenovanými druhy byl zaznamenán v rámci francouzské studie, která uvádí u zástupců *Klebsiella pneumoniae* 4 % izolátů produkujících ESBL enzymy, u druhu *Klebsiella oxytoca* 2 % a u izolátů *Escherichia coli* také 2 %. Mnohem vyšší zastoupení ESBL-pozitivních izolátů však autoři zachytili v rámci druhu *Enterobacter aerogenes*, a to 21 % [87]. Vysoký podíl (84 %) ESBL-pozitivních izolátů *Enterobacter* spp. byl publikován také v další práci [88]. Tento výsledek však může být zkreslen nižším počtem analyzovaných izolátů. V moravských nemocnicích byla v rámci tohoto rodu zamenána prevalence ESBL-produkujících izolátů v rozmezí 0 až 5 %. Produkce širokospektrých beta-laktamáz byla sledována rovněž u izolátů *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* a *Escherichia coli* v Nizozemí. Autoři odhadli prevalenci ESBL-pozitivních izolátů u těchto druhů na 5 %, resp. 2 % a 2 % [90]. Naopak velmi vysoká jsou čísla získaná v rámci studie, která analyzovala izoláty ze tří jordánských nemocnic, kde byla zjištěna 71% četnost ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* a 29% resp. 11% prevalence u druhů *Klebsiella oxytoca* a *Escherichia coli* [88]. Údaje z moravských nemocnic jsou tak ve srovnání s touto prací mnohem příznivější. Vzhledem k tomu, že velkou část z 12922 analyzovaných izolátů čeledi *Enterobacteriaceae* tvořili zejména zástupci *Klebsiella pneumoniae* (3118) a *Escherichia coli* (5461), lze předpokládat, že vypočítaná prevalence ESBL-pozitivních izolátů u těchto jmenovaných druhů poměrně dobře odráží skutečnou epidemiologickou situaci.

5.1.2 Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy z klinického materiálu novorozenců

Problematika infekcí vyvolaných bakteriemi produkujícími širokospektré beta-laktamázy byla již několikrát zmíněna v úvodu. Obzvláště velké riziko představují tyto kmeny pro pacienty s oslabeným imunitním systémem, ke kterým je možno zařadit i novorozence. Riziko vzniku infekčního onemocnění je u jmenované skupiny velice vysoké, zejména pokud jde o předčasně narozené děti. Velmi nízká porodní váha, prodloužená hospitalizace a nezbytná intenzivní péče spojená s využitím invazivních prostředků

(především intravenózních katétrů a mechanických ventilátorů) představují faktory, které významným způsobem zvyšují nebezpečí infekce [91-93]. Důležitou úlohu sehrává rovněž podávání antibiotik, jež může být spojeno se selekcí a následným klinickým uplatněním multirezistentních bakteriálních kmenů [91].

V literatuře je velmi málo dostupných studií, které by se zabývaly kolonizací novorozenců rezistentními kmeny enterobakterií. Součástí disertační práce byla analýza kmenů produkujících širokospektré beta-laktamázy na Novorozeneckém oddělení FNOL a výsledky ukázaly, že prevalence ESBL-pozitivních enterobakterií dosáhla ve sledovaném období necelých 4 %. Toto číslo je oproti některým pracem nižší [91, 94]. Studie provedená v roce 2004 na stejném oddělení udává 20 % ESBL-produkujících izolátů *Klebsiella pneumoniae*, v tomto případě se však jednalo o situaci s klonálním šířením identického kmene [94]. Výskyt ESBL-produkujících bakterií na novorozenecké jednotce intenzivní péče byl sledován ve Francii. Autoři v období deseti let od roku 2000 do roku 2009 odhalili kolonizaci enterobakteriemi produkujícími enzymy ESBL u 46 novorozenců, přičemž u tří z nich se rozvinula infekce [95]. Singh a kolegové popsali kolonizaci rezistentními kmeny enterobakterií u 17 % hospitalizovaných novorozenců, u 14 % z těchto dětí došlo k rozvoji infekce, která byla ve 41 % případů vyvolána ESBL-pozitivními kmeny [91]. Bhattacharjee a spolupracovníci zaznamenali produkci ESBL u 42 % enterobakterií izolovaných od novorozenců s probíhající sepsí [96]. Aktas a spoluautoři uvádí produkci ESBL u 60 % kmenů *Klebsiella pneumoniae* zachycených z hemokultur novorozenců hospitalizovaných na jednotce intenzivní péče [97]. Vysoký podíl ESBL-pozitivních izolátů u novorozeneckých sepsí prokázali i Jain a kolegové, v případě *Escherichia coli* odhalili téměř 64 % ESBL-produkujících izolátů, mezi izoláty *Klebsiella* spp. dokonce 87 % [98]. Zaznamenané druhové zastoupení enterobakteriálních izolátů z Novorozeneckého oddělení FNOL se pak výrazně neliší od výše diskutovaných výsledků zahrnujících všechna oddělení nemocnice. Nejvyšší podíl mezi ESBL-pozitivními izoláty měly opět druhy *Klebsiella pneumoniae* (13 z 55 ESBL-pozitivních bakterií), *Klebsiella oxytoca* (14/55) a *Escherichia coli* (24/55). V rámci jednotlivých druhů pak tento počet odpovídá 3%, resp. 4% a 5% prevalenci ESBL-pozitivních izolátů. Jiná studie detekovala mezi 46 ESBL-produkujícími enterobakteriemi izolovanými od novorozenců z JIP 27 izolátů *Escherichia coli*, 9 *Klebsiella pneumoniae*, 3 *Klebsiella oxytoca* a narozdíl

od získaných výsledků také vyšší zastoupení druhu *Enterobacter cloacae* (5 izolátů) [95]. Na neonatologickém oddělení FNOL bylo vedle ESBL-pozitivních bakterií izolovaných od novorozenců zachyceno také 17 AmpC-pozitivních izolátů, což představuje zhruba 1 % ze všech analyzovaných enterobakterií. Podobně jako zaznamenaná prevalence ESBL-pozitivních kmenů je i tato hodnota nižší v porovnání s dostupnými údaji v literatuře. Ding a kolegové uvádí 10% prevalenci kmenů *Klebsiella pneumoniae* tvořících beta-laktamázy typu AmpC a 2% prevalenci kmenů *Escherichia coli* s produkcí těchto enzymů [99]. Mezi AmpC-pozitivními izoláty na Novorozeneckém oddělení FNOL byly nejpočetnější kmeny *Enterobacter* spp. (35 %) a *Escherichia coli* (35 %). Vysoký podíl izolátů *Enterobacter* spp. (69 %) mezi AmpC-produkujícími bakteriemi kolonizujícími novorozence byl pozorován i jiným autorským kolektivem [100].

5.1.3 Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy v gastrointestinálním traktu hospitalizovaných osob

K důležitým faktorům, které se podílejí na vzniku infekcí vyvolaných rezistentními bakteriemi, se řadí například dlouhodobý pobyt v nemocnici, zejména na jednotkách intenzivní péče (JIP), použití centrálních venózních a močových katetrů, nebo předchozí expozice některým antimikrobiálním látkám [101]. Významnou úlohu ovšem sehrává také nosičství těchto kmenů. Například Reddy a kolegové zaznamenali, že u 35 ze 413 pacientů kolonizovaných ESBL-pozitivními enterobakteriemi došlo následně k rozvoji infekce krevního řečiště vyvolané těmito kmeny [102]. Jiná práce uvádí, že kolonizace ESBL-pozitivními kmeny je u pacientů přijatých na JIP významným faktorem pro rozvoj infekce [103]. Studie zaměřená na možný přínos sledování nosičství ESBL-pozitivních bakterií u pacientů přijímaných na JIP detekovala rozvoj infekce u 26 % pacientů majících v gastrointestinálním traktu (GIT) tyto kmeny [104]. Livermore a Paterson uvádějí, že v případě vyšší četnosti infekcí vyvolaných ESBL-pozitivními kmeny na konkrétním oddělení má téměř 70 % pacientů GIT kolonizován těmito kmeny [105].

V České republice byla v roce 2007 provedena studie zabývající se kolonizací GIT bakteriemi produkujícími ESBL enzymy. Její výsledky ukázaly 3% prevalenci ESBL-pozitivních izolátů u hospitalizovaných pacientů, přičemž mezi těmito izoláty převažoval druh *Escherichia coli* (57 %) [106]. Ve srovnání s touto studií ukazují aktuální získané

výsledky zvýšení výskytu ESBL-pozitivních enterobakterií v GIT hospitalizovaných osob, a to konkrétně na 8 %. Došlo také ke změně druhového zastoupení, kdy byl mezi nemocničními ESBL-pozitivními izoláty zaznamenán vyšší počet kmenů *Klebsiella pneumoniae* (56 %). Podobné údaje byly publikovány také dalšími autory. Castillo a spolupracovníci zjišťovali gastrointestinální kolonizaci ESBL-pozitivními kmeny u hospitalizovaných pacientů. Jejich výsledky odhalily zvýšení prevalence ESBL produkujících kmenů ze 3 % v roce 2002 na 8 % v roce 2004. V obou sledovaných obdobích dominoval druh *Escherichia coli* [107]. Nárůst počtu ESBL-pozitivních bakterií byl pozorován rovněž ve Švédsku. Tam se prevalence nosičství těchto izolátů v GIT nemocničních pacientů zvýšila ze 2 % v roce 2008 na 7 % v roce 2010. Všechny izoláty produkující širokospektré beta-laktamázy typu ESBL patřily k druhu *Escherichia coli* [108]. Naopak jiná publikace popisuje mírný pokles prevalence ESBL-pozitivních enterobakterií v GIT hospitalizovaných pacientů v roce 2007 (9 %) ve srovnání s rokem 2003 (12 %) [109]. Výskyt ESBL-pozitivních bakterií ve stolici pacientů sledovali také Miró a kolegové. Ti odhalili mezi 1321 analyzovanými vzorky 44 izolátů produkujících širokospektrou beta-laktamázu, což odpovídá 3% prevalenci. Stejně jako ve výše citovaných pracích výrazně převažoval druh *Escherichia coli* (42 ze 44 ESBL-pozitivních izolátů) [110]. Novější údaje přináší například studie provedená v roce 2009 v Nizozemí, která odhalila 5% četnost ESBL-produkujících bakterií v rektálních výtěrech nemocničních pacientů [111]. Mnohem vyšší prevalence ESBL-pozitivních izolátů v GIT pacientů ve srovnání s předchozími pracemi byla v roce 2007 zaznamenána v Saudské Arábii, a to 26 %. Většina (46 z 54) detekovaných ESBL produkujících bakterií patřila k druhu *Escherichia coli*, zbývajících 8 izolátů tvořily zástupci druhu *Klebsiella pneumoniae* [112].

5.2 Nejčastější bakteriální druhy s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v nemocničním prostředí

Bakteriální infekce ohrožují především kriticky nemocné pacienty. Rostoucí počet patogenních mikroorganismů rezistentních k antimikrobiálním látkám pak výrazně zvyšuje rizika spojená s těmito infekcemi. Toto nebezpečí se týká zejména pacientů hospitalizovaných na JIP. Například Vincent a kolegové uvádí, že u 21 % pacientů na JIP

došlo k rozvoji infekce v souvislosti s tímto pobytem [113]. Jiná práce řadí hospitalizaci na JIP k jednomu z důležitých faktorů spojených s možným rozvojem infekce vyvolané ESBL-pozitivními bakteriemi [114]. Prospektivní studie zaměřená na infekce získané na JIP poukázala na skutečnost, že téměř 15 % infekcí je důsledkem přenosu etiologického agens mezi pacienty [115]. Předpokládá se, že klíčovou roli v tomto přenosu sehrávají kontaminované ruce ošetřujícího personálu [116]. Mezi personálem, pacienty a nemocničním prostředím existuje velmi dynamický vztah, kde neustále dochází k přenosu bakteriálních kmenů [117]. V této souvislosti je vhodné připomenout vysokou odolnost řady patogenních bakterií a jejich schopnost přežít v prostředí, a to v řádu několika dnů, ale i několika měsíců [118]. Práce německých autorů zaměřená na kontaminaci okolí pacientů infikovaných nebo kolonizovaných rezistentními bakteriemi odhalila přítomnost multirezistentních gramnegativních bakterií v 5 % vyšetřovaných vzorků. Grampozitivní bakterie (met icilin rezistentní *Staphylococcus aureus* a vankomycin-rezistentní enterokoky) byly nalezeny dokonce ve 25 % případů [119]. V rámci 140 vzorků z prostředí JIP FNOL bylo detekováno 11 enterobakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy, což odpovídá téměř 8% prevalenci. Žádný z těchto izolátů nebyl nalezen ve vzorcích odebraného vzduchu, což se shoduje s jinými publikovanými údaji a potvrzuje názor, že přenos těchto bakterií vzduchem je minimální [120]. Záchyt gramnegativních bakterií rezistentních k ceftazidimu z prostředí popisuje další práce. Autoři zachytili tyto mikroorganismy v 9 % vzorků odebraných z různých ploch na dvou chirurgických JIP. Nejčastěji kontaminovaným povrchem byly výlevky [121]. Také 4 izoláty z prostředí JIP FNOL byly nalezeny právě ve výpustích dřezů a umyvadel. To je ve shodě s předpokladem, že vlhké prostředí usnadňuje přežívání těchto mikroorganismů [118]. Zaznamenaná prevalence bakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy v prostředí JIP ve FNOL je srovnatelná také s prací dalšího autorského kolektivu. Touati a kolegové uvádí kontaminaci prostředí ESBL-pozitivními enterobakteriemi v rozsahu 9 % (14/150). Mezi 14 izoláty rezistentními k ceftazidimu a cefotaximu bylo identifikováno 9 zástupců druhu *Enterobacter cloacae* a 5 *Klebsiella pneumoniae* [122]. Většina izolovaných ESBL- a AmpC-pozitivních bakterií z nemocničního prostředí FNOL patřila k rodu *Klebsiella* (8 izolátů), zbývající tři byly identifikovány jako *Enterobacter cloacae*. Vyšší kontaminaci okolí pacientů ESBL-pozitivními bakteriemi rodu *Klebsiella* spp. ve srovnání s izoláty *Escherichia*

coli zaznamenali Guet-Revillet a kolegové [123]. Přítomnost rezistentních enterobakterií ve stěrech z prostředí dokazuje značnou odolnost těchto mikroorganismů k dezinfekčním programům, a zároveň poukazuje na nutnost důsledného dodržování hygienicko-epidemiologických opatření, která mohou výrazně omezit přenos těchto bakterií mezi pacienty.

5.3 Nejčastější bakteriální druhy s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v klinickém materiálu osob v komunitním prostředí

Výskyt rezistentních bakteriálních izolátů představuje celosvětový problém, který se dnes netýká pouze zdravotnických zařízení, ale stále častěji a naléhavěji se objevuje také v komunitním prostředí. Tento trend je velice nepříznivý, protože vzrůst podílu nosičů rezistentních bakteriálních izolátů v komunitě zvyšuje riziko, že se další jedinci stanou nosiči těchto bakterií jako důsledek interhumánního přenosu. Tím se zvětšuje zdroj genů rezistence a urychluje získávání genů rezistence citlivými bakteriemi. V poslední době dochází ke zvýšení počtu ESBL-pozitivních bakterií izolovaných z klinického materiálu pacientů z komunitní oblasti [124]. Valverde a kolegové porovnávali prevalenci ESBL v GIT u komunitních pacientů v roce 1991 a v roce 2003. Ve své studii zjistili, že prevalence ESBL v průběhu dvanácti let vzrostla z 1 % na 6 %. V této studii byla také stanovena míra výskytu ESBL-pozitivních bakterií u zdravých dobrovolníků na 4 % v roce 2003 [125]. Získané výsledky odhalily v GIT osob z komunitního prostředí olomouckého regionu 3% prevalenci ESBL-produkujících enterobakterií. Ve srovnání se studií provedenou v České republice v roce 2007 [106], která uvádí 1% prevalenci, je toto číslo vyšší a potvrzuje pozorování jiných autorů, tj. nárůst výskytu ESBL-nosičství v GIT u komunitních pacientů. Castillo a kolegové zaznamenali zvýšení výskytu ESBL-pozitivních enterobakterií ve stolici u ambulantních pacientů ze 2 % v roce 2002 na 7 % v roce 2004 [107]. Další autoři srovnávali četnost ESBL-pozitivních enterobakterií u asymptomatických mladých pacientů v komunitě v rozmezí deseti let a detekovali zvýšení z 0 % v roce 1999 na 2 % v roce 2009 [126]. Narůstající výskyt ESBL-pozitivních enterobakterií v GIT osob v komunitním prostředí byl popsán například i v Británii [127]. Nejčastěji jsou mezi nosičskými kmeny identifikovány

izoláty *Escherichia coli* [128, 129]. Španělská studie popisuje, že všechny ESBL-pozitivní bakterie izolované z GIT komunitních pacientů v roce 2003 patřily k druhu *Escherichia coli*. Stejný výsledek zaznamenali také v případě zdravých dobrovolníků [125]. Rovněž Čekanová a kolegové uvádí, že všechny identifikované ESBL-pozitivní bakterie z GIT komunitních pacientů náležely ke jmenovanému druhu [106]. Porovnání získaných údajů s rokem 2007 ukazuje rozrůznění druhového zastoupení, i když nadále převládá *Escherichia coli* (90 %). Tyto výsledky jsou ve shodě s jinou prací, kde většina ESBL-pozitivních enterobakterií izolovaných z GIT ambulantních pacientů v roce 2004 byla určena jako *Escherichia coli* [107]. V porovnání s ESBL enzymy není problematika nosičství AmpC-pozitivních bakteriálních izolátů prozatím příliš zmapována a existuje stále velmi málo prací, které by se tímto tématem zabývaly. Kaneko a kolegové popsali izolát *Escherichia coli* produkující AmpC beta-laktamázu u zdravého studenta medicíny a naznačili, že konstitutivní i inducibilní AmpC beta-laktamázy mohou být v komunitě široce rozšířeny [130]. V Dánsku bylo v roce 2008 detekováno nosičství AmpC beta-laktamáz v GIT zdravých armádních rekrutů, a to téměř ve 4 %. U stejné skupiny byl prokázán rovněž výskyt ESBL-pozitivních enterobakterií [131]. V rámci České republiky byla v roce 2007 zaznamenána prevalence AmpC-pozitivních bakterií v GIT osob v komunitním prostředí v rozsahu 1 % [106]. Aktuální údaje ukázaly stejnou prevalenci (1 %) enterobakterií s produkcí AmpC. Rozdíl však byl zaznamenán v druhovém zastoupení AmpC-pozitivních izolátů, mezi kterými v současné studii převažovaly druhy *Escherichia coli* a *Citrobacter freundii*.

Nejčastějším mechanismem odolnosti enterobakterií k beta-laktamovým antibiotikům je produkce enzymů označovaných jako beta-laktamázy. Těchto enzymů je celá řada a k nejdůležitějším patří tzv. ESBL a AmpC, které jsou schopné inaktivovat účinek širokospektrých penicilinů a cefalosporinů. Nepříznivý vývoj v oblasti ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií mohou doplnit údaje o četnosti těchto kmenů v GIT. Jejich prevalence v GIT pacientů FNOL i osob v komunitním prostředí se zvyšuje. Tyto kmeny sice představují součást normální mikroflóry, mohou však způsobit například infekci močových cest a antibiotická léčba by v tomto případě byla mnohem náročnější. Kolonizace GIT ESBL- a AmpC-produkujícími enterobakteriemi zvyšuje riziko infekce způsobené těmito oportunními patogeny a také zvyšuje možnost, že mobilní elementy nesoucí geny rezistence budou v komunitním prostředí dále rozšiřovány.

5.4 Genetická analýza širokospektrých beta-laktamáz

Vlastnosti mikroorganismů vyvolávajících infekce a včasné odhalení jejich případné rezistence je v řadě případů zcela zásadní, protože selhání antibiotické terapie v důsledku odolnosti etiologického agens k použitému antimikrobiálnímu přípravku může být u řady pacientů fatální. Z tohoto pohledu je jedním z nejvýznamnějších mechanismů rezistence produkce širokospektrých beta-laktamáz. Odhalení jejich produkce je velmi důležité, protože tyto enzymy znemožňují použití často aplikovaných beta-laktamových antibiotik. Detekce genů rezistence hraje významnou roli v oblasti surveillance bakteriální rezistence. Molekulárně-biologické metody umožňují nejen confirmovat fenotyp, ale poskytují rovněž klíčové informace z pohledu epidemiologie.

5.4.1 Genetická detekce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL

Od roku 1983, kdy byla popsána první širokospektrá beta-laktamáza SHV-2, jejich počet výrazně vzrostl a dnes je známo již několik stovek těchto enzymů [24, 42]. V posledních dvaceti letech také došlo k výrazné změně v četnosti výskytu jednotlivých typů beta-laktamáz. Původně velmi rozšířené varianty enzymů typu TEM a SHV v současnosti nahradily zejména širokospektré beta-laktamázy typu CTX-M [44].

To potvrzuje i genetická analýza enterobakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy typu ESBL izolovaných na Novorozeneckém oddělení Fakultní nemocnice Olomouc, která odhalila převažující zastoupení enzymů CTX-M (84 % ESBL-pozitivních izolátů). Kolonizaci novorozenců hospitalizovaných na neonatologické JIP bakteriemi *Klebsiella pneumoniae* produkujícími enzymy typu CTX-M zaznamenali také Desimoni a kolegové [132]. Enzymy CTX-M-15 byly detekovány rovněž u ESBL-pozitivních izolátů *Escherichia coli* od novorozenců z JIP v severní Indii [133]. Naopak práce italských autorů, která analyzovala ESBL-pozitivní izoláty *Klebsiella pneumoniae* získané na novorozenecké JIP, detekovala pouze enzymy typu SHV a TEM, konkrétně SHV-1, SHV-12 a TEM-136 [134]. Beta-laktamázy SHV a TEM byly identifikovány také u izolátů *Klebsiella pneumoniae* a *Klebsiella oxytoca* z neonatologických JIP v Maďarsku. V tomto případě se jednalo o varianty SHV-5, SHV-12 a základní beta-laktamázu s úzkým spektrem účinku TEM-1 [135].

Dalším cílem disertační práce byla analýza širokospektrých beta-laktamáz u bakterií izolovaných z GIT hospitalizovaných pacientů. Většina (29/31) analyzovaných izolátů nesla gen pro beta-laktamázu typu CTX-M. Ve 28 případech se jednalo o geny kódující beta-laktamázy ze skupiny CTX-M-1 a pouze u jednoho izolátu byl detekován gen pro enzym ze skupiny CTX-M-9. U 61 % izolátů byly vedle genu pro beta-laktamázu CTX-M přítomny současně také geny kódující typy SHV a TEM. Časté zastoupení beta-laktamáz typu CTX-M u bakteriálních izolátů z GIT hospitalizovaných pacientů uvádí také jiní autoři. Valverde a kolegové publikovali, že 42 % *bla* genů detekovaných u ESBL-pozitivních bakterií z GIT hospitalizovaných pacientů v roce 2003 kódovalo beta-laktamázu ze skupiny CTX-M-9. Ve srovnání s rokem 1991 došlo také k nárůstu diverzity detekovaných typů beta-laktamáz. Zatímco v roce 1991 byla u těchto osob identifikována pouze varianta TEM-4, v roce 2003 k ní přibýly rovněž varianty CTX-M-9, CTX-M-14, TEM-52, SHV-2 a SHV-12 [125]. Vyšší zastoupení enzymů ze skupiny CTX-M-9 mezi ESBL-pozitivními enterobakteriemi nesoucími gen *bla*_{CTX-M} prokázala také další španělská studie. Ze 44 ESBL-produkujících enterobakteriálních izolátů byl enzym typu CTX-M zaznamenán u 33 z nich, přičemž v 18 případech se jednalo o variantu CTX-M-9. U 5 izolátů byla identifikována varianta CTX-M-14, u zbývajících deseti pak typy CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-29 a CTX-M-34. Vedle toho bylo zachyceno 9 izolátů s beta-laktamázou SHV-12, jeden izolát s enzymem SHV-2 a jeden izolát s enzymem PER-1 [110]. Strömdahl a kolegové detekovali gen pro enzym ze skupiny CTX-M-1 u 11 ze 16 bakteriálních izolátů majících gen *bla*_{CTX-M}. Beta-laktamáza typu TEM nebyla v souboru jejich izolátů nalezena a typ SHV byl přítomen pouze v jednom případě [108]. Vysoký podíl bakterií nesoucích geny *bla*_{CTX-M-1} mezi ESBL-pozitivními izoláty ze stolice pacientů prokázala další práce. Vedle toho byly u těchto izolátů detekovány také varianty CTX-M-15, CTX-M-2, CTX-M-14, TEM-52 a SHV-2 [111].

Jednotlivé typy širokospektrých beta-laktamáz byly sledovány také u ESBL-pozitivních enterobakterií zachycených v prostředí JIP dvou klinik FNOL, a to KARIM a IPCHO. Přítomnost genu *bla*_{CTX-M} byla prokázána u všech 4 analyzovaných enterobakteriálních izolátů, přičemž všechny detekované geny kódovaly enzym ze skupiny CTX-M-1. U tří izolátů byl zároveň identifikován gen *bla*_{TEM} a u 2 izolátů *Klebsiella*

pneumoniae gen *bla*_{SHV}. U jednoho ze dvou *bla*_{SHV} genů byla potvrzena mutace spojená s rozšířením spektra účinku příslušné beta-laktamázy. Množství studií, které by se zabývaly detailní analýzou jednotlivých typů beta-laktamáz u bakterií izolovaných z nemocničního prostředí a s nimiž by bylo možné porovnávat získané výsledky, je výrazně omezené. Nicméně genetická analýza byla provedena například u ESBL-pozitivních bakterií izolovaných z nemocničního prostředí v Alžírsku. U všech 5 izolátů *Klebsiella pneumoniae* a 9 izolátů *Enterobacter cloacae* byla prostřednictvím PCR a následné sekvenace detekována beta-laktamáza CTX-M-15 [122]. Obdobné výsledky uvádí i studie publikovaná v roce 2010, která odhalila gen *bla*_{CTX-M-15} u 10 izolátů *Enterobacter cloacae* a 2 izolátů *Klebsiella pneumoniae* z prostředí. Navíc byla u dalších 4 izolátů *Enterobacter cloacae* zachycena beta-laktamáza SHV-12 [136]. Tyto výsledky tak opět potvrzují fakt, že mezi ESBL beta-laktamázami převažují v současné době typy CTX-M.

Mezi ESBL-pozitivními izoláty čeledi *Enterobacteriaceae* získanými z rektálních výtěrů komunitních pacientů byly nejčastěji identifikovány enzymy CTX-M, které byly zachyceny u 28 z 29 analyzovaných bakterií. Polovina izolátů (14/28) nesla gen kódující enzym ze skupiny CTX-M-1, druhá polovina gen pro beta-laktamázu ze skupiny CTX-M-9. U 11 izolátů byl navíc detekován gen *bla*_{TEM} a 2 izoláty *Klebsiella pneumoniae* nesly gen *bla*_{SHV}. Ve srovnání s CTX-M-pozitivními izoláty z GIT hospitalizovaných pacientů, u nichž byl gen *bla*_{CTX-M-9-like} zachycen pouze u jedné z 29 bakterií (3 %), byl u izolátů z komunity podíl těchto genů výrazně vyšší (50 %). Zvýšení zastoupení enzymů ze skupiny CTX-M-9 u izolátů z GIT komunitních pacientů je patrné při porovnání se studií provedenou v České republice v roce 2007, která uvádí *bla*_{CTX-M-9-like} geny u 2 ze 7 izolátů (29 %) [106]. Změnu ve výskytu jednotlivých typů beta-laktamáz u bakteriálních izolátů z GIT komunitních pacientů zaznamenali také Valverde a kolegové. Zatímco v roce 1991 byly detekovány pouze geny *bla*_{CTX-M-10} a *bla*_{TEM-4}, v roce 2003 byly u těchto bakterií ve větší míře nalezeny geny pro beta-laktamázy CTX-M-9, CTX-M-14 a SHV-12 [125]. Jiná práce popisuje mezi bakteriemi izolovanými z GIT komunitních pacientů produkujícími enzym CTX-M výraznou převahu varianty ze skupiny CTX-M-1. Gen *bla*_{CTX-M-1-like} byl zanepraven u 67 ze 70 izolátů a pouze ve zbývajících třech případech byl identifikován gen *bla*_{CTX-M-9-like} [129]. Munday a

spolupracovníci detekovali u ESBL-pozitivních bakterií z komunity geny pro beta-laktamázy CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-15, TEM-1, TEM-2 a SHV-12 [127].

5.4.2 Genetická detekce širokospektrých beta-laktamáz typu AmpC

Kromě podrobnější analýzy širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL byla disertační práce zaměřena také na enzymy typu AmpC.

V rámci bakterií patřících do čeledi *Enterobacteriaceae* izolovaných z klinického materiálu novorozenců hospitalizovaných ve FNOL bylo identifikováno 17 AmpC-pozitivních izolátů. Mezi AmpC beta-laktamázami byl nejhojněji zastoupen typ EBC. Tento typ byl zaznamenán u 7 ze 12 AmpC-pozitivních kmenů, přičemž v 5 případech byl příslušný amplikon detekován u zástupců rodu *Enterobacter*, u nichž je gen umístěn na chromozómu. Kromě EBC typu byly nalezeny také enzymy typu CIT, MOX a DHA. U jednoho kmene *Escherichia coli* s AmpC-pozitivním fenotypem byla PCR pro průkaz AmpC enzymů negativní. Bližší charakteristika tohoto kmene odhalila mutace v promotorové oblasti chromozomálního genu *ampC*, které jsou spojeny s jeho nadprodukcí. Kmeny *Escherichia coli* s hyperprodukcí AmpC byly zachyceny například ve dvou belgických nemocnicích [137]. Problematice mutací v *ampC* promotoru a s tím souvisejícím změnám jak v samotné expresi genu, tak i ve výsledném dopadu na fenotyp, byla věnována studie dalších autorů [138]. Infekcemi a kolonizací hospitalizovaných novorozenců rezistentními gramnegativními bakteriemi se zabývali například Cézario a kolegové, kteří detekovali mezi 68 bakteriemi, kolonizujícími novorozence rezistentními k cefalosporinům III. generace, celkem 13 AmpC-pozitivních izolátů. AmpC fenotyp byl zaznamenán u 9 izolátů *Enterobacter* spp., 3 *Klebsiella* spp. a 1 zástupce rodu *Serratia*. Genetická analýza detekující jednotlivé typy příslušných enzymů však v citované práci provedena nebyla [100]. Zastoupení jednotlivých typů AmpC beta-laktamáz u klinických izolátů *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli* přináší jiná studie, která však není striktně omezena pouze na novorozence, ale zahrnuje i izoláty od starších dětí. Ding a kolegové zaznamenali mezi AmpC produkujícími bakteriemi výraznou převahu enzymu typu DHA-1, který byl detekován u 69 ze 74 bakterií. Z 64 AmpC-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* byl tento typ nalezen u všech. Kromě beta-laktamázy typu DHA-1 identifikovali autoři u izolátů *Escherichia coli* také typ CIT, konkrétně variantu CMY-2 [99].

Zajímavým zjištěním, které přinesla tato práce, je velmi nízký podíl AmpC-pozitivních izolátů u hospitalizovaných pacientů ve srovnání s osobami z komunitního prostředí. Zatímco v rámci enterobakterií izolovaných z GIT komunitních pacientů bylo identifikováno 10 AmpC-pozitivních izolátů, produkce AmpC enzymu byla prokázána pouze u jediného izolátu získaného z GIT hospitalizovaných pacientů. Konkrétně se jednalo o kmen *Klebsiella oxytoca* produkující beta-laktamázu typu DHA. Studie provedená v roce 2007, detekující bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy v GIT komunitních i hospitalizovaných pacientů, neodhalila mezi nemocničními izoláty žádný AmpC-pozitivní [106]. Další publikované práce zabývající se nosičstvím bakterií s produkcí beta-laktamáz se širokým spektrem účinku jsou zaměřeny jenom na enzymy typu ESBL, takže není možné srovnávat. Uvést lze pouze výsledky studií, které sledovaly prevalenci AmpC-beta-laktamáz u bakterií izolovaných nejen z rektálních výtěrů, ale i z dalšího klinického materiálu hospitalizovaných pacientů. Například beta-laktamáza DHA-1 byla nalezena u 1 ze 33 analyzovaných izolátů *Klebsiella oxytoca* od nemocničních pacientů v Číně. Vedle toho byly v citované studii analyzovány izoláty *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli*, u nichž byl kromě enzymu DHA-1 zachycen také enzym CMY-2 [139]. AmpC beta-laktamázy byly rovněž zaznamenány například u izolátů *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli* získaných z klinického materiálu pacientů hospitalizovaných v nemocnici v Thajsku. Autoři detekovali u těchto bakterií beta-laktamázy CMY-2, CMY-8 a DHA-1 [140].

Produkce širokospektrých beta-laktamáz byla v souvislosti s disertační prací sledována nejen u bakterií izolovaných z klinického materiálu hospitalizovaných nebo komunitních pacientů, ale také u enterobakterií zachycených v prostředí JIP. Geny kódující beta-laktamázy AmpC byly objeveny u 7 izolátů z prostředí a ve všech případech se jednalo o typ EBC. Ten byl zaznamenán u 3 zástupců *Enterobacter cloacae* a 4 izolátů *Klebsiella pneumoniae*. Geny kódující AmpC beta-laktamázy mohou být u enterobakterií umístěny jednak na chromozomu, ale také na plazmidech. Lokalizace těchto genů na chromozomu je typická pro druhy *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Providentia stuartii*, *Morganella morganii*, *Serratia* spp., *Yersinia* spp., *Hafnia alvei* a některé další. Velký význam ovšem v posledních letech získávají plazmidově kódované AmpC beta-laktamázy, které jsou odvozeny z chromozomálních a které se mohou velmi

snadno šířit mezi původně AmpC-negativními druhy jako například zástupci *Klebsiella* spp. [141]. Detekované AmpC-pozitivní izoláty *Klebsiella pneumoniae* nesoucí geny pro beta-laktamázy typu EBC z prostředí JIP FNOL tak představují možné riziko jednak pro samotné pacienty, ale také potenciální zdroj pro další šíření genů rezistence.

Beta-laktamázy AmpC byly zaznamenány u 1 % bakteriálních izolátů získaných z rektálních výtěrů komunitních pacientů v olomouckém regionu. Detekovány byly AmpC beta-laktamázy typu CIT, EBC, DHA, a to u izolátů *Citrobacter freundii*, *Citrobacter werkmanii*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* a *Escherichia coli*. Stejnou prevalenci (1 %) AmpC-pozitivních izolátů enterobakterií v GIT osob v komunitním prostředí popisuje také práce z roku 2007 provedená na stejném území. AmpC enzymy byly detekovány u izolátů *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* a *Citobacter freundii*, konkrétní typy beta-laktamáz však autoři neuvádí [106]. Přítomnost AmpC-pozitivních bakteriálních izolátů byla popsána rovněž v GIT zdravých osob. Hammerum a spolupracovníci zachytili enzymy CMY-2 a CMY-34 u zdravých armádních rekrutů v Dánsku [131]. Kaneko a kolegové odhalili u studenta medicíny izolát *Escherichia coli* s produkcí AmpC enzymu typu CIT. Konkrétně se jednalo o variantu CMY-2 [130].

S bakteriálními izoláty produkujícími AmpC beta-laktamázy a s jejich nosičstvím souvisí stejná rizika jako s enzymy typu ESBL. Tyto bakterie představují důležitý rezervoár genů rezistence, které mohou být poměrně snadno přeneseny na další původně citlivé kmeny. Kromě toho jsou infekce vyvolané těmito bakteriemi často komplikovanější, mívají závažnější průběh i následky, což souvisí zejména s možným selháním antibiotické terapie. Správná detekce přítomných beta-laktamáz může být v praxi obtížná zejména v případech, kdy jsou přítomny oba typy enzymů ESBL i AmpC současně. Nicméně údaje o rezistenci bakterií k antimikrobiálním přípravkům a znalost případné produkce širokospektrých beta-laktamáz představují klíčové informace pro realizaci adekvátní antibiotické politiky.

5.5 Stanovení identity/podobnosti bakteriálních izolátů s produkcí širokospektrých beta-laktamáz

Sledování příbuznosti jednotlivých bakteriálních izolátů a odhalení jejich případné identity přináší důležitá data, která jsou významným podkladem pro odhalení možného klonálního šíření. Tato znalost je důležitá obzvláště pro posouzení epidemiologie nozokomiálních nákaz a bakteriální rezistence. Rozlišení infekce endogenního charakteru od infekce vyvolané kmenem pocházejícím z prostředí umožňuje zvolit vhodnou strategii a účinná opatření pro jejich kontrolu. Stanovení identity/podobnosti bakteriálních kmenů může přispět k nalezení zdroje těchto organismů, rozpoznání „infekčních“ kmenů od „neinfekčních“ nebo odlišení nové infekce od relapsu. Existuje několik metod, jež umožňují typizovat bakterie. Klasické postupy založené zejména na fenotypových vlastnostech mikroorganismu, ke kterým patří například sérotypizace a fagotypizace, jsou v poslední době nahrazovány molekulárními metodami založenými na analýze bakteriální DNA jako je ribotypizace, analýza plazmidů, metody využívající PCR nebo pulzní gelová elektroforéza (PFGE) [142]. Velkou výhodou nových postupů ve srovnání s tradičními metodami je jejich možné využití pro analýzu mnohem širšího spektra bakteriálních patogenů. Tuto podmínku splňuje i PFGE, která byla využita pro typizaci analyzovaných bakteriálních izolátů, což byl jeden z dílčích cílů disertační práce.

5.5.1 Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy z klinického materiálu novorozenců

Stanovení identity/podobnosti ESBL-pozitivních bakterií izolovaných z klinického materiálu novorozenců hospitalizovaných na neonatologickém oddělení FNOL odhalilo několik izolátů se shodným restrikčním profilem. Z 32 analyzovaných izolátů bylo 16 (50 %) jedinečných. Zbývající polovina pak byla rozdělena do několika většinou méně početných skupin (dvojice, trojice), ale detekována byla také skupina sedmi identických izolátů. Shodné izoláty byly nalezeny v rámci druhu *Klebsiella pneumoniae* i mezi zástupci *Escherichia coli*. Vzhledem k tomu, že identické izoláty byly získány od různých novorozenců, lze předpokládat klonální šíření. Způsob, jakým došlo k přenosu těchto kmenů mezi jednotlivými pacienty, zkoumán nebyl. Výsledky jiných studií ovšem naznačují, že velký podíl na šíření těchto kmenů má ošetřující personál [143]. Cohen a

kolegové uvádí, že každý novorozenec nebo jeho bezprostřední okolí je vystaveno 78 dotykům zdravotnického personálu během dvanácti hodinové směny [144]. Molekulárně-epidemiologická studie zaměřená na gramnegativní bakterie byla provedena například na dvou neonatologických JIP v New Yorku. Autoři porovnali izoláty z klinického materiálu novorozenců i bakterie izolované z rukou ošetřujícího personálu. Více než polovina infekcí (58 %) byla vyvolána jedinečným kmenem. Téměř třetina (31 %) infekcí byla spojena s bakteriálním klonem. Kromě toho ovšem bylo nalezeno 9 % kmenů, které byly izolovány z klinického materiálu novorozenců a zároveň z rukou zdravotních sester. Mezi těmito kmeny byly častěji zastoupeny izoláty *Klebsiella pneumoniae* a *Serratia marcescens* [145]. Přenos bakteriálního kmene mezi novorozenci na neonatologické JIP spojený s ošetřujícím personálem byl zaznamenán také ve Švýcarsku. Jednalo se o ESBL-pozitivní kmen *Escherichia coli*, který byl s největší pravděpodobností v průběhu porodu přenesen z matky na narozená dvojčata. Stejný kmen byl ovšem následně identifikován také u dalších dvou novorozenců hospitalizovaných na stejném oddělení a jedné osoby z řad zdravotníků [146]. Klonální šíření ESBL-pozitivního kmene *Klebsiella pneumoniae* na novorozenecké JIP v souvislosti s ošetřujícím personálem uvádí také Gupta a kolegové [147].

5.5.2 Bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy v gastrointestinálním traktu hospitalizovaných osob

Identita/podobnost izolátů byla analyzována rovněž u ESBL-pozitivních enterobakterií z GIT hospitalizovaných pacientů. Zatímco všechny identifikované kmeny *Escherichia coli* byly geneticky jedinečné, v rámci druhu *Klebsiella pneumoniae* bylo nalezeno několik identických izolátů. Tyto klony byly zachyceny zejména u pacientů hospitalizovaných na Dětské klinice FNOL. Záchyt identických kmenů *Klebsiella pneumoniae* by mohl souviset s vyšší odolností tohoto bakteriálního druhu, který je schopen přežít v prostředí i několik měsíců [118]. Studie zaměřená na přítomnost gramnegativních bakterií na rukou nemocničního personálu i kontrolní skupiny osob ukázala vysoké zastoupení izolátů *Acinetobacter* spp. (45 %) a zástupců *Klebsiella* spp. a *Enterobacter* spp. (39 %) [148]. Guet-Revillet a kolegové sledovali kontaminaci ploch ESBL-pozitivními bakteriemi v těsné blízkosti pacientů a zjistili, že tato kontaminace je

mnohem častější v okolí pacientů kolonizovaných nebo infikovaných ESBL-pozitivními kmeny *Klebsiella pneumoniae* ve srovnání s pacienty s ESBL-pozitivními kmeny *Escherichia coli*. Z 18 ESBL-produkujících izolátů enterobakterií izolovaných ze 470 vzorků z prostředí patřila většina (15/18) právě k druhu *Klebsiella pneumoniae*. Bakterie *Escherichia coli* byla identifikována pouze ve dvou případech a v jednom vzorku byl nalezen izolát *Citrobacter freundii* [123]. Uvedené skutečnosti - dlouhodobé přežívání v prostředí, kontaminace ploch, přítomnost na rukou ošetřujícího personálu, pak mohou zvyšovat pravděpodobnost přenosu těchto kmenů mezi pacienty.

5.5.3 Bakterie s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v nemocničním prostředí

Porovnání restričních fragmentů celogenomové DNA a posouzení podobnosti bylo provedeno také u ESBL- a AmpC-pozitivních izolátů získaných z prostředí dvou JIP FNOL. Do srovnání byly navíc zařazeny bakterie produkující širokospektré beta-laktamázy izolované od pacientů hospitalizovaných ve stejné době na těchto odděleních. Identické izoláty byly objeveny mezi zástupci *Klebsiella pneumoniae* i *Enterobacter cloacae* a u obou druhů byly tyto kmeny izolovány ze stěrů z prostředí. Shoda mezi bakteriemi získanými ze stěrů z povrchů a izoláty od pacientů nebyla zaznamenána. Přenos mezi personálem a prostředím, ani přenos mezi odděleními KARIM a IPCHO nebyl prokázán a lze tak předpokládat, že hygienicko-epidemiologická opatření aplikovaná na těchto odděleních jsou adekvátní. Záchyt vysokého podílu rezistentních izolátů z prostředí ovšem představuje pro pacienty riziko. Výskyt mikroorganismů na řadě umělých povrchů v prostředí jednotek intenzivní péče dokládají další práce [149, 150]. Navíc bylo prokázáno, že bakterie jsou schopny v tomto prostředí dlouhodobě přežívat, což výrazně usnadňuje jejich šíření [151, 152]. U zdravotnického personálu v rámci dvou sledovaných JIP FNOL nebyly ESBL- a AmpC-pozitivní izoláty enterobakterií ve sledovaném období detekovány. Vzhledem k tomu, že ruce ošetřujícího personálu bývají v průběhu péče o pacienty často kontaminovány [153], může být výše popsaná skutečnost (nepřítomnost ESBL- a AmpC-pozitivní izolátů u zdravotnického personálu) jedním z faktorů, který přispěl k tomu, že v daném období nedošlo k přenosu sledovaných bakterií mezi prostředím a pacienty.

5.6 Stanovení výskytu PMQR genů u ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae*

Narůstající počet rezistentních bakteriálních izolátů v dnešní době významně snižuje spolehlivost a účinnost celé řady často používaných antimikrobiálních látek. K těm patří vedle početné skupiny beta-laktamových antibiotik také chinolonová chemoterapeutika. Stále častěji jsou navíc popisovány bakteriální izoláty rezistentní k oběma jmenovaným skupinám léčiv. Velkou úlohu v tom sehrává umístění genů kódujících rezistenci na plasmidech, což významně usnadňuje jejich přenos mezi bakteriemi. Existuje řada prací, které popisují společný záchyt genů pro širokospektré beta-laktamázy společně s geny *qnr*, jež se podílí na rezistenci bakterií k chinolonům [55-63].

Mezi 100 analyzovanými ESBL-pozitivními zástupci *Klebsiella pneumoniae* izolovanými od pacientů hospitalizovaných ve FNOL v letech 2008 až 2011 byly geny *qnr* zachyceny u 56 izolátů. Detekována byla pouze varianta *qnrB*. Získané výsledky je možné porovnávat s údaji z jiných zemí. Častý výskyt *qnr* genů u ESBL- a AmpC-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* uvádí například korejská studie. Autoři zachytili mezi 158 ESBL- a AmpC-pozitivními klinickými izoláty *Klebsiella pneumoniae* 4 % s genem *qnrA* a 40 % izolátů nesoucích geny *qnrB* [59]. Zastoupení *qnr* genů u ESBL-pozitivních enterobakterií bylo sledováno rovněž v Itálii, kde bylo mezi enterobakteriálními izoláty rezistentními k ciprofloxacinu nebo produkujícími enzym ESBL identifikováno 17 % bakterií nesoucích některý z genů *qnr*. Podíl *qnr*-pozitivních izolátů dosáhl u druhu *Klebsiella pneumoniae* dokonce 68 %. V naprosté většině případů (31/32) byla detekována varianta *qnrB19*, pouze jediný izolát nesl gen *qnrA1* [61]. Opačný výsledek uvádí studie provedená v USA, kde byla u izolátů *Klebsiella pneumoniae* rezistentních k ceftazidimu častěji zastoupena varianta *qnrA* (14 %) než *qnrB* (6 %) [154]. *Qnr* geny byly zaznamenány rovněž u ESBL- a AmpC-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* od dětských pacientů v Číně. Autoři detekovali výskyt genu *qnr* u více než 22 % analyzovaných izolátů, přičemž nejčastěji byla zachycena varianta *qnrS* [57]. Nižší prevalenci *qnr* genů u ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* uvádí studie provedená ve Švédsku. Analýza ESBL-pozitivních enterobakterií získaných z klinického materiálu pacientů mezi roky 2001 až 2008 odhalila celkem 4 % *qnr*-pozitivních izolátů. U druhu *Klebsiella pneumonie* byla zaznamenána

prevalence *qnr* genů o něco vyšší, a to 16 %. Zachyceny byly varianty *qnrB1*, *qnrB2* a *qnrS1* [60].

Nedávno publikované práce rovněž naznačují, že určité varianty genů spojených s rezistencí k chinolonům/fluorochinolonům se často vyskytují společně s konkrétními variantami genů kódujících širokospektré beta-laktamázy. Například gen *qnrB* byl detekován u 22 % (10/45) kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí enzymu SHV-12 a u 100 % (54/54) kmenů produkujících beta-laktamázu DHA-1 [59]. Jeong a kolegové zaznamenali u *qnrB4*-pozitivních izolátů geny pro enzymy DHA-1, SHV-12 a CTX-M-3 [55]. V rámci *qnrB*-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* získaných od pacientů hospitalizovaných ve FNOL byl s výjimkou jediného izolátu u všech ostatních detekován gen *bla*_{CTX-M-1-like}. Většina (43/55) z těchto izolátů měla současně gen kódující beta-laktamázu typu TEM. Více než polovina ze 100 analyzovaných zástupců *Klebsiella pneumoniae* nesla plazmid zařazený do inkompatibilní skupiny IncFII. U bakterií patřících do čeledi *Enterobacteriaceae* byl v souvislosti s tímto typem plazmidu pozorován přenos genů *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1} nebo *qnrB4* [155]. Plazmidy IncF jsou u enterobakterií značně rozšířeny a jsou spojeny nejenom s šířením genů kódujících širokospektré beta-laktamázy, ale i dalších genů rezistence jako například *aac(6′)-Ib-cr*, *qnr*, *qepA*, *armA* nebo *rmt* [156]. U izolátů *Klebsiella pneumoniae* z FNOL konjugační experimenty jednoznačně prokazující přenos detekovaných genů na těchto plazmidech prozatím provedeny nebyly a stanou se tématem dalšího výzkumu.

Porovnání identity/podobnosti ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* získaných od pacientů hospitalizovaných ve FNOL prostřednictvím PFGE odhalilo 65 kmenů s jedinečným restričním profilem. Vedle toho bylo nalezeno několik zcela identických izolátů pocházejících od různých pacientů a tento fakt opět zdůrazňuje klíčovou úlohu hygienicko-epidemiologických opatření pro prevenci šíření těchto kmenů.

Výsledky testování citlivosti k antibiotikům odhalily u ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* z FNOL vysokou míru rezistence nejenom k beta-laktamovým antibiotikům, ale současně například k aminoglykosidům nebo fluorochinolonům. Množství antimikrobiálních přípravků, které jsou použitelné pro léčbu infekcí vyvolaných těmito kmeny se tak výrazně redukuje.

Klinický význam *qnr* genů není doposud zcela jednoznačně objasněn. Tyto geny byly detekovány jak u bakterií k chinolonům rezistentních, tak i u izolátů citlivých.

Předpokládá se, že usnadňují přežívání bakterie v přítomnosti nižších koncentrací těchto antimikrobiálních látek, čímž se zvyšuje selekční tlak a pravděpodobnost vzniku a udržení chromozomálních mutací DNA gyrázy a DNA topoizomerázy IV, které jsou spojené s úplnou rezistencí. Přítomnost *qnr* genů na mobilních genetických elementech navíc přispívá k jejich snadnému šíření společně s dalšími geny rezistence, které jsou na plasmidech také přítomny.

6 ZÁVĚRY

Na základě výsledků práce provedené v rámci doktorského studijního programu a zaměřené na identifikaci a typizaci bakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz je možné uvést následující závěry:

1. Byly analyzovány ESBL-a AmpC-pozitivní bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* izolované z klinického materiálu několika skupin hospitalizovaných pacientů.

a) Prevalence ESBL-pozitivních izolátů enterobakterií získaných od pacientů hospitalizovaných ve třech zdravotnických zařízeních (Fakultní nemocnice Olomouc [FNOL], Fakultní nemocnice Ostrava a Krajská nemocnice T. Bati ve Zlíně) se ve sledovaném období roku 2009 pohybovala kolem 7 %. Nejčastěji byly mezi ESBL-pozitivními izoláty zastoupeny druhy *Klebsiella pneumoniae* (9,8-24,5 %), *Klebsiella oxytoca* (1,3-11,4 %) a *Escherichia coli* (2,5-8,3 %).

b) V období od 1. 4. 2008 do 1. 4. 2010 dosáhla prevalence ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií od pacientů z Novorozeneckého oddělení FNOL 3,6 % resp. 1,1 %. Mezi ESBL-produkujícími izoláty byl nejčastěji identifikován druh *Escherichia coli* (43,6 %). AmpC-pozitivní enterobakterie patřily zejména k druhům *Enterobacter* spp. (35,3 %) a *Escherichia coli* (35,3 %).

c) V gastrointestinálním traktu (GIT) osob hospitalizovaných ve FNOL byla v průběhu dvou měsíců roku 2010 zaznamenána 8,2% prevalence bakterií produkujících beta-laktamázy typu ESBL a 0,3% prevalence bakterií s produkcí enzymu AmpC. Většina (19/31) ESBL-pozitivních izolátů náležela k druhu *Klebsiella pneumoniae*. V případě jediného AmpC izolátu se jednalo o kmen *Klebsiella oxytoca*.

2. V prostředí jednotek intenzivní péče KARIM a IPCHO ve FNOL byly během dvou měsíců roku 2010 identifikovány 4 ESBL-pozitivní izoláty (2 izoláty *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Klebsiella oxytoca*) a 7 AmpC-produkujících enterobakterií (4 *Klebsiella pneumoniae* a 3 *Enterobacter cloacae*). Tyto izoláty byly ve všech případech zachyceny ze stěrů z povrchů. Přítomnost bakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy ve vzduchu ani u ošetřujícího zdravotnického personálu ve sledovaném období zaznamenána nebyla.

3. Prevalence ESBL- a AmpC-pozitivních bakterií v GIT komunitních pacientů dosáhla hodnot 3,2 % resp. 1,1 %. Většinu identifikovaných ESBL-produkujících izolátů představovali zástupci druhu *Escherichia coli* (89,7 %). Mezi AmpC-pozitivními bakteriemi byly častější izoláty *Escherichia coli* (30,0 %) a *Citrobacter freundii* (30,0 %).

4. Výsledky genetické analýzy zaměřené na detekci beta-laktamáz ESBL a AmpC lze shrnout následujícími body:

a) Nejčastěji detekovanou beta-laktamázou ESBL byl u izolátů z klinického materiálu novorozenců hospitalizovaných ve FNOL typ CTX-M. Většina (28/29) ESBL-pozitivních izolátů z GIT hospitalizovaných osob nesla gen ze skupiny CTX-M-1. Tento typ byl zachycen rovněž u všech izolátů z nemocničního prostředí. V rámci ESBL-produkujících izolátů z GIT komunitních pacientů byl u poloviny z nich identifikován gen pro enzym ze skupiny CTX-M-1 a u druhé poloviny gen pro enzym ze skupiny CTX-M-9.

b) Multiplex PCR odhalila u AmpC-pozitivních izolátů z klinického materiálu novorozenců hospitalizovaných ve FNOL typy EBC, CIT, DHA a MOX. Vedle toho byl detekován kmen *Escherichia coli* s mutacemi v promotorové oblasti chromozomálního genu *ampC*, které jsou zodpovědné za jeho nadprodukcí. U AmpC-produkujícího izolátu *Klebsiella oxytoca* z klinického materiálu nemocničního pacienta byla detekována beta-laktamáza typu DHA. U všech izolátů z prostředí byl identifikován gen pro enzym typu EBC. V GIT osob z komunitního prostředí byly zachyceny AmpC-pozitivní izoláty produkující beta-laktamázy typu CIT, DHA a EBC.

5. Stanovení identity/podobnosti bakteriálních izolátů s produkcí širokospektrých beta-laktamáz pomocí PFGE detekovalo několik zcela identických izolátů *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli* u několika různých pacientů na novorozeneckém oddělení FNOL a potvrdilo tak šíření těchto rezistentních izolátů mezi pacienty. U kmenů *Klebsiella pneumoniae* z GIT hospitalizovaných pacientů byly identické izoláty detekovány i u pacientů z různých oddělení. Identické izoláty *Klebsiella pneumoniae* a *Enterobacter cloacae* byly zachyceny také ve stěrech z nemocničního prostředí. Přenos izolátů z prostředí na pacienty ani prostřednictvím ošetřujícího personálu zaznamenán nebyl.

6. Geny *qnrB* byly zaznamenány u 56 % ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* získaných od pacientů hospitalizovaných ve FNOL v letech 2008 až 2011. Současný výskyt genu *qnrB* s genem kódujícím beta-laktamázu CTX-M byl pozorován u 55 z 56 izolátů. Nejčastěji detekovaným typem plazmidu byl u této skupiny izolátů plazmid patřící do inkompatibilní skupiny IncFII.

7 SOUHRN

Nové poznatky, objevy a také výrazný rozvoj moderní techniky dává současné medicíně široké možnosti, které umožňují zachránit řadu pacientů. Nicméně množství diagnostických a terapeutických postupů, zejména v oblasti intenzivní péče, s sebou přináší také zvýšené riziko rozvoje bakteriálních infekcí, a to jak klasických exogenních nozokomiálních nálezů, tak rovněž endogenních infekcí vycházejících z přirozené mikroflóry. Bakterie tvoří neoddělitelnou součást lidského života a bakteriální infekce provázejí lidstvo od jeho počátků. Objev penicilinu v roce 1928 a jeho zavedení do klinické praxe před 70 lety znamenalo obrovský přelom v pohledu a přístupu k infekčním onemocněním. Řada dalších antimikrobiálních látek, které byly uvedeny do praxe po penicilinu, dávala naději, že se bakteriální infekce stanou minulostí. Neuvážená aplikace antibiotik však výrazně přispěla a urychlila rozvoj bakteriální rezistence a dnes jsme postaveni před velký problém multirezistentních kmenů.

Otázka rezistence bakterií k antimikrobiálním přípravkům není pouze záležitostí mikrobiologů a mikrobiologických laboratoří, ale má zcela zásadní klinický i ekonomický dopad. Infekce vyvolané rezistentními bakteriemi jsou velmi často spojeny s vysokou pravděpodobností možného selhání antibiotické terapie a s tím souvisejícím vyšším rizikem komplikací, prodloužením doby hospitalizace, s nutností využití dražších antimikrobiálních přípravků a v neposlední řadě se zvýšenou mortalitou pacientů.

Velmi důležitou a početnou skupinu antimikrobiálních látek představují beta-laktamová antibiotika (peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy). Rezistence k těmto látkám je v rámci čeledi *Enterobacteriaceae* založena především na produkci enzymů (tzv. beta-laktamáz), které jsou schopny rozštěpit beta-laktamový kruh antibiotika, což vede k jeho inaktivaci. Velice aktuální je v souvislosti s tímto typem rezistence existence tzv. širokospektrých beta-laktamáz, především ESBL a AmpC, jejichž počet neustále roste a jež jsou schopny vyřadit nejenom základní peniciliny s úzkým spektrem účinku, ale dokážou inaktivovat rovněž cefalosporiny III. a IV. generace. Vedle toho, že se zvyšuje množství popsanych variant enzymů ESBL a AmpC, roste také počet bakteriálních izolátů s tímto typem rezistence. Včasná a spolehlivá detekce etiologického agens, spolu se stanovením citlivosti, je zásadní informací pro nasazení účinné antibiotické terapie. Vzhledem k tomu, že beta-laktamová antibiotika patří mezi

nejpoužívanější antimikrobiální přípravky, představuje znalost místní epidemiologické situace velice významnou informaci pro zahájení iniciální antibiotické léčby obzvláště v případech, kdy není možné čekat na výsledky mikrobiologického vyšetření.

První část disertační práce byla věnována prevalenci enterobakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy ve třech velkých moravských nemocnicích (Fakultní nemocnici Olomouc [FNOL], Fakultní nemocnici Ostrava a Krajské nemocnici T. Bati ve Zlíně), které pokrývají spádovou oblast s téměř 2,5 miliony obyvatel. Četnost ESBL-pozitivních izolátů enterobakterií se ve sledovaném období roku 2009 pohybovala kolem 7 %. Mezi ESBL-pozitivními izoláty byly nejčastěji detekovány druhy *Klebsiella pneumoniae* (9,8-24,5 %), *Klebsiella oxytoca* (1,3-11,4 %) a *Escherichia coli* (2,5-8,3 %). Prevalence ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií od pacientů z Novorozeneckého oddělení FNOL v letech 2008 až 2010 dosáhla 3,6 % resp. 1,1 %. V rámci ESBL-produkujících izolátů byl nejčastěji identifikován druh *Escherichia coli* (43,6 %). AmpC-pozitivní enterobakterie patřily zejména k druhům *Enterobacter* spp. (35,3 %) a *Escherichia coli* (35,3 %). Analýza enterobakterií izolovaných z gastrointestinálního traktu (GIT) osob hospitalizovaných ve FNOL odhalila během dvou měsíců roku 2010 8,2 % prevalenci bakterií produkujících beta-laktamázy typu ESBL a 0,3 % prevalenci bakterií s produkcí enzymu AmpC. Většina (19/31) ESBL-pozitivních izolátů patřila k druhu *Klebsiella pneumoniae*. V případě jediného AmpC-pozitivního izolátu se jednalo o kmen *Klebsiella oxytoca*.

ESBL- a AmpC-produkující izoláty byly rovněž prokázány v prostředí dvou jednotek intenzivní péče FNOL. Identifikovány byly 4 ESBL-pozitivní izoláty (2 izoláty *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Klebsiella oxytoca*) a 7 AmpC-pozitivních enterobakterií (4 *Klebsiella pneumoniae* a 3 *Enterobacter cloacae*). Všechny izoláty produkující širokospektré beta-laktamázy byly získány ze stěrů z povrchů. Výskyt těchto bakterií ve vzduchu ani u ošetřujícího zdravotnického personálu nebyl ve sledovaném období zachycen.

Zaznamenaná prevalence ESBL- a AmpC-pozitivních izolátů čeledi *Enterobacteriaceae* v GIT komunitních pacientů dosáhla hodnot 3,2 % resp. 1,1 %. Většinu mezi identifikovanými ESBL-produkujícími izoláty tvořili zástupci druhu *Escherichia coli* (89,7 %). V rámci AmpC-pozitivních bakterií byly častější izoláty *Escherichia coli* (30,0 %) a *Citrobacter freundii* (30,0 %).

Dalším cílem předložené disertační práce byla bližší charakteristika detekovaných beta-laktamáz ESBL a AmpC. U izolátů z klinického materiálu novorozenců

hospitalizovaných ve FNOL byla nejčastěji detekována ESBL beta-laktamáza typu CTX-M. U většiny (28/29) ESBL-produkujících izolátů z GIT hospitalizovaných osob byl identifikován gen pro beta-laktamázu ze skupiny CTX-M-1. Enzym CTX-M-1-like byl zaznamenán u všech 4 izolátů z nemocničního prostředí. Polovina ESBL-pozitivních izolátů z GIT komunitních pacientů nesla gen pro enzym ze skupiny CTX-M-1, druhá polovina gen pro enzym ze skupiny CTX-M-9. Beta-laktamázy identifikované u AmpC-pozitivních izolátů z klinického materiálu novorozenců hospitalizovaných ve FNOL patřily k typům EBC, CIT, DHA a MOX. Současně byl zachycen kmen *Escherichia coli* s mutacemi v promotorové oblasti chromozomálního genu *ampC*, jež jsou spojené s nadprodukcí AmpC enzymu. AmpC-produkující izolát *Klebsiella oxytoca* z klinického materiálu nemocničního pacienta nesl gen pro beta-laktamázu DHA. Mezi AmpC-pozitivními izoláty z prostředí byl ve všech případech identifikován gen pro enzym typu EBC. V GIT osob z komunitního prostředí byly zachyceny AmpC-pozitivní izoláty produkující beta-laktamázy typu CIT, DHA a EBC.

PFGE odhalila několik zcela identických izolátů *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli* u několika různých pacientů na Novorozeneckém oddělení FNOL a zachytila šíření těchto rezistentních izolátů mezi pacienty. Mezi kmeny *Klebsiella pneumoniae* z GIT hospitalizovaných pacientů byly identické izoláty detekovány i u pacientů z různých klinik FNOL. Identické izoláty *Klebsiella pneumoniae* a *Enterobacter cloacae* byly nalezeny také ve stěrech z nemocničního prostředí. Přenos izolátů z prostředí na pacienty ani prostřednictvím ošetřujícího personálu prokázán nebyl.

Dílčím výsledkem předložené práce byla počáteční analýza bakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy s ohledem na další geny rezistence. Mezi 100 ESBL-pozitivními izoláty *Klebsiella pneumoniae* získanými od pacientů hospitalizovaných ve FNOL v letech 2008 až 2011 byl u 56 detekován gen *qnrB*. U 98 % *qnrB*-pozitivních izolátů byl identifikován gen pro beta-laktamázu typu CTX-M. Nejčastěji byl u této skupiny izolátů zaznamenán plazmid patřící do inkompatibilní skupiny IncFII.

8 SUMMARY

New discoveries, knowledge and great progress of modern technologies represent today a powerful tool for saving many patient lives. However, many diagnostical and therapeutical procedures especially used in intensive care are associated with higher risk of development of bacterial infection either with exogenous nosocomial infection or with endogenous infection caused by natural bacterial microflora. Bacteria are an inseparable part of human life and bacterial infections accompany humankind from its beginning. The discovery of penicillin in 1928 and its introduction into the clinical practice 70 years ago has represented a huge turn in perspective and attitude to infections. Many other antimicrobial agents, which were introduced to practice after discovery of penicillin, have raised hopes of bacterial infections end. But the inappropriate application of antibiotics has contributed and accelerated the development of bacterial resistance so today we are confronted with the big problem of multiresistant strains.

The issue of bacterial resistance to antimicrobials agent is not associated only with microbiologist and microbiology laboratories, but there is a substantial clinical and economic impact. The infections caused by resistant bacteria are often associated with big probability of antibiotic treatment failure, high risk of complications, extension of length of hospital stay, application of more expensive antimicrobial agents and last but not least with higher mortality of patients.

The beta-lactam antibiotics (penicillins, cephalosporins, monobactams, carbapenems) represent a very important and large group of antimicrobial agents. In members of *Enterobacteriaceae* family production of enzymes called beta-lactamases, that are able to cleave antibiotic's beta-lactam ring, represents the most important mechanism of inactivation of these antibiotics. Broad spectrum beta-lactamases especially ESBL and AmpC which number have been rising are able to inactivate not only penicillins with narrow spectrum but also cephalosporins of 3rd and 4th generation. Today there are many variants of ESBL and AmpC enzymes and the numbers of bacterial isolates with this type of resistance have been increasing, too. Early and reliable detection of etiological agent along with determining of its antibiotic susceptibility is essential for choice of effective treatment. With regard to frequent use of beta-lactam antibiotics awareness of local epidemiology situation is very useful information for initiation of

antibiotic therapy especially in cases when it is not possible to wait for results of microbiological examination.

The first part of this thesis was the analysis of the *Enterobacteriaceae* with the production of broad spectrum beta-lactamases in three large hospitals in Moravia (University Hospital Olomouc, University Hospital Ostrava and Regional Baťa Hospital in Zlín) with catchment area of nearly 2.5 millions inhabitants. During the study period in 2009, the frequency of ESBL-positive enterobacterial isolates was about 7%. The most prevalent species of ESBL-producing isolates were *Klebsiella pneumoniae* (9.8-24.5%), *Klebsiella oxytoca* (1.3-11.4%) and *Escherichia coli* (2.5-8.3%). The prevalence of ESBL- and AmpC-positive enterobacteria isolated from infants hospitalized at the Department of Neonatology, University Hospital Olomouc since 2008 to 2010 was found to be 3.6% and 1.1%, respectively. *Escherichia coli* were the most frequently identified species among ESBL-producing isolates (43.6%). AmpC-positive enterobacteria belonged mainly to *Enterobacter* spp. (35.3%) and *Escherichia coli* (35.3%). The analysis of enterobacteria from gastrointestinal tract (GIT) of patients hospitalized in University Hospital Olomouc during two month in 2010 revealed 8.2% prevalence of ESBL-producing bacteria and 0.3% prevalence of bacteria with production of AmpC enzyme. Majority (19/31) of ESBL-positive isolates belonged to *Klebsiella pneumoniae* species. The only AmpC-positive isolate was the strain of *Klebsiella oxytoca* species.

There were also found ESBL- and AmpC-producing isolates in the environment of two intensive care units of University Hospital Olomouc. There were identified 4 ESBL-positive isolates (2 *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Klebsiella oxytoca*) and 7 AmpC-positive enterobacteria (4 *Klebsiella pneumoniae* and 3 *Enterobacter cloacae*). All isolates with production of broad spectrum beta-lactamases were only found among isolates from the hospital surfaces. The occurrence of these bacteria in the air or in health care workers was not detected.

The prevalence of ESBL- and AmpC-positive *Enterobacteriaceae* in GIT of community patients was found to be 3.2% and 1.1%, respectively. The majority (89.7%) of identified ESBL-producing isolates were the members of *Escherichia coli* species. *Escherichia coli* isolates and *Citrobacter freundii* isolates were the most frequent within the AmpC-positive bacteria (30.0% and 30.0%, respectively).

The next aim of this work was the characterization of ESBL and AmpC beta-lactamases that were detected. Among the isolates from neonates hospitalized in University Hospital Olomouc the CTX-M type ESBL beta-lactamase was detected the most frequently. The gene encoding beta-lactamase from group CTX-M-1 was identified in the most cases (28/29) of ESBL-producing isolates from GIT of hospitalized patients. The enzymes CTX-M-1-like were detected in all 4 isolates from hospital environment. One half of ESBL-positive isolates from GIT of community patients carried the gene for enzyme CTX-M-1-like, the second half the gene for enzyme CTX-M-9-like. Beta-lactamases identified in AmpC-positive isolates from clinical material of neonates hospitalized in University Hospital Olomouc belonged to EBC, CIT, DHA and MOX types. There was also detected the strain of *Escherichia coli* with mutations in promoter region of chromosomal *ampC* gene, which were responsible for hyperproduction of corresponding enzyme. AmpC-producing isolate of *Klebsiella oxytoca* from clinical material of hospitalized patient carried the gene for DHA beta-lactamase. Among AmpC-positive isolates from hospital environment the gene for EBC enzyme was identified in all cases. AmpC-positive isolates producing CIT, DHA and EBC beta-lactamases were detected in GIT of community patients.

PFGI identified several identical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* among different infants hospitalized at the Department of Neonatology University Hospital Olomouc and reveal a small clonal spread of these strains. Among *Klebsiella pneumoniae* isolates from GIT of hospitalized patients there were identified identical isolates not only in different patients in the same ward but also in different wards of University Hospital Olomouc. Identical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* were found among isolates from the surface swabs of hospital environment. No similarity was found neither between environmental isolates and strains isolated from patients, nor between isolates from patients and from health care workers over the study period.

The constituent result of this work was the initial analysis of bacteria producing broad spectrum beta-lactamases with respect to other resistance genes. The gene *qnrB* was detected in 56 from 100 ESBL-positive isolates of *Klebsiella pneumoniae* from patients hospitalized in University Hospital Olomouc since 2008 to 2011. The genes for

CTX-M type beta-lactamase were identified in 98% of *qnrB*-positive isolates. The most frequently detected plasmids belonged to IncFII incompatibility group.

9 POUŽITÁ LITERATURA

1. Levy SB. The antibiotic paradox: how the misuse of antibiotics destroys their curative powers. 2nd ed. Cambridge, MA:Perseus Publishing, 2002.
2. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(3):417-433.
3. Kolář M. Možnosti řešení problému rezistence bakterií k antibiotikům. *Farmakoterapie.* 2011;7:20-32.
4. Urbánek K, Kolář M, Lovecková Y, Strojil J, Santavá L. Influence of third-generation cephalosporin utilization on the occurrence of ESBL-positive *Klebsiella pneumoniae* strains. *J Clin Pharm Ther.* 2007;32(4):403-408.
5. Kolář M, Urbánek K, Látal T. Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;17(5):357-363.
6. Aarestrup FM. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int J Antimicrob Agents.* 1999;12(4):279-285.
7. Schmieder R, Edwards R. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiol.* 2012;7(1):73-89.
8. Cosgrove SE, Carmeli Y. The impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes. *Clin Infect Dis.* 2003;36(11):1433-1437.
9. Cars O, Norberg P. Antibiotic resistance - The faceless threat. *Int J Risk Saf Med.* 2005;17:103-110.
10. Norberg P, Monnet DL, Cars O. Antibacterial drug resistance. Background document to Priority Medicines for Europe and the World, 2004 <http://www.reactgroup.org/resources/react-publications/general-documents.html>
11. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis.* 2001;32(8):1162-1171.
12. Alvarez-Lerma F. Modification of empiric antibiotic treatment in patients with pneumonia acquired in the intensive care unit. ICU-Acquired Pneumonia Study Group. *Intensive Care Med.* 1996;22(5):387-394.
13. Luna CM, Vujacich P, Niederman MS, et al. Impact of BAL data on the therapy and outcome of ventilator-associated pneumonia. *Chest.* 1997;111(3):676-685.
14. Rello J, Gallego M, Mariscal D, Soñora R, Valles J. The value of routine microbial investigation in ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Jul;156(1):196-200.
15. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest.* 2000;118(1):146-155.

16. Vallés J, Rello J, Ochagavía A, Garnacho J, Alcalá MA. Community-acquired bloodstream infection in critically ill adult patients: impact of shock and inappropriate antibiotic therapy on survival. *Chest*. 2003;123(5):1615-1624.
17. Micek ST, Welch EC, Khan J, et al. Resistance to empiric antimicrobial treatment predicts outcome in severe sepsis associated with Gram-negative bacteremia. *J Hosp Med*. 2011;6(7):405-410.
18. McNulty CA, Richards J, Livermore DM, et al. Clinical relevance of laboratory-reported antibiotic resistance in acute uncomplicated urinary tract infection in primary care. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(5):1000-1008.
19. Kolář M, Látal T, Čermák P. Klinicko-mikrobiologické podklady racionální antibiotické léčby. 2002; Trios, Praha.
20. Wright GD. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Curr Opin Chem Biol*. 2003;7(5):563-569.
21. Walsh C. Antibiotics: action, origins, resistance. 2003; ASM Press, Washington, DC.
22. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med*. 2006;119(6 Suppl 1):S3-10.
23. Woodford N, Ellington MJ. The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(1):5-18.
24. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. <http://www.lahey.org/Studies/>
25. Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol*. 2008;153 Suppl 1:S347-457.
26. Hawkey PM. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ*. 1998;317(7159):657-660.
27. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005 Jul 29;57(10):1451-470.
28. Džidić S, Šušković J, Kos B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technol Biotechnol*. 2008;46(1):11-21.
29. Hooper DC. Quinolone mode of action. *Drugs*. 1995;49 Suppl 2:10-15.
30. Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(10):1486-1513.
31. Ananthan S, Subha A. Cefoxitin resistance mediated by loss of a porin in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Indian J Med Microbiol*. 2005;23(1):20-23.
32. Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2001;3(2):255-264.
33. Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilionis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*. 2011;47(3):137-146.

34. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6):1211-1233.
35. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969-976.
36. EARS-Net. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. <http://www.ecdc.europa.eu/>
37. Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E et al. Predictors of Mortality in Patients with Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*: Importance of Inadequate Initial Antimicrobial Treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(6):1987-1994.
38. Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Kaye KS, Ben-Ami R, Schwartz D, Carmeli Y. Clinical and economic impact of bacteremia with extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(4):1257-1262.
39. Kang CI, Kim SH, Park WB, et al. Clinical outcome of bacteremic spontaneous bacterial peritonitis due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Korean J Intern Med.* 2004;19(3):160-164.
40. Pai H, Kang CI, Byeon JH, et al. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(10):3720-3728.
41. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):657-686.
42. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;28(2):302-307.
43. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):933-951.
44. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:165-174.
45. Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):1-14.
46. Poirel L, Kämpfer P, Nordmann P. Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(12):4038-4040.
47. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill* 2008;13(47):pii=19044. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19044>

48. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(1):52-59.
49. Rawat D, Nair D. Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *J Glob Infect Dis.* 2010;2(3):263-274.
50. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):161-182.
51. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(1):1-11.
52. Yu W, Bing L, Zhenhua L. AmpC Promoter and Attenuator Mutations Affect Function of Three *Escherichia coli* Strains. *Curr Microbiol* 2009;59:244–247.
53. Denton M. *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;29 Suppl 3:S9-S22.
54. Potz NA, Hope R, Warner M, Johnson AP, Livermore DM; London & South East ESBL Project Group. Prevalence and mechanisms of cephalosporin resistance in *Enterobacteriaceae* in London and South-East England. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(2):320-326.
55. Jeong HS, Bae IK, Shin JH, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and its association with extended-spectrum beta-lactamase and AmpC beta-lactamase in *Enterobacteriaceae*. *Korean J Lab Med.* 2011;31(4):257-264.
56. Luo Y, Yang J, Zhang Y, Ye L, Wang L, Guo L. Prevalence of β -lactamases and 16S rRNA methylase genes amongst clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance determinants. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;37(4):352-355.
57. Wang A, Yang Y, Lu Q, et al. Occurrence of qnr-positive clinical isolates in *Klebsiella pneumoniae* producing ESBL or AmpC-type beta-lactamase from five pediatric hospitals in China. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;283(1):112-116.
58. Crémet L, Caroff N, Dauvergne S, Reynaud A, Lepelletier D, Corvec S. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL *Enterobacteriaceae* clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. *Pathol Biol (Paris).* 2011;59(3):151-156.
59. Pai H, Seo MR, Choi TY. Association of QnrB determinants and production of extended-spectrum beta-lactamases or plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(1):366-368.
60. Fang H, Huang H, Shi Y, Hedin G, Nord CE, Ullberg M. Prevalence of qnr determinants among extended-spectrum beta-lactamase-positive *Enterobacteriaceae* clinical isolates in southern Stockholm, Sweden. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;34(3):268-270.
61. Richter SN, Frasson I, Bergo C, Manganelli R, Cavallaro A, Palù G. Characterisation of qnr plasmid-mediated quinolone resistance in *Enterobacteriaceae* from Italy: association of the *qnrB19* allele with the integron element ISCR1 in *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(6):578-583.

62. Corkill JE, Anson JJ, Hart CA. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(6):1115-1117.
63. Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(5):1003-1006.
64. Hooper DC. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis.* 2000;31 Suppl 2:S24-28.
65. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;25(5):358-373.
66. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* 1998;351(9105):797-799.
67. Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies. *Front Microbiol.* 2012;3:24.
68. qnr Numbering and Sequence. <http://www.lahey.org/qnrStudies/>
69. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(4):664-689.
70. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement. M100-S17. 2007.
71. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. <http://www.eucast.org/>.
72. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* 1988;10:867-878.
73. Htoutou Sedlakova M, Hanulik V, Chroma M, et al. Phenotypic detection of broad-spectrum beta-lactamases in microbiological practice. *Med Sci Monit.* 2011;17(5):BR147-152.
74. Kolář M. Klinický význam širokospektrých β -laktamáz a zkušenosti s jejich identifikací v mikrobiologické praxi. *Klin Mikrobiol Inf Léč.* 2007;13:195-205.
75. Tzouvelekis LS, Vatopoulos AC, Katsanis G, Tzelepi E. Rare case of failure by an automated system to detect extended-spectrum β -lactamase in a cephalosporin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate. *J Clin Microbiol.* 1999;37(7):2388.
76. Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, et al. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2551-2558.
77. Arlet G, Bami G, Décrè D, et al. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM β -lactamases. *FEMS Microbiol Lett.* 1995;134:203-208.

78. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. Characterisation of extended-spectrum β -lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *FEMS Microbiol Lett.* 2000;184:85-89.
79. Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, et al. Multiple CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in northern Italy. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4264-4269.
80. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2153-2162.
81. M'Zali FH, Gascoyne-Binzi DM, Heritage J, Hawkey PM. Detection of mutations conferring extended-spectrum activity on SHV beta-lactamases using polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). *J Antimicrob Chemother.* 1996;37(4):797-802.
82. Briñas L, Zarazaga M, Sáenz Y, Ruiz-Larrea F, Torres C. Beta-lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(10):3156-3163.
83. Chromá M, Hricová K, Kolář M, Sauer P, Koukalová D. Using newly developed multiplex polymerase chain reaction and melting curve analysis for detection and discrimination of β -lactamases in *Escherichia coli* isolates from intensive care patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;71(3):181-191.
84. Guillard T, Moret H, Brasme L, et al. Rapid detection of *qnr* and *qepA* plasmid-mediated quinolone resistance genes using real-time PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70(2):253-259.
85. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:394-397.
86. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 2005;63(3):219-228.
87. Galas M, Decousser JW, Breton N, Godard T, Allouch PY, Pina P; Collège de Bactériologie Virologie Hygiène (ColBVH) Study Group. Nationwide study of the prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(2):786-789.
88. Batchoun RG, Swedan SF, Shurman AM. Extended spectrum beta-lactamases among gram-negative bacterial isolates from clinical specimens in three major hospitals in northern Jordan. *Int J Microbiol.* 2009; 2009: 513874.
89. Ko KS, Lee MY, Song JH, et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated in Korean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008; 61: 453-459.
90. Sturm PD, Bochum ET, van Mook-Vermulst SV, Handgraaf C, Klaassen T, Melchers WJ. Prevalence, molecular characterization, and phenotypic confirmation of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,

- and *Klebsiella oxytoca* at the Radboud University Nijmegen Medical Centre in The Netherlands. *Microb Drug Resist*. 2010;16(1):55-60.
91. Singh N, Patel KM, Léger MM, et al. Risk of resistant infections with *Enterobacteriaceae* in hospitalized neonates. *Pediatr Infect Dis J*. 2002;21:1029-1033.
 92. Kamath S, Mallaya S, Shenoy S. Nosocomial infections in neonatal intensive care units: profile, risk factor assessment and antibiogram. *Indian J Pediatr*. 2010;77:37-39.
 93. Linkin DR, Fishman NO, Patel JB, Merrill JD, Lautenbach E. Risk factors for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004;25(9):781-783.
 94. Kesselová M, Kolář M, Sauer P, et al. Molecular biology characteristics of ESBL-positive strains of *Klebsiella pneumoniae* collected in the Neonatal Unit of the Teaching Hospital in Olomouc. *Klin Mikrobiol Inf Lék*. 2005;11(1):20-24.
 95. Biran V, Gaudin A, Mariani-Kurdjian P, Doit C, Bingen E, Aujard Y. Implication of extended-spectrum beta-lactamase *Enterobacteriaceae* in nosocomial infections in neonates. *Arch Pediatr*. 2010;17 Suppl 4:S150-153.
 96. Bhattacharjee A, Sen MR, Prakash P, Gaur A, Anupurba S. Increased prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producers in neonatal septicaemic cases at a tertiary referral hospital. *Indian J Med Microbiol*. 2008;26(4):356-360.
 97. Aktas E, Yigit N, Yazgi H, Ayyildiz A. Detection of antimicrobial resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* strains from infected neonates. *J Int Med Res*. 2002;30(4):445-448.
 98. Jain A, Roy I, Gupta MK, Kumar M, Agarwal SK. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase producing Gram-negative bacteria in septicaemic neonates in a tertiary care hospital. *J Med Microbiol*. 2003;52:421-425.
 99. Ding H, Yang Y, Lu Q, et al. The prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from five children's hospitals in China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27(10):915-921.
 100. Cezário RC, Ribas RM, Abdallah VO, Carneiro CL, Gontijo Filho PP. Infection and colonization by Gram-negative bacilli in neonates hospitalized in High Risk Nursery at Uberlandia Federal University Hospital: etiology, resistant phenotypes and risk factors. *Braz J Microbiol*. 2004;35:193-198.
 101. Al-Jasser AM. Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs): A global problem. *Kuwait Med J*. 2006;38:171-185.
 102. Reddy P, Malczynski M, Obias A, et al. Screening for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* among high-risk patients and rates of subsequent bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2007;45(7):846-852.
 103. Lucet JC, Chevret S, Décré D, et al. Outbreak of multiply resistant *Enterobacteriaceae* in an intensive care unit: epidemiology and risk factors for acquisition. *Clin Infect Dis*. 1996;22(3):430-436.

104. Meyer E, Serr A, Schneider C, et al. Should we screen patients for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in intensive care units? *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009;30(1):103-105.
105. Livermore DM, Paterson DL. Pocket guide to extended spectrum β -lactamases in resistance. Current Medicine Group Ltd, Spain, 2006.
106. Cekanova L, Kolar M, Chroma M, et al. Prevalence of ESBL-positive bacteria in the community in the Czech Republic. *Med Sci Monit* 2009;15(7):BR202-206.
107. Castillo García FJ, Seral García C, Pardos De la Gandara M, Millán Lou MI, Pitart Ferré C. Prevalence of fecal carriage of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in hospitalized and ambulatory patients during two non-outbreak periods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26:77-78.
108. Strömdahl H, Tham J, Melander E, Walder M, Edquist PJ, Odenholt I. Prevalence of faecal ESBL carriage in the community and in a hospital setting in a county of Southern Sweden. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Oct;30(10):1159-1162.
109. Paniagua R, Valverde A, Coque TM, Baquero F, Cantón R. Assessment of prevalence and changing epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* fecal carriers using a chromogenic medium. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;67(4):376-379.
110. Miró E, Mirelis B, Navarro F, et al. Surveillance of extended-spectrum beta-lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(6):1152-1155.
111. Overdeest I, Willemsen I, Rijnsburger M, et al. Extended-spectrum β -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(7):1216-1222.
112. Kader AA, Kumar A, Kamath KA. Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in patients and asymptomatic healthy individuals. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007 Sep;28(9):1114-1116.
113. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA*. 1995 Aug 23-30;274(8):639-644.
114. Dhillon RH, Clark J. ESBLs: A Clear and Present Danger? *Crit Care Res Pract*. 2012;2012:625170.
115. Grundmann H, Bärwolff S, Tami A, et al. How many infections are caused by patient-to-patient transmission in intensive care units? *Crit Care Med*. 2005;33(5):946-951.
116. Paterson DL, Yu VL. Extended-spectrum beta-lactamases: a call for improved detection and control. *Clin Infect Dis*. 1999;29(6):1419-1422.
117. Pittet D, Allegranzi B, Sax H, et al. Evidence-based model for hand transmission during patient care and the role of improved practices. *Lancet Infect Dis* 2006;6:641-652.

118. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis.* 2006;6:130.
119. Lemmen SW, Häfner H, Zolldann D, Stanzel S, Lütticken R. Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. *J Hosp Infect.* 2004;56(3):191-197.
120. Bauer TM, Ofner E, Just HM, Just H, Daschner FD. An epidemiological study assessing the relative importance of airborne and direct contact transmission of microorganisms in a medical intensive care unit. *J Hosp Infect.* 1990;15(4):301-309.
121. D'Agata EM, Venkataraman L, DeGirolami P, Samore M. Molecular epidemiology of ceftazidime-resistant gram-negative bacilli on inanimate surfaces and their role in cross-transmission during nonoutbreak periods. *J Clin Microbiol.* 1999;37(9):3065-3067.
122. Touati A, Brasme L, Benallaoua S, Madoux J, Gharout A, de Champs C. *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing CTX-M-15 recovered from hospital environmental surfaces from Algeria. *J Hosp Infect.* 2008;68(2):183-185.
123. Guet-Revillet H, Le Monnier A, Breton N, et al. Environmental contamination with extended-spectrum β -lactamases: Is there any difference between *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp? *Am J Infect Control.* 2012 Feb 9. [Epub ahead of print]
124. Cantón R, Novais A, Valverde A, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl. 1):144–153.
125. Valverde A, Coque TM, Sanchez-Moreno MP, et al. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended- spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol* 2004;42:4769–4775.
126. Janvier F, Mérens A, Delaune D, Soler C, Cavallo JD. Portage digestif d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération dans une population d'adultes jeunes asymptomatiques: évolution entre 1999 et 2009. *Pathol Biol (Paris)* 2011;59(2):97-101.
127. Munday CJ, Whitehead GM, Todd NJ, et al. Predominance and genetic diversity of community and hospital acquired CTX-M extended-spectrum β -lactamases in York, UK. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:628-633.
128. Rodríguez-Baño J, López-Cerero L, Navarro MD, et al. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:1142-1149.
129. Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, et al. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum β -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:735-743.
130. Kaneko K, Sato Y, Tokunaga S, et al: AmpC beta-lactamase-mediated cefpodoxime-resistant *Escherichia coli* isolated from faecal samples of healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:369-371.

131. Hammerum AM, Lester CH, Jakobsen L, Porsbo LJ. Faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC β -lactamase-producing bacteria among Danish army recruits. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:566-568.
132. Desimoni MC, Esquivel GP, Merino LA. Fecal colonization by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004 Nov;22(9):507-511.
133. Shakil S, Akram M, Ali SM, Khan AU. Acquisition of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* strains in male and female infants admitted to a neonatal intensive care unit: molecular epidemiology and analysis of risk factors. *J Med Microbiol*. 2010;59(Pt 8):948-954.
134. Bagattini M, Crivaro V, Di Popolo A, et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(5):979-982.
135. Kristóf K, Szabó D, Marsh JW, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* spp. in a neonatal intensive care unit: risk factors for the infection and the dynamics of the molecular epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007;26(8):563-570.
136. Touati A, Zenati K, Brasme L, Benallaoua S, de Champs C. Extended-spectrum beta-lactamase characterisation and heavy metal resistance of *Enterobacteriaceae* strains isolated from hospital environmental surfaces. *J Hosp Infect*. 2010;75(1):78-79.
137. Bogaerts P, Rodriguez-Villalobos H, Bauraing C, et al. Molecular characterization of AmpC-producing *Escherichia coli* clinical isolates recovered at two Belgian hospitals. *Pathol Biol*. 2010;58(1):78-83.
138. Caroff N, Espaze E, Gatreau D, Richet H, Reynaud A. Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC. *J Antimicrob Chemother*. 2000;45:783-788.
139. Singtohin S, Chanawong A, Lulitanond A, et al. CMY-2, CMY-8b, and DHA-1 plasmid-mediated AmpC β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from a university hospital, Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;68(3):271-277.
140. Li Y, Li Q, Du Y, et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in a Chinese university hospital from 2003 to 2005: first report of CMY-2-Type AmpC beta-lactamase resistance in China. *J Clin Microbiol*. 2008;46(4):1317-21.
141. Poole K. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(17):2200-2223.
142. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(3):512-530.
143. Henderson E. Hand hygiene and the transmission of bacilli in a neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis*. 2004 15;38(12):1688-9.
144. Cohen B, Saiman L, Cimiotti J, Larson E. Factors associated with hand hygiene practices in two neonatal intensive care units. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22(6):494-499.

145. Waters V, Larson E, Wu F, et al. Molecular epidemiology of gram-negative bacilli from infected neonates and health care workers' hands in neonatal intensive care units. *Clin Infect Dis*. 2004;38(12):1682-1687.
146. Tschudin-Sutter S, Frei R, Battegay M, Hoesli I, Widmer AF. Extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in neonatal care unit. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(11):1758-1760.
147. Gupta A, Della-Latta P, Todd B, et al. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit linked to artificial nails. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004;25(3):210-215.
148. Larson EL. Persistent carriage of gram-negative bacteria on hands. *Am J Infect Control*. 1981;9(4):112-119.
149. Hartmann B, Benson M, Junger A, et al. Computer keyboard and mouse as a reservoir of pathogens in an intensive care unit. *J Clin Monit Comput*. 2004;18(1):7-12.
150. Levin PD, Shatz O, Svirj S, et al. Contamination of portable radiograph equipment with resistant bacteria in the ICU. *Chest*. 2009;136(2):426-432.
151. Neely AN, Maley MP. Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastic. *J Clin Microbiol*. 2000;38(2):724-726.
152. Neely AN. A survey of gram-negative bacteria survival on hospital fabrics and plastics. *J Burn Care Rehabil*. 2000;21(6):523-527.
153. Pittet D, Dharan S, Touveneau S, Sauvan V, Perneger TV. Bacterial contamination of the hands of hospital staff during routine patient care. *Arch Intern Med*. 1999 Apr 26;159(8):821-826.
154. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. qnr prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50: 2872-2874.
155. Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(6):2227-2238.
156. Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol*. 2011;301(8):654-658.

10 PUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY

V následujících kapitolách jsou uvedeny publikační výsledky vycházející z řešení disertační práce.

10.1 Publikace v časopisech s impakt faktorem

Husičková V, Chromá M, Kolář M, Hricová K, Štosová T, Kantor L, Dubrava L. Analysis of ESBL- and AmpC-Positive *Enterobacteriaceae* at the Department of Neonatology, University Hospital Olomouc. *Current Microbiology*. 2011; 62(6):1664-1670. IF 2010: 1,51

Uvízl R, Hanulík V, Husickova V, Htoutou Sedlakova M, Adamus M, Kolar M. Hospital-acquired pneumonia in ICU patients. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2011; 155(4):373-378. IF 2010: 0,716

Husickova V, Cekanova L, Chroma M, Htoutou-Sedlakova M, Hricova K, Kolar M. Carriage of ESBL- and AmpC-positive *Enterobacteriaceae* in the gastrointestinal tract of community subjects and hospitalized patients in the Czech Republic. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2012; in press. IF 2010: 0,716

10.2 Publikace v recenzovaných časopisech bez impakt faktoru

Kolář M, Chromá M, Hricová K, Husičková V, Lovečková Y, Chmelařová E, Bartoníková N, Rybníkářová P. Prevalence ESBL-pozitivních enterobakterií ve velkých moravských nemocnicích. *Klin Mikrobiol Inf Léč*. 2010; 16(5):152-157.

Husičková V, Htoutou Sedláková M, Matoušková I, Chromá M, Kolář M. Analýza enterobakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v prostředí jednotek intenzivní péče. *Nozokomiální nákazy*. 2011; 10(3):6-8.

Hanulík V, Uvízl R, Husičková V, Htoutou Sedláková M, Kolář M. Bakteriální původci pneumonií u pacientů v intenzivní péči. *Klin Mikrobiol Inf Léč*. 2011; 17(4):134-139.

Husičková V, Chromá M, Htoutou Sedláková M, Kolář M. Výskyt *qnr* genů u ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae*. *Klin Mikrobiol Inf Léč*. 2012; v tisku.

10.3 Přednášky a postery s abstraktem

Husičková V, Chromá M, Hricová K, Sauer P. Genetická detekce rezistence u bakteriálních původců sepsí. 14. pracovní setkání „Antibiotická politika“: ATB léčba v intenzivní medicíně. Soláň 2010.

Husičková V, Chromá M, Hricová K, Štosová T, Kolář M, Kantor L. Genetická analýza ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií na novorozeneckém oddělení Fakultní nemocnice Olomouc. XVIII. moravsko-slovenské mikrobiologické dny. Jihlava 2010.

Husičková V, Chromá M, Hricová K, Štosová T, Kolář M, Kantor L. Analýza ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií na novorozeneckém oddělení Fakultní nemocnice Olomouc. 25. kongres ČSSM, Stará Lesná 2010.

Husičková V, Chromá M, Htoutou Sedláková M, Kantor L, Kolář M. Epidemiologie širokospektrých beta-laktamáz. 15. pracovní setkání „Antibiotická politika“: Epidemiologie nozokomiálních infekcí. Soláň 2011.

Husičková V, Čekanová L, Chromá M, Htoutou-Sedláková M, Hricová K, Kolář M. Nosičství ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií v gastrointestinálním traktu osob v komunitě a hospitalizovaných pacientů. Kongres klinické mikrobiologie a infekčních nemocí; 3. ročník. Plzeň 2011.

11 SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ A GRAFŮ

11.1 Seznam tabulek

- Tabulka 1:** Nukleotidové sekvence primerů pro detekci genů *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M}
- Tabulka 2:** Složení reakční směsi pro detekci jednotlivých genů *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M}
- Tabulka 3:** Podmínky PCR pro detekci genů *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M}
- Tabulka 4:** Nukleotidové sekvence primerů pro detekci genů *bla*_{AmpC}
- Tabulka 5:** Složení reakční směsi multiplex PCR pro detekci jednotlivých genů *bla*_{AmpC}
- Tabulka 6:** Podmínky PCR pro detekci genů *bla*_{AmpC}
- Tabulka 7:** Nukleotidové sekvence primerů pro multiplex PCR detekující geny *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M}
- Tabulka 8:** Složení reakční směsi pro multiplex PCR detekující geny *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M}
- Tabulka 9:** Podmínky multiplex PCR detekující geny *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} a *bla*_{CTX-M}
- Tabulka 10:** Nukleotidové sekvence primerů pro detekci genů *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*
- Tabulka 11:** Složení reakční směsi pro multiplex PCR detekující geny *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*
- Tabulka 12:** Podmínky multiplex PCR detekující geny *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*
- Tabulka 13:** Nukleotidové sekvence primerů pro typizaci plazmidů
- Tabulka 14:** Složení reakční směsi multiplex PCR pro typizaci plazmidů
- Tabulka 15:** Složení reakční směsi simplex PCR pro typizaci plazmidů
- Tabulka 16:** Podmínky PCR pro typizaci plazmidů
- Tabulka 17:** Přehled izolovaných enterobakterií na Novorozeneckém oddělení Fakultní nemocnice Olomouc v období 1. 4. 2008 - 1. 4. 2010
- Tabulka 18:** Přehled ESBL- a AmpC-pozitivních izolátů zachycených v GIT osob hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Olomouc v období 1. 3. 2010 - 1. 5. 2010
- Tabulka 19:** Druhové zastoupení ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií zachycených v prostředí KARIM a IPCHO v období listopad-prosinec 2010
- Tabulka 20:** Přehled ESBL- a AmpC-pozitivních izolátů zachycených v GIT pacientů z komunitního prostředí olomouckého regionu v období 1. 3. 2010- 1. 5. 2010
- Tabulka 21:** Výskyt *bla* genů kódujících jednotlivé typy beta-laktamáz u ESBL-pozitivních enterobakterií z klinického materiálu novorozenců
- Tabulka 22:** Výskyt *bla* genů kódujících jednotlivé typy beta-laktamáz u enterobakterií z GIT hospitalizovaných osob
- Tabulka 23:** Výskyt *bla* genů kódujících jednotlivé typy beta-laktamáz u enterobakterií z prostředí KARIM a IPCHO

- Tabulka 24:** Výskyt *bla* genů kódujících jednotlivé typy beta-laktamáz u enterobakterií z GIT pacientů z komunitního prostředí
- Tabulka 25:** Výskyt a typy AmpC beta-laktamáz u enterobakterií z klinického materiálu novorozenců
- Tabulka 26:** Výskyt a typy AmpC beta-laktamáz u enterobakterií z GIT pacientů z komunitního prostředí
- Tabulka 27:** Přehled ESBL- a AmpC-pozitivních izolátů od pacientů
- Tabulka 28:** Genetická analýza ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae*
- Tabulka 29:** Přehled zastoupení plazmidů a jejich zařazení do Inc skupiny u jednotlivých izolátů *Klebsiella pneumoniae* včetně přítomnosti genu *qnrB* a typu beta-laktamázy
- Tabulka 30:** Rezistence ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* k antimikrobním přípravkům v procentech

11.2 Seznam obrázků

- Obrázek 1:** Modifikovaný Double Disk synergy Test [73]
- Obrázek 2:** AmpC diskový test [73]
- Obrázek 3:** Dendrogram ESBL-pozitivních izolátů *Escherichia coli* z klinického materiálu novorozenců
- Obrázek 4:** Dendrogram ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* z klinického materiálu novorozenců
- Obrázek 5:** Dendrogram ESBL-pozitivních izolátů *Escherichia coli* z gastrointestinálního traktu hospitalizovaných osob
- Obrázek 6:** Dendrogram ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* z gastrointestinálního traktu hospitalizovaných osob
- Obrázek 7:** Dendrogram ESBL- a AmpC-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* z nemocničního prostředí
- Obrázek 8:** Dendrogram AmpC-pozitivních izolátů *Enterobacter* spp. z nemocničního prostředí
- Obrázek 9:** Dendrogram ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* izolovaných v roce 2008
- Obrázek 10:** Dendrogram ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* izolovaných v roce 2010

11.3 Seznam grafů

- Graf 1:** Mortalita pacientů se závažnými infekcemi v závislosti na iniciální antibiotické terapii
- Graf 2:** Počet enterobakterií izolovaných v období 1. 1. -31. 12. 2009 ve třech zdravotnických zařízeních (Fakultní nemocnice Olomouc, Fakultní nemocnice Ostrava, Krajská nemocnice T. Bati ve Zlíně) a procentuelní vyjádření podílu ESBL-pozitivních izolátů
- Graf 3:** Druhové zastoupení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* včetně izolátů s produkcí enzymů typu ESBL v klinickém materiálu pacientů hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Olomouc
- Graf 4:** Druhové zastoupení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* včetně izolátů s produkcí enzymů typu ESBL v klinickém materiálu pacientů hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Ostrava
- Graf 5:** Druhové zastoupení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* včetně izolátů s produkcí enzymů typu ESBL v klinickém materiálu pacientů hospitalizovaných v Krajské nemocnici T. Bati ve Zlíně

12 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAC(6')-Ib	enzym aminoglykosidacetyltransferáza
AAC(6')-Ib-cr	varianta enzymu aminoglykosidacetyltransferázy spojená s rezistencí k chinolonovým antibiotikům
ACC	skupina AmpC beta-laktamáz
A, C, G, T	zkratky nukleových bazí (adenin, cytosin, guanin, tymin)
AmpC	skupina beta-laktamáz se širokým spektrem účinku (molekulární třída C podle Amblera)
<i>ampC</i>	gen kódující beta-laktamázu AmpC
<i>ampD</i>	gen zahrnutý v regulaci chromozomálního genu <i>ampC</i>
<i>ampG</i>	gen zahrnutý v regulaci chromozomálního genu <i>ampC</i>
<i>ampR</i>	gen zahrnutý v regulaci chromozomálního genu <i>ampC</i>
<i>bla</i>	gen kódující beta-laktamázu
bp	pár nukleotidových bazí
CH ₃ COOH	kyselina octová (kyselina ethanová)
CH ₃ COOK	octan draselný (ethanoát draselný)
CIT	skupina AmpC beta-laktamáz
CMY	typ AmpC beta-laktamázy
CTX-M	skupina beta-laktamáz se širokým spektrem účinku (molekulární třída A podle Amblera)
D-Ala	D-alanin
DDST	Double Disk Synergy Test
DHA	skupina AmpC beta-laktamáz
DK	dětská klinika
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP's	deoxyribonukleosidtrifosfáty (angl. deoxyriboNucleosideTriPhosphates)
EARS-Net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
EBC	skupina AmpC beta-laktamáz
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ESBL	beta-laktamázy se širokým spektrem účinku (angl. extended-spectrum beta-lactamase)
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
FOX	skupina AmpC beta-laktamáz

GIT	gastrointestinální trakt (angl. gastrointestinal tract)
<i>gyrA</i>	gen kódující GyrA podjednotku DNA gyrázy
<i>gyrB</i>	gen kódující GyrB podjednotku DNA gyrázy
HCl	kyselina chlorovodíková
HOK	hemato-onkologická klinika
II. IK	II. interní klinika
III. IK	III. interní klinika
Inc skupina	inkompatibilní skupina
IPCHO	oddělení intenzivní péče chirurgických oborů
JIP	jednotka intenzivní péče
KARIM	klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny
KCl	chlorid draselný
MALDI-TOF	typ hmotnostní spektrometrie, ionizace laserem za přítomnosti matrice (angl. matrix-assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s detektorem doby letu (time-of-flight)
MgCl ₂	chlorid hořečnatý
MH agar	Mueller-Hinton agar
MOX	skupina AmpC beta-laktamáz
NaOH	hydroxid sodný
NICU	oddělení neonatální intenzivní a resuscitační péče
OqxAB	protein fungující jako efluxní pumpa
OXA	skupina beta-laktamáz (molekulární třída D podle Amblera)
<i>parC</i>	gen kódující ParC podjednotku DNA topoizomerázy IV
<i>parE</i>	gen kódující ParE podjednotku DNA topoizomerázy IV
PBP	penicilin vázající proteiny (angl. penicillin binding proteins)
pCMB	p-chloromerkuribenzoát
PCR	polymerázová řetězová reakce (angl. polymerase chain reaction)
PFGE	pulzní gelová elektroforéza (angl. pulse field gel electrophoresis)
PMQR	plasmid-mediated quinolone resistance
QepA	protein fungující jako efluxní pumpa
qnr	proteiny podílející se na ochraně enzymů DNA gyrázy a topoizomerázy IV
<i>qnr</i>	gen kódující protein qnr
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina

SDS	dodecylsulfát sodný
SHV	skupina beta-laktamáz (molekulární třída A podle Amblera)
TBE pufr	pufr Tris - kyselina boritá - EDTA
TEM	skupina beta-laktamáz (molekulární třída A podle Amblera)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
w/v	hmotnostní zlomek (angl. weight/volume)