



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Detekce producentů širokospektré beta – laktamázy
(ESBL – Extended Spectrum Beta – Lactamase)
v komunitě a v nemocnici

Vypracovala: Lucie Polenová
Vedoucí práce: MUDr. Magdalena Horníková

České Budějovice 2014

Abstrakt

Výskyt rezistentních bakterií na dostupná antibiotika je vážným civilizačním problémem. Statistiky ukazují, že prevalence se neustále zvyšuje a to v celosvětovém měřítku. Pokud by se situace stále zhoršovala, mohlo by se lidstvo dostat znovu do časů, které panovaly před vynálezem antibiotik. Důvodem by byla jejich téměř nulová účinnost antibiotik. Bakterie se vyznačují schopností rezistence, která se u nich vyskytuje buď přirozeně, nebo rezistenci získají genovými mutacemi, předáváním genetické informace mezi druhy či rody. Takto vybavené kmeny poté přežívají i po podání jinak účinného antibiotika, následně prodlužují léčbu, zvyšují morbiditu i mortalitu pacientů a zvyšují nákladnost léčby. Aktuálnost a závažnost tématu vedla k vypracování této práce.

V teoretické části se práce zabývá přiblížením funkcí jednotlivých částí bakteriální buňky, které se podílejí na mechanismech rezistence. Následuje kapitola, která přibližuje antimikrobiální látky. Je zmapována historie objevu jednotlivých skupin antibiotik, jejich funkční dělení, přiblížení mechanismu a spektra účinku. Skupina beta-laktamových antibiotik (peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy) je popsána podrobněji z důvodu sledovaného souboru. Navazuje popis jednotlivých způsobů rezistence s větším zaměřením na rezistenci způsobenou produkcí enzymů inaktivujících antibiotika. Zkoumaným souborem jsou kmeny bakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy - enzymy, které zabraňují účinnosti beta-laktamových antibiotik. Součástí práce je i popis bakteriálních rodů, jež jsou nejčastějšími producenty širokospektrých beta-laktamáz. Teoretická část je zakončena popsáním rizikového chování zdravotníků i laiků vedoucího ke vzniku rezistence a jeho následného dopadu na terapii. Závěrem jsou navrženy možnosti řešení.

Výzkum k bakalářské práci probíhal v Nemocnici České Budějovice, a. s. během roku 2013. Výzkumné otázky směřují k zjištění výskytu producentů širokospektrých beta-laktamáz ve zmíněné nemocnici v porovnání s výskytem obdobných producentů

v komunitě. Následuje vyhodnocení, ve kterém materiálu a na jakém oddělení výskyt převažuje a identifikace nejčastějších producentů širokospektrých beta-laktamáz.

Do zkoumaného souboru jsou zařazeny vzorky doručované na Bakteriologické oddělení Nemocnice České Budějovice, a. s. Od každého pacienta je vybrán vždy jeden kmen daného druhu, který je z příslušného materiálu izolován jako první. Metodika se zabývá i postupem zpracování jednotlivých typů biologického materiálu na kultivační plotny, podmínkami jejich kultivace a, po následné identifikaci lékařem, způsoby testování citlivosti na antibiotika. V práci je popsána metoda dle Hrabáka Double Disk Synergy Test (DDST) detekující producenta dle deformace inhibičních zón, dále kvantitativní metoda, pracující na principu minimální inhibiční koncentrace v kombinaci s detekcí na chromogenní půdě. Pro zajímavost je uvedena i rychlá metoda detekce, pracující na chemické reakci reaktantů s danou kolonií, pomocí β -LACTA testu od firmy BIO-RAD. Získané výsledky jsou zpracovány v Microsoft Office Excel 2007.

V porovnání s ostatními studii z jiných nemocnic se Nemocnice České Budějovice, a.s. řadí k průměrným až podprůměrným ve výskytu producentů širokospektrých beta-laktamáz. Během roku 2013 bylo zpracováno 12 347 vzorků cílové skupiny a z toho 226 izolátů bylo pozitivních. Převládajícím producentem je *Escherichia coli* (183 izolátů), *Klebsiella pneumoniae* (16 izolátů) a *Enterobacter cloacae* (15 izolátů). Výskyt producentů byl vyšší na interních odděleních než na odděleních chirurgických. Jednoznačně převažovaly izoláty získané z moči, jelikož *Escherichia coli* je významným původcem infekcí močového ústrojí. Výskyt producentů širokospektrých beta-laktamáz nebyl výrazně zaznamenán v komunitě, z 226 pozitivních izolátů pouze 4 pocházely z komunitního prostředí. U druhu *Escherichia coli* se ve zvýšené míře vyskytovala rezistence na cefotaxim, ciprofloxacin, trimetoprim + sulfonamid, cefuroxim a amoxicilin + kyselinu klavulanovou. Druh *Klebsiella pneumoniae* vykazoval rezistenci k ciprofloxacinu, cefotaximu, ceftazidimu, norfloxacinu, tobramycinu a trimetoprimu. *Enterobacter cloacae* měl vyšší rezistenci k cefotaximu. Dále byly výsledky z roku 2013 porovnány s výsledky z předchozích let

v Nemocnici České Budějovice, a. s. Pozitivním zjištěním byl nižší výskyt producentů širokospektrých beta-laktamáz ve sledovaném roce než byl v roce 2012, 2011 i 2010. Neustále převažujícím producentem je druh *Escherichia coli*, který zastínil dříve vedoucí rod *Klebsiella*. V poslední části diskuze se poukazuje na možná řešení dané situace. Důraz je kladen na aplikaci cílů Národního antibiotického programu, které vedou ke zlepšení přístupu lékařů k předepisování antibiotik, snížení preskripce antibiotik tam, kde to není nutné. Vhodným sledováním výskytu rezistentních kmenů se pomůže zabránit jejich šíření. Důležitou součástí je vhodná edukace lékařů, zdravotnického personálu, ale i laické veřejnosti v tomto problému. K zabránění šíření rezistentních nozokomiálních kmenů pomohou i zvýšená hygienicko-epidemiologická opatření.

Klíčová slova: β – laktamová antibiotika, bakteriální rezistence, širokospektrá β – laktamáza, *Enterobacteriaceae*

Abstract

The incidence of bacteria resistant to available antibiotics has become an important problem. Statistics show the rising number of resistant bacteria worldwide. If the situation gets worse, the mankind will be in a period similar to that before the invention of antibiotics. Almost zero efficiency of antibiotics will be the reason. Bacteria have ability to be resistant naturally or they develop from point mutation of genes and relay it between species or kinds. These pathogens survive after taking a normal dose of antibiotics, which cause a prolongation of cure, an increase of morbidity, mortality and costs of treatment. The study was made because of significance and relevance of this problem.

In theoretical part the study is focused on the functional parts of bacterial cell, which participate in mechanisms of resistance. The thesis describes history, functional dividing, mechanism and spectrum effect of antibiotics. β – lactam antibiotics (penicillins, cephalosporins, monobactams and carbapenems) are described in more detail. The following chapter is about mechanisms of resistance, mainly producing a group of enzymes, which have the capability of inactivating the antibiotics, called extended spectrum β lactamases (ESBL). The final chapter is focused on the most frequent ESBL producers and risk behaviour.

The research took place in Hospital České Budějovice, a. s. during 2013. The study aimed to determine the frequency of ESBL – positive producers in this hospital and to compare with frequency in community, and to identify units with highest frequency of ESBL producers.

Pathogens are isolated from clinical material, being delivered to bacteriology lab in Hospital České Budějovice, a. s. In each patient we counted the first sample with an ESBL producer. We describe the way of culturing and testing to antibiotics. Sensitivity to antibiotics is detected by a disc diffusion method. Resistant samples were examined with double disc synergy test (DDST) and quantitative method based on principle of minimal inhibition concentration in combination with chromogenic agar. In addition we

mention a chemical method of β – LACTA test by BIO – RAD. The results were evaluated in MS Excel 2007.

The prevalence rate of ESBL producers is average to low in Hospital České Budějovice, a. s. During 2013, 12, 347 isolates were identified, ESBL production was identified in 226 isolates. *Escherichia coli* (183 isolates), *Klebsiella pneumoniae* (16 isolates), and *Enterobacter cloacae* (15 isolates) were the most prevalent species. The incidence of ESBL producers was higher in Medical units compared to Surgical units. The most prevalent material was urine. Only 4 isolates were from outpatients. *Escherichia coli* were considered highly resistant to cefotaxime, ciprofloxacin, trimethoprim + sulfonamide, ceftazidime and amoxicillin + clavulanic acid. *Klebsiella pneumoniae* was resistant to ciprofloxacin, cefotaxime, ceftazidime, norfloxacin, tobramycin, trimethoprim. *Enterobacter cloacae* was resistant to cefotaxime. Results from Hospital České Budějovice, a. s. were compared with results from previous years in the same hospital. The number of ESBL producers was lower compared to 2012, 2011, and 2010. *Escherichia coli* is now the most prevalent producer, but previously it was *Klebsiella pneumoniae*. Applications of aims of the National Antibiotics Programme lead to improve the attitude of doctors when prescribing antibiotics, along with decreasing prescription of inappropriate antibiotics. Monitoring the prevalence of resistant strains helps stop their spreading. Education of GPs, medics and community is important part of this programme. Higher hygienic – epidemiological measures stop spreading of nosocomial strains.

Key words: β – lactam antibiotics, bacterial resistance, extended spectrum beta – lactamases, *Enterobacteriaceae*

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 5. 5. 2014

.....

Lucie Polenová

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat své vedoucí práce MUDr. Magdaleně Horníkové za pomoc, trpělivost a cenné rady při vedení mé bakalářské práce.

Obsah

Abstrakt	2
Abstract.....	5
Seznam zkratek	11
Úvod	13
1 Teoretická část.....	15
1.1 Bakteriální buňka	15
1.2 Antimikrobiální látky	17
1.2.1 Historie antibiotik	17
1.2.2 Typ účinku ATB	18
1.2.3 Spektrum účinku	19
1.2.4 Mechanismus účinku ATB	20
1.2.5 β -laktamová antibiotika.....	22
1.3 Rezistence mikrobů k antibiotikům	27
1.3.1 Mechanismy rezistence bakterií.....	29
1.3.2 β -laktamázy.....	30
1.4 Nejčastější producenti ESBL	32
1.4.1 Rod <i>Klebsiella</i>	32
1.4.2 Rod <i>Enterobacter</i>	33
1.4.3 Rod <i>Escherichia</i>	33
1.4.4 Ostatní producenti ESBL.....	34
1.5 Dopad rezistence na terapii a možnosti léčby.....	34
2 Výzkumné otázky.....	36
3 Metodika	37
3.1 Zpracování biologického materiálu.....	37
3.1.1 Bronchiální sekret a sputum	38
3.1.2 Výtěr z krku a nosu	38
3.1.3 Cévní katétrý.....	39

3.1.4	Krev	39
3.1.5	Moč	40
3.1.6	Stolice	41
3.1.7	Sekret z rány	41
3.2	Kultivace vzorků	41
3.3	Identifikace a testování mikrobů na citlivost k antibiotikům	41
4	Výsledky	46
4.1	Rozdělení izolátů dle typu nemocničního oddělení	47
4.2	Rozdělení izolátů dle typu klinických materiálů	48
4.3	Počet producentů ESBL v nemocnici a v komunitě.....	50
4.4	Účinnost ATB u producentů ESBL.....	51
5	Diskuze	53
5.1	Zhodnocení a porovnání výsledků Nemocnice České Budějovice, a. s. za rok 2013.....	53
5.2	Porovnání s prevalencí ESBL producentů v Nemocnici České Budějovice, a. s. 2007-2013.....	59
5.3	Možné přístupy k řešení problému bakteriální rezistence	60
6	Závěr	63
7	Seznam použitých zdrojů	65
8	Přílohy.....	69

Seznam zkratek

ATB	antibiotika
CBD	Columbia agar s 5 % příměsí ovčí krve
CFU	colony forming unit
CNA	Columbia agar s příměsí 5 % ovčí krve a kyseliny nalidixové
DDST	Double Disk Synergy Test
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EA	Endův agar
EARS-Net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ESBL	Extended Spectrum Beta- Lactamase
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
CHOC	čokoládový agar
IZ	inhibiční zóna
KPC	karbapenemáza
MALDI – TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight
MIC	minimální inhibiční koncentrace
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MCV	MacConkeyho půda s příměsí krystalové violeti

MH	Mueller – Hinton agar
NAP	Národní antibiotický program
NemČB	Nemocnice České Budějovice, a. s.
PBP	penicillin binding protein
SCG	Sabouraudův agar
S. S. agar	Salmonella – Shigella agar

Úvod

Závažnou zdravotní hrozbou je zvyšující se odolnost bakterií na současná antibiotika. Tento trend má mezinárodní charakter a zabývá se jím nejen Světová zdravotnická organizace (WHO), ale i samotní lékaři v jednotlivých zemích. Multirezistentní bakterie se nacházejí především v nemocničním prostředí, kde dlouhodobě přežívají a šíří se vzduchem, kontaminovanými předměty nebo rukama ošetřujícího personálu, čímž zapříčiňují komplikující infekce u hospitalizovaných pacientů. Gramnegativní bakterie patří mezi jednu rizikovou skupinu způsobující rezistenci k antibiotikům. Pomocí mechanismu produkce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL získávají odolnost k cefalosporinům, penicilinům, monobaktamům či karbapenemům. Navíc s využitím i jiných mechanismů dochází k rezistenci i na jiné skupiny antibiotik.

Do čeledi *Enterobacteriaceae* patří významné kmeny způsobující uroinfekce, infekce ran, krevního řečiště a intraabdominální abscesy. K jejich nálezu dochází i v dolních dýchacích cestách, kde způsobují pneumonie. Rezistence kmenů z této čeledi se neustále zvyšuje a dochází tak k prodloužení léčby, zvyšování morbidity a používání nákladnější léčby, která někdy selže. V takovém případě není už jiná možnost a záleží na pacientovi, zda dokáže nad infekcí zvítězit pomocí vlastního imunitního systému.

Na vzniku rezistence se podílí především neadekvátní volba antibiotické terapie na začátku hospitalizace, nedostatečné poučení pacienta před zahájením léčby v primární péči, či nesprávný postup léčby. Rezistentní kmeny se poté šíří hlavně v nemocničním prostředí, čemuž napomáhají i případně snížená hygienicko – epidemiologická opatření (izolace pacienta, přizpůsobená péče o pacienta, hygiena rukou, péče o přístroje a zdravotnické pomůcky, odstraňování infekčního materiálu, dezinfekce a úklid prostředí).

Cílem této práce je zmapovat situaci v Nemocnici České Budějovice, a. s., detekovat a porovnat počty kmenů produkujících širokospektré beta-laktamázy

s ostatními studii, zjistit, zda dochází k nárůstu výskytu rezistentních kmenů nejen v nemocnici, ale i v komunitě. Dalším úkolem je zjistit, jak se liší výskyt jednotlivých kmenů dle typu biologického materiálu a oddělení, na kterém je pacient hospitalizován.

1 Teoretická část

1.1 Bakteriální buňka

Bakteriální buňka se řadí mezi buňky prokaryotické, tedy buňky s nepravým jádrem. Buňka obsahuje pouze nukleoid, čili jaderný ekvivalent, který představuje do kruhu stočená dvoušroubovice DNA. Tento útvar není od cytoplasmy oddělen jadernou membránou, na rozdíl od buněk eukaryotických, které mají genetický aparát viditelně oddělen od cytoplasmy pomocí jaderné membrány s póry a uvnitř jejichž jádra se nachází více molekul DNA. Při dalším porovnání s buňkou eukaryotickou lze zjistit, že cytoplasma je méně členitá a nachází se zde kromě jádra pouze ribozomy, granula a v některém případě i plasmidy, molekuly DNA s přídatnou genetickou informací. Cytoplasma je ohraničena cytoplasmatickou membránou, na kterou přiléhá pevná buněčná stěna. U některých bakterií se vyskytuje ještě slizová vrstva nebo polysacharidové pouzdro. K pohybu bakterií mohou sloužit bičíky, krátké výběžky zvané fimbrie nebo pili. (1; 2)

Cytoplasmatická membrána bakterií zastává jedinou vnitřní biologickou membránu. Její stavba se výrazně neliší od jiných biologických membrán. (1) Je tvořena dvojitou vrstvou fosfolipidů s vnořenými bílkovinami. Tato struktura buňce zprostředkovává několik funkcí. Nahrazuje mitochondrie v procesu dýchání, zastupuje i funkci syntetickou, kdy se podílí na utváření buněčné stěny a slizové vrstvy a pomocí vmezeřených bílkovin dochází k transportu živin do buňky. Membránou se vylučují do vnějšího prostředí odpadní látky, popřípadě bakteriální toxiny a extracelulární enzymy. (2)

Tvar buňce udává buněčná stěna. Je to silná a tuhá vrstva, která mechanicky chrání cytoplasmatickou membránu. Stěna chrání buňku i před působením chemických látek, zářením, vyschnutím a odolává osmotickému přetlaku uvnitř buňky. (1) Peptidoglykan je základní látka tvořící buněčnou stěnu. Je to polysacharidový řetězec obsahující střídavě dva cukry, kyselinu N-acetylmuramovou a N-acetylglukosamin. Pomocí čtyř peptidů dochází k propojení peptidickými můstky a vytváří se tak

polymerní síť. (2) U gramnegativních bakterií se nachází pouze jedna či menší množství peptidoglykanové vrstvy, naopak grampozitivní bakterie mají více vrstev navzájem propojených. Tetrapeptidy se propojují pomocí reakcí, které jsou katalyzovány transpeptidázami. Tyto enzymy mají schopnost vázat β -laktamová antibiotika a nazývají se penicillin binding proteins (PBP). Po navázání antibiotika (ATB) může dojít k inhibici reakce, při které dochází ke štěpení stávajícího peptidoglykanu a ke vsunutí nové podjednotky, čímž přestává být syntetizován peptidoglykan a následuje zničení bakterie. Peptidoglykan je štěpen pouze v aktivně rostoucí buňce a β -laktamy tak působí pouze v růstové fázi buněčného cyklu. (1) Buněčná stěna je rozdílného charakteru u grampozitivních a gramnegativních bakterií (viz příloha č. 1).

Buněčná stěna grampozitivních bakterií je tvořena mnohvrstevnatou peptidoglykanovou sítí v tloušťce 20 nm. Na povrch pronikají řetězce kyseliny teichoové, které váží kationty a jsou hlavními antigeny grampozitivních bakterií. Mezi vrstvami nejsou zakomponovány lipidy, a tak při Gramově barvení dochází k uvěznění komplexu krystalové violeti s jodem a nedochází k jeho vymytí acetonem (alkoholem). Buňky se pak nemusejí dobarvovat karbolfuchsinem (safraninem). (2)

Buněčná stěna gramnegativních bakterií je sice tenčí, ale složitější stavby. Nad jednoduchou vrstvou peptidoglykanu se nachází zevní membrána, tvořená podobně jako biologické membrány z dvojité vrstvy fosfolipidů a bílkovin, a navíc obsahuje lipopolysacharidy. Peptidoglykan je z jedné strany poután k cytoplasmatické membráně, z druhé k vnější membráně. Mezi membránami se nachází periplasmatický prostor. Významnými proteiny vnější membrány jsou do trimeru uspořádané poriny („kanálky“), integrální proteiny, podílející se na průchodu malých látek. Lipopolysacharidy tvořící zevní vrstvu vnější membrány jsou tvořeny společným polysacharidem, lipidem A (živočišnými buňkami vnímán jako endotoxin) a různými sacharidy tvořícími O antigen, specifický pro daný druh a serotyp bakterie. Vnější membrána poskytuje buňce lepší ochranu před chemickými látkami, ATB a žlučovými kyselinami. Navíc se v periplasmatickém prostoru nachází i enzymy, které jsou schopny zničit podané ATB. (1)

Bakterie, stejně jako eukaryotické buňky, obsahují enzymy, které slouží jako biokatalyzátory chemických dějů, tudíž snižují aktivační energii. Chemickou podstatou to jsou bílkoviny, na kterých se nachází aktivní centrum specifické svou konformací pro daný substrát. Do aktivního místa se mohou navázat aktivátory, ale především i inhibitory, ovlivňující průběh reakce. Inhibitory o místo mohou soutěžit se substrátem, nebo se naváží jinam, kde změní konformaci aktivního místa a znemožní reakci. Toho se využívá při podávání některých ATB či chemoterapeutik. (3)

1.2 Antimikrobiální látky

1.2.1 Historie antibiotik

Pokud antibiotiky označíme antibakteriální přípravky, u kterých se nerozlišuje, zda byly získány z mikroorganismů nebo chemickou syntézou. Historie těchto látek se řadí ještě před objev penicilinu, tedy do éry objevení sulfonamidů (1910). (4)

Imunolog a chemik Paul Ehrlich přichází s myšlenkou využití toxicky působících barviv, která jsou schopna se navázat a usmrtit patogenní bakterie. Po mnoha pokusech na trh přichází přípravek Salvarsan, který je tvořen molekulou arsfenaminu, schopný neublížit člověku, ale usmrtit původce syfilis, *Treponema pallidum*. Další vědci poté různým připojováním chemických řetězců vytvořili celou řadu preparátů, řadících se do skupiny sulfonamidů. (4)

Na základě pozorování antagonismu, jevu, při kterém dochází k ovlivňování až zabránění růstu a množení mikrobů, dochází bakteriologové ke zjištění, že plíseň rodu *Penicillium* mají antibakteriální účinky. Tomuto poznatku však nebyla věnována dostatečná pozornost. Té se dostalo až siru Alexandru Flemingovi, který na základě náhodného ponechání laboratorní misky se stafylokokovou kulturou a kontaminovanou plísní (*Penicillium notatum*) zjistil, že plíseň nejspíše produkuje určitou látku, která je schopna usmrcovat bakterie - kolonie stafylokoka. Tuto látku nazval penicilin. Jak uvádí ve svém článku Beneš (4), zásluhy Fleminga na získání penicilinu jako léku zachraňujícího lidské životy jsou nadhodnoceny, jelikož až o několik let později se

týmu vědců pod vedením Howarda Floreye, podařilo penicilin extrahovat a určit jeho chemickou strukturu. K masovému rozšíření a uvedení do klinické praxe došlo až po zapojení amerických farmaceutických firem.

K objevům dalších antibiotik docházelo zkoumáním streptomycet, od kterých byla odvozena většina používaných ATB. (4) Bohužel v této éře vznikl i podnět k preventivnímu podávání ATB na cokoliv a navíc byla volně dostupná. Z dnešního hlediska je tento přístup nežádoucí, nejen z hlediska toxicity, ale hlavně kvůli vzniku a šíření bakteriální rezistence. V dnešní době se nedaří přijít s novou skupinou ATB, která by byla účinnější, měla lepší vlastnosti a nebyla pouze odvozena od již existujících skupin.

1.2.2 Typ účinku ATB

Rozlišuje se dvojitý účinek ATB na bakterie. Pokud ATB reverzibilně zastavují růst a množení mikrobů, jedná se o účinek bakteriostatický (chloramfenikol, tetracykliny, makrolidy, linkosamidy). Nástup účinku se klinicky projevuje za 3-4 dny. Pokud hostitel není dostatečně silný, po vysazení těchto ATB mohou mikroby opět začít růst. (2)

Ireverzibilní usmrcení bakterií je charakterizováno baktericidním účinkem ATB (β -laktamy, aminoglykosidy, glykopeptidy). Klinický projev je patrný již do 48 hodin. Tého schopnosti se využívá k podání ATB buď při závažných klinických stavech, nebo při snížené obranyschopnosti pacienta. (2)

Toto rozdělení však není absolutní. Baktericidní ATB mohou mít v nižších koncentracích bakteriostatický účinek a naopak bakteriostatická antibiotika ve vyšších koncentracích působí baktericidně, pokud působí na vhodnou skupinu bakterií. (5)

Pokud se kolonie bakterií naočkují do tekuté půdy, projeví se růst zákalem. Pokud se předem do tekuté půdy aplikují ATB, zákal se neprojeví. Po následném vyočkování na živný agar dochází při bakteriostatickém účinku k růstu nové kolonie bakterie. Při baktericidním účinku mikroby na agaru nevyrostou. Laboratorně se účinnost ATB může stanovit pomocí hodnot minimální inhibiční koncentrace (MIC) a

minimální baktericidní koncentrace (MBC). MIC vyjadřuje nejnižší koncentraci dané látky, která zabrání růstu příslušného mikroba. MBC je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která během 24 hodin usmrtí 99,9 % původní populace mikrobů. (1; 2) ATB je nutno podávat v takové dávce, aby dosažená sérová hladina byla vyšší než MIC. Klinický efekt ATB závisí na několika faktorech. Prvním z nich je koncentrace (dávka) a čas působení daného ATB. Aminoglykosidy, fluorochinolony aj. ničí bakterie tím lépe, čím více jejich hladina převyšuje MIC, jejich účinnost závisí na dávce. Naopak glykopeptidy či β -laktamy závisí na době, po kterou se udržuje jejich hladina nad úrovní MIC. (2)

Současné podávání více druhů ATB může vést k pozitivním, ale i negativním účinkům. K podávání více ATB najednou většinou vede záměr rozšířit spektrum účinku, omezit vznik rezistence, zvýšit účinnost, popřípadě snížit nežádoucí účinky. Při nesprávné kombinaci ATB může však dojít k potlačení účinku. Kombinace baktericidních antibiotik, která působí pouze v růstové fázi mikroba (peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy aj.), s bakteriostatickými antibiotiky s rychlým nástupem účinku (tetracykliny, chloramfenikol aj.), způsobí inhibici růstu mikrobů dříve, než baktericidní ATB začne účinkovat. V dnešní době je závažným problémem vznik rezistence na obě podaná antibiotika a indukce tvorby β -laktamázy, enzymu s účinkem proti β -laktamovým ATB. (5) Výhodná je kombinace β -laktamů s inhibitory bakteriálních beta-laktamáz, jelikož kombinací se získává velmi účinný preparát proti působení těchto enzymů. (2)

1.2.3 Spektrum účinku

Dle záběru účinku ATB se rozdělují přípravky na látky s úzkým spektrem, které zahrnují pouze určitou část mikrobů (např. antituberkulóza na původce tuberkulózy), látky se středním spektrem, kam řadíme např. penicilin působící na všechny grampozitivní mikroby, gramnegativní koky a spirálovité mikroby. Poslední skupinou jsou širokospektrá ATB, která se snaží zahrnout co nejširší působení (např. tetracykliny, cefalosporiny a chinolony vyšších generací). (2)

1.2.4 Mechanismus účinku ATB

Způsobů, kterými antibiotika zasahují bakteriální buňku, není mnoho, což vede i k příčině vzniku sekundární rezistence. Následkem je omezený vývoj nových antibiotik z důvodu omezeného počtu zásahových míst a případně rychlému vzniku rezistence. (1) Díky rozdílům ve struktuře prokaryotické a eukaryotické buňky lze bakterie zasáhnout s minimální toxicitou vůči lidským buňkám.

1.2.4.1 Syntéza buněčné stěny

Do této skupiny ATB patří látky s velmi nízkou toxicitou vůči eukaryotním buňkám, jelikož zasahují buněčnou stěnu bakterií, kterou eukaryotická buňka nemá. Buněčná stěna je tvořena peptidoglykanem, jenž je zpevňován příčnými vazbami enzymy PBP. Tyto enzymy jsou schopny vázat penicilin a jiné β -laktamy. Tato skutečnost je způsobena podobností β -laktamového kruhu a D-alanyl-D-alanyl-dipeptidu mureinu. PBP jsou důležité pro metabolismus a dělení buňky, po navázání β -laktamu dochází k acylaci a inaktivaci, čímž se zastaví dělení a buňka hyne. Glykopeptidy zabraňují růstu buňky navázáním se na stěnový pentapeptid. (1) Do skupiny tzv. „stěnových“ ATB se řadí β -laktamová antibiotika (peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy), glykopeptidy (vankomycin) a některá antituberkulotika (isoniazid, cykloserin, ethambutol). Všechny látky mají účinek baktericidní. (2)

1.2.4.2 Funkce buněčné membrány

Toxické působení na člověka vykazují polypeptidická antibiotika (kolistin, polymyxin B) poškozující cytoplasmatickou membránu, která tak ztrácí selektivní permeabilitu a integritu. Působí baktericidně, u člověka však poškozují tubulární aparát ledviny. (1)

1.2.4.3 Syntéza bílkovin

Na syntéze bílkovin (proteosyntéze) se podílí ribozom. Ribozom bakterie se skládá ze dvou podjednotek o velikosti 30S a 50S, spojujících se ve funkční jednotku 70S. Pomocí ribozomu dochází k překlada genetické informace, kterou nese mediátorová ribonukleová kyselina (mRNA), do sekvence aminokyselin. (1)

Proteosyntézu inhibují ATB vazbou na jednotlivé ribozomální podjednotky. Aminoglykosidy (streptomycin, gentamicin, amikacin) se ireverzibilně váží na menší podjednotku ribozomu 30S a brání tvorbě iniciačního komplexu, který je nutný pro začátek syntézy nového peptidového řetězce. Způsobují při translaci mylnou četbu, což má za následek její předčasné ukončení a vznikají nefunkční bílkoviny. Tetracykliny po vazbě na menší podjednotku zabraňují navázání aminoacyl-t-RNA na ribozom. Výsledkem je nedostatek aminokyselin pro syntézu peptidového řetězce. Chloramfenikol se váže na větší podjednotku ribozomu 50S a zabraňuje transpeptidaci, účinek je bakteriostatický. Na větší podjednotku se váží i makrolidy (erytromycin) a linkosamidy (linkomycin) zabraňující posuvu 70S ribozomu k následujícímu kodonu mRNA. (1)

1.2.4.4 Syntéza nukleových kyselin

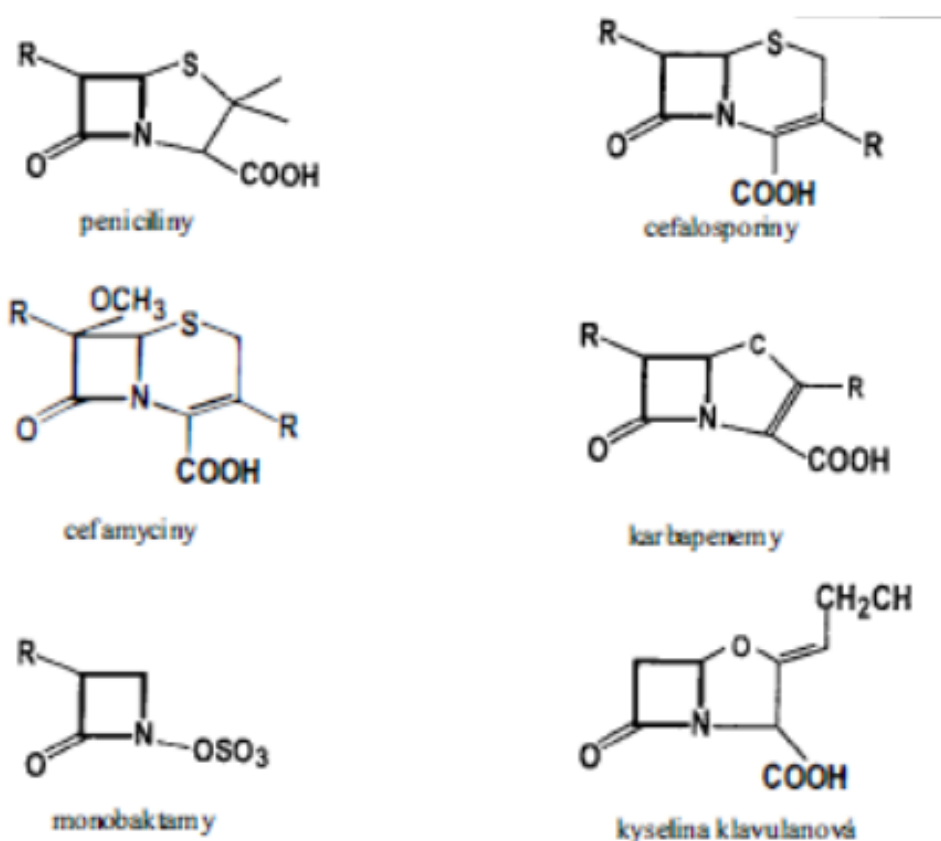
DNA gyráza bakterií je důležitým enzymem podílejícím se na správném průběhu replikace DNA, a to pomocí rozpletení řetězce DNA. Skládá se ze dvou podjednotek a v aktivní formě tvoří komplex DNA. Chinolony se váží na tuto strukturu a zabraňují replikaci bakteriálního chromozomu. Tato ATB do buňky vnikají pomocí porinů v buněčné stěně. Nitroimidazoly (metronidazol) poškozují již hotovou DNA. Syntéza mRNA je narušena pomocí ansamycinů (rifampicin). (1; 2)

1.2.4.5 Antimetabolity

Antimetabolity se označují látky, které zasahují do metabolismu konkrétní látky a vyznačují se podobností k dané látce. Sulfonamidy brzdí syntézu kyseliny listové pomocí mechanismu kompetitivní inhibice. Bakterie obsahují metabolit, kyselinu p-aminobenzoovou, která je koenzymem pro vznik kyseliny listové. Sulfonamidy se příliš neliší svou strukturou od této kyseliny a kompetitivně blokují místo pro navázání tohoto metabolitu. ATB, které poté vstoupí do buněčného metabolismu, způsobí vznik nefunkčních struktur. (6) Trimethoprim zasahuje metabolismus kyseliny listové v jiném místě. Po kombinaci těchto dvou látek se získá baktericidní antibiotikum co-trimoxazol. (2)

1.2.5 β -laktamová antibiotika

Do této skupiny antibiotik řadíme látky, jejichž základem je beta-laktamový kruh. Tato sloučenina se skládá ze tří atomů uhlíku a jednoho atomu dusíku. Odolnost této struktury je základním požadavkem, aby ATB bylo účinné. Podskupiny beta-laktamových ATB se od sebe liší připojením dalšího kruhu různého složení. Rozdílné atomy prvků v daných skupinách ukazuje Obr. 1.



Obrázek 1 Beta-laktamy (2)

Beta-laktamy se váží na enzymy, které se podílejí na tvorbě peptidoglykanu, látky, z které je tvořena buněčná stěna bakterií. Enzymy slouží jako katalyzátory, které snižují aktivační energii při tvorbě peptidových a glycinových můstků, střídavě spojujících N-acetylglukosamin a kyselinu N-acetylmuramovou. Označují se jako PBP. Pokud se vazba uskuteční, dochází k zastavení tvorby peptidoglykanu a je iniciováno působení autolytických enzymů, které způsobí rozpad dané bakterie. Jejich účinek je

baktericidní a závisí na době, po kterou je ATB v séru pacienta v dostatečné koncentraci. Tato ATB jsou rychle vylučována močí, proto je nutno tyto léky aplikovat v častých intervalech (6-8 hodin). (2) Rozdíly účinku mezi preparáty jsou dány schopností vázat se na příslušné receptory, pronikat do buněčné stěny a především odolávat účinku beta-laktamázy. Spektrum účinku se liší u jednotlivých podskupin, jejich účinek se vztahuje ke struktuře dané látky. (7)

Rezistence na tato ATB je trojího původu: znemožnění průniku látky do zevní membrány skrze póry (gramnegativní bakterie), dále geneticky pozměněné PBP, které mají nižší afinitu k danému antibiotiku (např. pneumokoky) a nejčastější příčinou je tvorba beta-laktamázy, enzymů, schopných rozštěpit beta-laktamový kruh (grampozitivní i gramnegativní mikroby). (2)

Toxicita této skupiny antibiotik není vysoká. Častějším nežádoucím účinkem je alergická reakce, počínaje kožním exantémem, konče anafylaktickým šokem.

Beta-laktamová antibiotika se dělí na peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy (příloha č. 2). Zvláštní skupinou jsou inhibitory beta-laktamázy.

1.2.5.1 Peniciliny

Tato beta-laktamová ATB se získávají z kultury plísně *Penicillium chrysogenum*, která produkuje kyselinu 6-aminopenicilanovou, jejíž součástí je i beta-laktamový kruh. K přirozeným i polysyntetickým formám jsou připojovány různé řetězce, mající vliv na vlastnosti a účinek daných skupin. Jsou to antibiotika, která dobře pronikají do tělních tekutin a tkání a vykazují nízkou toxicitu. (2; 5)

Benzylpenicilin (penicilin G) je nestálé ATB při nízkém pH v žaludku, podává se proto parenterálně. Nejsilnější aktivitu vykazuje proti grampozitivním bakteriím, dále anaerobním bakteriím s výjimkou *Bacteroides fragilis*, dále na *Treponema pallidum* a aktinomycety. Nevýhodou je citlivost k beta-laktamázám. (1)

Fenoxypenicilin (penicilin V) má shodné spektrum účinku s penicilinem G, navíc odolává kyselému pH žaludku, užívá se proto k perorální aplikaci. (2)

Peniciliny rezistentní vůči stafylokokovým β -laktamázám (oxacilin, cloxacilin, methicilin) se vyznačují téměř shodným spektrem účinku jako penicilin G, ale s nižším účinkem a nepůsobí na gramnegativní bakterie. Využívají se v terapii stafylokokových infekcí (osteomyelitidy, pyodermie,...), případně smíšených infekcí (stafylokoky a streptokoky současně - často infekce měkkých tkání). Problémem použití těchto ATB je narůstající rezistence *Staphylococcus aureus* (označovaný jako MRSA - methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). (2)

Peniciliny druhé generace, neboli aminopeniciliny (ampicilin, amoxicilin) jsou antibiotika se středním spektrem účinku. Působí na většinu grampozitivních druhů i *Enterococcus faecalis*, dále hemofily, listerie a některé fermentující gramnegativní tyčky (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, salmonely, shigelly). Nemají odolnost vůči β -laktamázám produkovaným gramnegativními tyčinkami. (1)

Poslední skupinou penicilinů jsou karboxypeniciliny (tikarcilin), jejichž účinek se shoduje s ureidopeniciliny. V kombinaci s kyselinou klavulanovou (co-ticarcilin) účinkuje i na řadu rezistentních nemocničních kmenů včetně *Pseudomonas aeruginosa*. (2)

1.2.5.2 Cefalosporiny

Strukturální jádro těchto ATB je tvořeno kyselinou 7-aminocefalosporanovou, poprvé izolovanou z plísně rodu *Cephalosporium*. Na beta-laktamový kruh je připojen šestičlenný dihydrothiazinový kruh obsahující atom síry (kyslík u cefamycinů). Cefalosporiny užívané v praxi jsou polysyntetické deriváty. Působí na bakterie stejným mechanismem jako beta-laktamy, mají širší spektrum účinnosti, které se většinou rozšiřuje danou skupinou. V terapii je lze kombinovat s aminoglykosidy, fluorochinolony, polypeptidickými antibiotiky a nitrimidazoly. Rozdělují se do čtyř generací dle spektra účinku, citlivosti vůči beta-laktamázám a podle průniku buněčnou stěnou. (2)

Cefalosporiny I. generace (cefalotin, cefazolin, cefalexin) mají úzké spektrum. Vykazují vysokou účinnost na grampozitivní koky, gramnegativní bakterie (konkrétně

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*), ostatní gramnegativní bakterie jsou rezistentní. Jsou odolné vůči stafylokokové penicilináze, ale ne proti beta-laktamázám gramnegativních bakterií. (5)

Cefalosporiny II. generace (cefaclor, cefuroxim, cefoxitin) se vyznačují stejně vysokou účinností na grampozitivní koky, jsou odolné vůči stafylokokovým penicilinázám a vyznačují se větší odolností k beta-laktamázám gramnegativních bakterií. Mají rozšířené spektrum účinnosti o některé gramnegativní bakterie (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterobacter*, *Citrobacter* aj.) (5)

Cefalosporiny III. generace (cefixim, cefotaxim, ceftriaxon, ceftazidim, cefoperazon) mají vysokou účinnost na gramnegativní bakterie. Vyznačují se odolností vůči beta-laktamázám této skupiny. Naopak se výrazně snižuje jejich účinnost na stafylokoky. Další výhodou je i působení některých preparátů na *Pseudomonas aeruginosa*. Nevýhodou je již rozšířená existence širokospektrých beta-laktamáz k této skupině antibiotik. (2)

Cefalosporiny IV. generace (cefepim) mají vysokou účinnost na grampozitivní i gramnegativní bakterie, odolávají účinkům beta-laktamáz předchozích generací. Podávají se pouze parenterálně. Pronikají rychleji buněčnou stěnou a váží se lépe na PBP. Využívají se u smíšených infekcí, kde se mohou podávat i v kombinaci s aminoglykosidy nebo glykopeptidy a nitroimidazoly. Bohužel byl již také zaznamenán výskyt beta-laktamázy působící na tuto skupinu cefalosporinů. (2)

1.2.5.3 Monobaktamy

Strukturálním jádrem těchto antibiotik je samotný beta-laktamový kruh. Jediným zástupcem je aztreonam. Účinkuje na gramnegativní aerobní bakterie. Svým spektrem může nahradit toxické aminoglykosidy. (5) V současné době se již ale nevyrábí.

1.2.5.4 Karbapenemy

Tato antibiotika jsou odvozena od přirozeného antibiotika thienamycinu. Do této skupiny se řadí imipenem, meropenem a nověji ertapenem. Účinkují na grampozitivní koky, při léčbě infekcí vyvolaných nemocničnými multirezistentními kmeny

gramnegativních druhů, těžkých infekcích, léčbě infekce způsobené *Klebsiellou pneumoniae* a dalšími druhy produkujícími širokospektrou beta-laktamázu. (2) Tyto léky jsou většinou poslední volbou při selhání léčby ostatními beta-laktamy. Nepříjemným faktem je nověji prokázána existence karbapenemázy. (8)

1.2.5.5 Inhibitory beta-laktamáz

Jako inhibitory beta-laktamáz se označují látky, které obsahují β -laktamový kruh a kompetitivně se ireverzibilně váží na aktivní místa beta-laktamáz, čímž znemožní účinek bakteriálních enzymů na beta-laktamové ATB. Inaktivací beta-laktamázy tak může ATB účinně pronikat do cílových struktur. (5) Touto inhibicí lze rozšířit spektrum penicilinů, ale jedním inhibitorem se ovlivní pouze část beta-laktamáz. Úskalím této léčby je, že dochází ke kombinaci léčiv, která jsou ve tkáních v různých koncentracích a většinou nepředstavují spojení nejvhodnějšího penicilinu s inhibitorem. (7)

Prvním zástupcem inhibitorů je kyselina klavulanová (klavulanát), která má samostatně velmi nízkou antimikrobiální účinnost, ale vyznačuje se významnými inhibičními účinky na stafylokokové beta-laktamázy i na beta-laktamázy gramnegativních tyčinek, které produkují např. *Enterobacteriaceae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Klebsiella pneumoniae* aj. V praxi se používá v kombinaci s amoxicilem, kdy působí na spektrum bakterií, které jsou většinou na samotný amoxicilin rezistentní (*Staph. aureus*, *Staph. epidermidis*, *H. influenzae*, *E. coli*,...) a to právě z důvodů produkce β -laktamázy. Druhou možnou kombinací je klavulanát s ticarcilem, který má výhodnější spektrum než amoxicilin (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*) a je odolnější vůči některým beta-laktamázám. (5)

Dalším inhibitorem je sulbaktam, sulfon kyseliny penicilanové, který se vyznačuje inhibicí stafylokokových penicilináz a gramnegativních beta-laktamáz, kmenů rodu: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* a ve spojení s cefoperazonem i na *Pseudomonas aeruginosa*. Kombinuje se především s ampicilem. (5)

Posledním inhibítorem je tazobaktam, sulfon kyseliny penicilanové, s dobrými účinky na stafylokokové penicilinázy a většinu beta-laktamáz. Kombinuje se s ureidopenicilinovým antibiotikem piperacilin, které má dobrou účinnost na *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterococcus faecalis*. (5)

1.3 Rezistence mikrobů k antibiotikům

Živé organismy mají schopnost se přizpůsobit vlivům vnějšího prostředí. Antibiotika mají při soustavném podávání schopnost vytvářet selekční tlak, a tak dát podnět ke vzniku bakteriální rezistence. Při výběru ATB k použití rozhoduje nejen přínos a rizika léčby, cena přípravku, ale i riziko vzniku rezistence. V dnešní době je třeba regulovat preskripci antibiotik pouze v odůvodněných případech a pokud možno s největším efektem na dané agens. (9)

Rezistenci bakterií k ATB lze definovat z několika pohledů. Kolář a spol. (10) ji uvádí jako: „Schopnost bakteriální populace přežít účinek inhibiční koncentrace příslušného antibiotika.“ Z genetického významu, jak uvádí Urbášková a spol. (11): „Obsahuje rezistentní kmen geny rezistence k jednomu nebo více antibiotikům.“ Bakteriální rezistence se řadí mezi nebezpečí, která nejvíce ohrožují zdravotnictví 21. století. Vyskytují se kmeny, které jsou rezistentní k většině dostupných antibiotik (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. a některé *Enterobacteriaceae* produkující širokospektré beta-laktamázy) nebo i ke všem dostupným antibiotikům, tzv. panrezistence (*Klebsiella pneumoniae*, produkující karbapenemázu - KPC). (12)

Rozeznává se rezistence přirozená (primární) vyjadřující odolnost bakteriálního druhu, který se nachází mimo spektrum účinku daného antibiotika. Většinou z důvodu nepřítomnosti cílové struktury (mykoplasmata odolná k beta-laktamům z důvodu absence tvorby buněčné stěny a absence PBP). Tento poznatek lze využít k identifikaci mikroba. Přirozeně rezistentní jsou většinou bakterie, které se vyskytují ve svém životním prostředí s konkurujícími mikroorganismy. Bakterie se tak adaptují na ATB

produkované konkurujícími bakteriemi (pseudomonády v odpadních vodách a půdě, enterokoky v zažívacím traktu). (9)

Druhým typem je rezistence získaná (sekundární), při které dochází k přeměně původně citlivé bakterie na rezistentní. Tento medicínský problém vzniká ve většině případů buď při dlouhodobé a nekontrolované léčbě antibiotiky či nevhodné profylaxi. Rozlišuje se vícestupňová rezistence, při které se reverzibilně a postupně zvyšuje koncentrace ATB potřebná k usmrcení mikroba (penicilin, chloramfenikol). Druhým typem je jednostupňová rezistence, při níž dochází k jejímu rychlému nástupu, často ireverzibilnímu (streptomycin, erytromycin). (6)

Pomocí rychlé evoluce bakteriálního genomu a selekčního tlaku prostředí dochází k vzestupu bakteriální rezistence. K tomuto jevu nemusí docházet pouze přímým podáním ATB, ale i různými faktory prostředí (dezinfekční látky). Ke změnám bakteriálního genotypu může docházet modifikací genu na chromozomu zodpovědném za citlivost k ATB (mutačně-selekční rezistence) nebo převzetím genetického materiálu od rezistentních buněk (extrachromozomální). Při chromozomální rezistenci dochází ke spontánní mutaci genu, přičemž bakteriální buňka nemusí přijít do styku s ATB. Tato změna genotypu se dále trvale přenáší na dceřiné buňky. Antibiotikum poté vyvolá tlak, který vede k uhynutí citlivých buněk. Při vzniku rezistence na více druhů antibiotik se však uplatňuje extrachromozomální rezistence a to pomocí plazmidů (R-plazmidy). Plazmidy se přenášejí hlavně konjugací, kdy dochází k vytvoření překlenovacího můstku v místě dotyku dvou buněk a propojení cytoplazem, mohou se přenášet i pomocí transdukce, kdy se k přenosu genetické informace DNA využívá bakteriofág a transformace. V tomto případě dochází k získání dané genetické informace bez přímého kontaktu s danou buňkou, mikrob DNA získá z volného prostředí přichycením na buněčném povrchu. Za předurčení plazmidů k šíření rezistence nesou zodpovědnost genetické úseky, transpozony, které parazitují na DNA a mohou se uvolňovat a začleňovat do různých míst chromozomu. K jejich šíření dochází velmi rychle pod výrazným tlakem ATB. (10; 6)

1.3.1 Mechanismy rezistence bakterií

Mikroby využívají 5 známých mechanismů rezistence, které mezi sebou mohou kombinovat.

1.3.1.1 Produkce enzymů inaktivujících antibiotikum

Tento mechanismus je nejrozšířenější u rezistence k beta-laktamovým antibiotikům, aminoglykosidům a chloramfenikolu. Dochází k destrukci nebo modifikaci molekuly antibiotika.

Jedná se o jednoduchý mechanismus a stačí jediný gen kódující tento typ rezistence. Dochází k snadnému přenosu mezi jednotlivými bakteriemi v rámci druhu, ale i mezi různými druhy bakterií a tím dochází k jejich rychlému šíření. Tuto rezistenci lze většinou snadno inaktivovat podáním falešného substrátu, který zablokuje aktivní místo enzymu. Jako inhibitory se zde uplatňují výše zmíněné: kyselina klavulanová, sulbaktam a tazobaktam. (9)

U beta-laktamových antibiotik se tyto enzymy nazývají beta-laktamázy. Ty hydrolyzují amidovou vazbu beta-laktamového kruhu antibiotika. Výsledkem je vznik neúčinné kyseliny penicilanové nebo cefalosporanové, bakterie se tak stává odolnou. Enzymy jsou produkovány především gramnegativními bakteriemi a to v periplasmatickém prostoru, v menší míře grampozitivními bakteriemi extracelulárně. (12)

1.3.1.2 Snížení permeability buněčné stěny

Gramnegativní bakterie pomocí porinů, které jsou obsaženy ve vnější membráně buněčné stěny, mohou omezit přísun látek a živin, tím i množství vstupujícího antibiotika do buňky. Nevýhodou je, že dochází i k omezení přísunu živin, čímž dochází k znevýhodnění rezistentní buňky vůči původní populaci. Tento mechanismus rezistence se uplatňuje především u beta-laktamových antibiotik (*Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter* spp.). (9)

1.3.1.3 Eflux

Pomocí enzymatických systémů dochází k aktivnímu vypuzování antibiotika z buňky, čímž se sníží jeho koncentrace. Bakterie efluxní pumpy využívají i k odstraňování metabolitů a toxinů. Podílejí se i na vzniku rezistence k některým detergentním přípravkům. Hyperprodukcí efluxních pump dochází i k ovlivnění vypuzování jiných látek vnitřního prostředí buňky a k oslabení buňky. Tímto způsobem dochází k inaktivaci chinolinů, tetracyklinů a makrolidů. (9) U rodu *Ps. aeruginosa* jsou efluxní systémy odpovědné za multirezistenci (k více druhům antibiotik současně). (12)

1.3.1.4 Změna cílového místa

Vlivem působení antibiotika dochází k mutaci (změně sekvence nukleové kyseliny). Mutace může postihnout vazebné místo podjednotky ribozomu nebo topoizomerázu, enzym podílející se na replikaci DNA, čímž dochází k nerozeznání cílové struktury antibiotikem. Tento mechanismus rezistence je známý proti aminoglykosidům, tetracyklinům, makrolidům aj. (12)

1.3.1.5 Zapojení alternativní metabolické dráhy

K využití dochází u sulfonamidů, kdy dochází k nálezu jiné metabolické dráhy, aby se obešel zablokovaný krok při tvorbě kyseliny listové. (9) Další možností je změna PBP na jiný druh, čímž dochází k nerozeznání proteinu antibiotikem, mechanismus využívá bakteriální druh methicillin-rezistentní *Staph. aureus*. (12)

1.3.2 β -laktamázy

Jsou to enzymy hydrolyzující amidy, amidiny a jiné C-N vazby. Patří mezi nejčastější typ mechanismu rezistence k beta-laktamovým antibiotikům. Mezi další mechanismy rezistence, uplatňující se vůči beta-laktamům, se řadí snížená permeabilita a změna PBP.

Beta-laktamázy jsou klasifikovány podle různých systémů, nejvíce používané jsou klasifikace od Amblera, rozdělující je do čtyř tříd A-D dle sekvencí aminokyselin. (13) Další v literatuře často užívaná klasifikace je dle Bush-Jacoby-Medeirose, kteří vytvořili 4 skupiny (dle substrátu a profilu inhibice) dále se dělících do podskupin a-f.

(14) Klinicky významné skupiny beta-laktamáz a propojení obou systémů ukazuje tabulka 1. (15)

Tabulka 1 Hlavní skupiny beta-laktamáz u gramnegativních bakterií podle funkční klasifikace Bushové, Jacobyho a Medeirosa a Amblerovy molekulární klasifikace (podle 13, 14)

Funkční skupina	Molekulární třída	Název	Spektrum hydrolýzy	Inhibitor β -laktamázy
1	C	cefalosporinázy	peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy	kyselina 3-aminofenylboritá
2b	A	penicilinázy	peniciliny, nižší cefalosporiny	-
2be	A	ESBL	peniciliny, cefalosporiny kromě cefamycinů, monobaktamy	kyselina klavulanová, sulbaktam, tazobaktam
2d	D	kloxacinázy	peniciliny včetně oxacilinu a cloxacilinu	-
2df	D	karbapenemázy	Všechny současné β -laktamy	kyselina 3-aminofenylboritá
2f	A	karbapenemázy	Všechny současné β -laktamy	kyselina 3-aminofenylboritá
3	B	metalo- β -laktamázy	Všechny β -laktamy kromě monobaktamů	chelátory kovových iontů (EDTA), kyselina 2-merkaptopropionová

Beta-laktamázy jsou produkovány jak gramnegativními, tak grampozitivními bakteriemi. U gramnegativních bakterií jsou nejdůležitějšími širokospektrými beta-laktamázami enzymy typu ESBL (extended spectrum beta-lactamase) - skupina 2be a třída A, a typu AmpC-skupina 1 a třída C. Mezi základní typy ESBL se řadí TEM, SHV, OXA a CTX-M enzymy. Mutací nejčastěji typů TEM-1, TEM-2 a SHV-1 vznikají beta-laktamázy, které hydrolyzují většinu cefalosporinů i nové generace, monobaktamy a peniciliny. Tyto enzymy však nejsou odolné k účinku inhibitorů beta-laktamáz (kyselina klavulanová, sulbaktam a tazobaktam). (16) Produkce ESBL většinou vykazuje i sdruženou rezistenci k jiným skupinám antibiotik (fluorochinolony, aminoglykosidy aj.). Tato skutečnost je dána lokalizací genů rezistence na stejném mobilním elementu, kde se vykytuje i gen pro ESBL. Pokud je plazmid s těmito geny

přenesen konjugací mezi jiné mikroorganismy, dochází k šíření horizontální multirezistence. (15)

Grampozitivní bakterie vykazují produkci beta-laktamázy třídy A, typu penicilinázy, které jsou schopny štěpit beta-laktamový kruh a tak pokračuje syntéza peptidoglykanu pomocí enzymu PBP. Antibiotika odolná vůči penicilinázám se již také stávají neúčinnými, jelikož další modifikací vzniká mechanismus, při kterém bakterie syntetizují peptidoglykan enzymem PBP2a. Tento enzym se vyznačuje nižší afinitou k methicilinu/oxacilinu, která vede k rezistenci na beta-laktamová ATB (17)

1.4 Nejčastější producenti ESBL

1.4.1 Rod *Klebsiella*

Klebsiely jsou nepohyblivé gramnegativní tyčinky a řadí se mezi závažné nozokomiální patogeny, které mohou produkovat ESBL. Nachází se v zažívacím traktu, v dýchacích cestách, v půdě a ve vodě. V nemocnicích tyto kmeny přetrvávají ve zvlhčovacích rezervoárech, ventilátorech, inhalátorech aj. (18) Řadí se mezi podmíněně patogenní bakterie, které nejčastěji způsobují uroinfekce, nozokomiální sepse či infekce dýchacích cest. Nozokomiální infekce jsou nejčastěji na novorozeneckých odděleních a jednotkách intenzivní péče. (1) Nejběžnějšími druhy jsou *Klebsiella pneumoniae* a méně *Klebsiella oxytoca*.

Tento rod vytvářející bílé mukózní kolonie se vyznačuje produkcí výrazného polysacharidového pouzdra. Klebsiely jsou nepohyblivé, s ureasovou aktivitou a obsahují pouzdrné antigeny. (19)

Klebsiely se vyznačují primární rezistencí k ampicilinu. Komunitní kmeny jsou citlivé na cefalosporiny, chinolony, ko-trimoxazol a tetracykliny. Přibývá ale rezistentních kmenů, nesoucích plasmidy, kódující beta-laktamázy širokého spektra, které se vyskytují hlavně v nemocnicích jako původci nozokomiálních nákaz. V léčbě

jimi způsobených infekcí zbývají k terapii pouze karbapenemy, někdy aminoglykosidy, nitrofurantoin a kolistin. (19)

1.4.2 Rod *Enterobacter*

Enterobaktery jsou pohyblivé opouzdřené gramnegativní tyčinky, vyskytující se v lidském střevě. Vyznačují se biochemickou aktivitou, podobnou jako u klebsiel. Nejvýznamnějšími původci onemocnění jsou *Enterobacter cloacae* a méně *Enterobacter aerogenes*. (19)

Mimo střevní trakt způsobují infekce močových cest a respiračního traktu. Vyznačují se produkcí beta-laktamáz, přirozenou rezistencí především na cefalosporiny I. a II. generace a citlivostí na cefalosporiny III. generace, karbapenemy a polymyxiny. Řadí se rovněž k jednomu z relativně častých producentů ESBL. (18)

1.4.3 Rod *Escherichia*

Pro člověka důležitým bakteriálním zástupcem je *Escherichia coli*, která je běžným komenzálem střevní mikroflóry, kde brání uchycení patogenů a podílí se i na syntéze vitamínu K. Má antigenní struktury typu O, H, K, jejichž kombinací vznikají různé sérotypy. Je to pohyblivá bakterie štěpící glukosu a laktosu za tvorby plynu, tvoří indol a neštěpí močovinu. (19)

Pokud kmen obsahuje specifické faktory virulence, vyvolává ve střevě chorobné stavy a mimo střevo je vždy patogenní. Způsobuje průjmy novorozenců a kojenců, které jsou vyvolány enteropatogenními sérotypy tvořícími enterotoxin. U dospělých a dětí může enteroinvazivní nebo enterohemorhagický sérotyp způsobit kromě průjmů i závažná onemocnění postihující různé orgány (srdce, pankreas, centrální nervový systém aj.). *E. coli* se také často podílí na nozokomiálních nákazách, kde způsobuje hnisavé záněty kůže, infekce močových a dýchacích cest (především u ventilovaných pacientů), při migraci do krevního řečiště se stává původcem septických stavů. (18)

K léčbě extraintestinálních infekcí se používají antibiotika, ke kterým je *E. coli* primárně většinou citlivá, u intestinálních forem se doporučuje hlavně dehydratace a

dietní režim. V poslední době se zvyšuje počet záchytů *E. coli* produkujících ESBL a vykazující rezistenci k původně citlivým antibiotikům. (18)

1.4.4 Ostatní producenti ESBL

Mezi ostatní producenty ESBL řadíme gramnegativní bakterie, které začínají být ve stále častějších případech rezistentní na beta-laktamová antibiotika. Většinou lze v terapii použít cefalosporiny vyšší generace či ATB jiné skupiny. Mezi tyto méně časté producenty patří zástupci rodu *Citrobacter* spp., *Morganella* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Salmonella* spp. a *Serratia* spp.

1.5 Dopad rezistence na terapii a možnosti léčby

Geny rezistence se u bakterií vyskytovaly dříve, než byla zavedena samotná antibiotika do lékařské praxe. Je to dáno tím, že bakterie, které přirozeně produkují antibiotické látky, se takto zvýhodňují před jinými mikroby a geny rezistence využívají k ochraně před inhibicí vlastními antibiotiky. Mikroorganismy se takto přizpůsobují novým podmínkám v jejich životním prostředí. (11)

Pokud se v mikrobiální populaci objeví rezistentní jedinci, snaží se pomnožit a šířit rezistenci, čímž potlačí citlivé jedince. Tomuto jevu napomáhá i podávání antimikrobních látek, které sice zničí citlivou populaci, ale umožní převládnutí rezistentní populace. (11)

Na vzniku rezistence se nepodílejí pouze antibiotika, ale i používání dezinfekčních prostředků ve zdravotnictví, veterinářství, zemědělství a v současné době i v domácnostech (čisticí prostředky). Dochází ke zneškodňování běžně se vyskytujících bakterií, ale např. naředěním přípravků do nižších koncentrací vzniká vhodný prostor pro vznik rezistentních bakterií, jelikož dochází k stimulaci efluxních pump, kdy jsou odstraněny nejen škodlivé látky, ale i antibiotika. Tímto mechanismem mohou vznikat multirezistentní kmeny, vyskytující se i v běžné komunitě. (11)

Nejracionálnější je podání antibiotika k cílené terapii, kdy je znám původce nemoci, stanovena citlivost, popřípadě rezistence k ATB. Poté je možno podávat cílené (úzkospektré) antibiotikum přímo na daného původce. Při empirické terapii se aplikuje antibiotikum bez známé etiologie nemoci, předpokládá se nejpravděpodobnější agens a očekávaná citlivost na tento druh ATB. Širokospektrá antibiotika by se měla podávat především při iniciační terapii, kdy pacient prodělává život ohrožující infekci a nelze čekat na výsledky mikrobiologického vyšetření. V tomto případě se pokryje co nejvíce možných patogenů, avšak po stanovení etiologického agens by měl následovat výběr antibiotika s úzkým spektrem, aby byl selekční tlak širokospektrého ATB omezen na minimum. (9)

Kolonizace rezistentními kmeny vede k negativním důsledkům terapie. Zvyšuje se mortalita a dochází ke kratšímu přežívání pacientů s infekcemi způsobenými multirezistentními kmeny. (20)

Gramnegativní tyčky se vyznačují rychlou schopností adaptace na nově zavedená antibiotika, což dokazuje fakt rychlého nástupu rezistence k cefalosporinům III. generace a to především díky produkci ESBL, která se může pomocí konjugace plazmidů šířit dále. Lékem volby infekcí způsobených těmito kmeny jsou karbapenemy, avšak v poslední době přibývá kmenů produkujících karbapenemázy, kdy zůstává účinný pouze kolistin. (11) V roce 2009 byl v České republice zachycen kmen *Serratia marcescens* současně produkující metalo- β -laktamázu (MBL), širokospektrou β -laktamázu (ESBL) a dvě β -laktamázy typu AmpC. Tento kmen vykazoval rezistenci ke všem dostupným antibiotikům, což představuje hrozbu pro antibiotickou terapii v dalších letech. (21) Takové kmeny se označují jako panrezistentní a lze je akvirovat a importovat do ČR ze zemí s jejich častým výskytem (Turecko, Řecko,...).

2 Výzkumné otázky

Přítomnost a šíření bakteriální rezistence k současným antibiotikům se řadí mezi závažné problémy dnešní doby. Z tohoto důvodu bych chtěla zjistit, jaká je situace v Nemocnici České Budějovice, a. s. Při rutinním sledování a účasti na laboratorní praxi bych se chtěla zaměřit na otázku, který producent ESBL je nejčastější a ve kterém materiálu byl nalezen, popřípadě, na kterém oddělení nemocnice se rezistentní bakterie vyskytují. Dále bych chtěla porovnat jaký je poměr výskytu producentů ESBL v nemocnici oproti komunitě.

3 Metodika

Sběr dat probíhal během roku 2013 v Nemocnici České Budějovice, a. s. (NemČB), kde jsem se v období 22. 4. – 21. 5. 2013 účastnila rutinní praxe. Za spolupráce laborantek a lékařů Bakteriologického oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s. jsem zpracovávala příchozí biologický materiál, testovala bakterie na citlivost k příslušným antibiotikům, popřípadě dále zjišťovala jejich pozitivitu produkce ESBL. Bakterie byly izolovány z klinického materiálu pacientů hospitalizovaných v NemČB, dále pak z klinických ambulancí obvodních lékařů spadajících do spádové oblasti bakteriologické laboratoře. Při identifikaci jsem postupovala standardními mikrobiologickými pracovními postupy. Vždy jsem zařadila od jednoho pacienta jen jeden kmen daného druhu, který byl izolován z příslušného materiálu pro danou diagnózu jako první. Během své přítomnosti v laboratoři jsem izolovala bakterie z těchto klinických materiálů:

- sputum
- bronchiální sekret
- výtěr z krku a nosu
- moč
- sekret z rány
- cévní katétr
- stolice
- ucho
- krev

3.1 Zpracování biologického materiálu

Vzorky, které byly doručeny do laboratoře, byly zkontrolovány s přiloženou žádankou a řádně označeny číslem, poté zpracovány dle standardních laboratorních postupů. Materiál byl dále kultivován do dalšího dne v termostatu při teplotě 36 +/- 1 °C. Za 24 hod., odečítající lékař určil, zda se jedná o běžnou nebo patogenní mikroflóru. V druhém případě byla stanovena citlivost mikroba k příslušné skupině antibiotik.

Citlivost k antibiotikům byla stanovena diskovou difúzní metodou (kvalitativní) nebo automatizovanou testovací metodou VITEK 2 (semikvantitativní).

3.1.1 Bronchiální sekret a sputum

Tekutý materiál v podobě sputa je transportován do laboratoře v tzv. „sputovce“ (širší zkumavka se šroubovacím víkem). Materiál se naočkuje na pět pevných půd, jednu půdu tekutou a zhotoví se mikroskopický preparát. Pomocí vatového tamponu se inokuluje vzorek na Columbia agar s 5 % příměsí ovčí krve (CBD) a dále rozočkuje pro získání jednotlivých kolonií. Na této půdě se pouhým okem zachytí případné hemolytické vlastnosti bakteriálních kmenů. Inokulum se dále naočkuje na čokoládový agar (CHOC), který je živnou půdou pro náročnější bakterie (hemofily, meningokoky). K vyloučení kvasinkové infekce se masivně naočkuje na Sabouraudův agar (SCG), který obsahuje glukosu a je selektivním kultivačním médiem pro kvasinky a plísně. Jako selektivně diagnostickou půdu pro záchyt gramnegativních bakterií se používá MacConkeyho agar s příměsí krystalové violeti (MCV), která navíc obsahuje laktosu a rozděluje tak mikroby na laktosu štěpící a neštěpící. Poslední pevnou půdou je Columbia agar s příměsí 5 % ovčí krve a antibiotika (kyseliny nalidixové - CNA), na kterém se vyselektují grampozitivní koky. Tekutá půda se použije pro pomnožení malého množství bakterií. (22)

3.1.2 Výtěr z krku a nosu

Vzorky výtěrů z krku a nosu přicházejí do laboratoře na tamponu v transportní půdě. Každým tamponem se inokuluje stejná skladba ploten. Inokulum se rozočkuje na krevní agar (CBD) a Endův agar (EA) nebo MacConkeyho půdu (MCV) pro selektivní diagnostiku gramnegativních bakterií. Přes krevní agar se navíc naočkuje čistá kultura *Staphylococcus aureus*, v jehož přítomnosti se odhalí růst hemofilů. Do silného inokula na krevním agaru se položí antibiotický disk (gentamicin), který potlačí běžnou flóru a umožňuje zachytit případné respirační patogeny (především *Str. pyogenes*, méně *Str. pneumoniae*).

3.1.3 Cévní katétry

Odstřižená část (konečných 3-5 cm) cévního katétru se transportuje do laboratoře ve sterilní zkumavce. Zpracování katétru se provádí semikvantitativní metodou dle Makiho: katétr se vyjme sterilní pinzetou z transportní zkumavky a sterilním tamponem se rotačním pohybem poválí po krevním agaru (CBD). Poté se sterilní pinzetou přenesse do tekuté pomnožovací půdy, kde se nechá 24 hodin kultivovat. Pozitivní nález se projeví zákalem, který se dále vyočkovává na pevnou půdu. Se zaslaným katétreem se většinou odebírají i hemokultury k vyloučení/potvrzení katéetrové infekce krevního řečiště. (22)

3.1.4 Krev

Při diagnostice sepsí a jiných infekcí krevního řečiště se odebírá nesrážlivá krev pacienta do speciálních lahviček pro automatickou kultivaci. Odběr provádí sestra nebo lékař asepticky, z různých odběrových míst. Místo odběru musí být řádně očištěno a dezinfikováno jodovými preparáty do zaschnutí. Odběr se provádí většinou 3x po sobě, při vzestupu teploty pacienta. Rozlišují se lahvičky pro odběr aerobní a anaerobní kultury a lahvičky určené k odběru krve pacientů po podání antibiotik. Do každé lahvičky se odebere cca 10 ml krve. Hemokultury je třeba odebírat v dostatečném počtu (min. 2-3 ks), aby se vyloučila falešná pozitivita hemokultury kontaminací běžnou kožní flórou. Kultivace hemokultur probíhá v přístroji BacT/ALERT 3D značky bioMérieux, který detekuje případnou přítomnost CO₂ produkovaného rostoucími bakteriemi.

Přítomní mikrobi v hemokultuře produkují CO₂ při metabolismu substrátů obsažených v daných kulturách. S růstem mikroorganismů roste i množství CO₂, to vede ke změně barvy dna lahvičky z tmavé na světlou. Změna barvy je detekována LED diodou, jež vyzařuje světlo, které je poté měřeno fotodetektorem. Čím větší množství CO₂ je tvořeno, tím více světla dioda vyzařuje. Takový vzorek je brán jako pozitivní. Pokud po 7 dnech hemokultura nevykazuje produkci CO₂, je vyhodnocena jako negativní. (23)

Pozitivní hemokultury se po detekci přístrojem dále laboratorně zpracovávají. Krev se pomocí sterilní stříkačky a jehly aplikuje v případě aerobní kultivace na modifikovaný krevní agar (CBD) kultivovaný za zvýšené tenze CO₂, dále na Endovu půdu, zhotoví se mikroskopický preparát, který se barví dle Grama, a vzorek se aplikuje i do bujony s přídatkem NaCl, jenž lze poté použít pro stanovení MIC. Stanovení se provádí v plastových mikrotitračních destičkách s jamkami. Jamky jsou naplněny růstovým médiem a postupně se zvyšující koncentrací příslušného ATB. Vyšetřovaný kmen se nanese v suspenzi o hustotě 0,5 McFarlandovy stupnice optické denzity. Pro anaerobní kultivaci se vzorek navíc aplikuje na speciální agar Schaedler s vitamínem K.

3.1.5 Moč

Moč je transportována ve sterilních nádobkách se šroubovacím uzávěrem. Klasické zpracování moče se provádí metodou kalibrované kličky. Nejprve se kalibrovanou kličkou (10 µl) nabere koncentrovaná moč a nanese se svislá čára na krevní agar (CBD), přes tuto čáru se dále vzorek rozočkuje vlnovitým pohybem. Stejná klička se použije na nabrání dalšího množství moče a ponoří se poté do 1 ml fyziologického roztoku, čímž se zvětšilo zředění a materiál se rozočkuje vlnovitým pohybem na polovinu Endovy půdy a polovinu krevního agaru. Na druhou polovinu půd se aplikuje vzorek kličkou o menším objemu (1 µl), který se také ještě zředí ve fyziologickém roztoku. (22)

Většina vzorků moče v laboratoři je zpracována automatickým kultivačním systémem. Pouze vzorky, které přístroj nedokáže odečíst, jsou kultivovány výše zmíněným postupem. V laboratoři Nemocnice České Budějovice, a. s. používají přístroj HB&L UROQUATTRO firmy BioVendor. Vzorek se inokuluje pomocí pipety do speciální nádoby s kultivačním bujonem. Detekce probíhá metodou založenou na rozptylu světla, kdy přístroj zobrazuje růstovou křivku v reálném čase, vyjadřující kvantitu bakterií (v počtu CFU/ml). (24)

Z pozitivních močí se zhotoví mikroskopický preparát. Když se moč zcentrifugovala při 4000 ot. /min., sediment se poté natře na sklíčko a obarví dle Grama.

Pro identifikaci bakterií lze také použít chromogenní půdu UriSelect 4 firmy BIO-RAD, na které se podle příslušné barvy rozliší nejčastější původci infekcí močových cest. (22)

3.1.6 Stolice

Vzorek z trávicí trubice je dodáván jako výtěr z recta v Amiesově transportní půdě, nebo plná stolice ve speciální zkumavce. Materiál se při zpracování naočkuje na Endovu půdu, na speciální selektivní půdu pro salmonely a shigelly (S. S. agar), dále na selektivní půdu pro kampylobaktery a výtěrovka se vloží do selenitového bujonu pro pomnožení salmonel. (22)

3.1.7 Sekret z rány

Vzorky získané otiskem, stěrem či výtěrem z hnisavých infekcí a ran se inokulují a rozočkují po celé ploše krevního agaru, na který se pokládá gentamicin. Dále se materiál naočkuje na McConkeyho půdu a Columbia agar s příměsí 5 % ovčí krve a kyseliny nalidixové. Zhotoví se preparát, barvený dle Grama a výtěrový tampon se vloží do pomnožovací půdy. (25)

3.2 Kultivace vzorků

Kultivace půd probíhá v termostatu při teplotě $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 18-24 hod., popřípadě déle (podle druhu hledaného patogena). Některé půdy jsou kultivovány v prostředí s přítomností tenze CO_2 (= mikroaerofilně), anaerobní kultivace probíhá ve speciálních sáčcích, nebo v anaerobním boxu za nepřístupu vzduchu.

3.3 Identifikace a testování mikrobů na citlivost k antibiotikům

Druhý den (popřípadě později) po kultivaci vzorku lékař identifikuje mikroba. Pokud není jednoznačně zřejmé, o který bakteriální druh se jedná, laborantka provede doplňující biochemické testy, nebo je možné většinu bakterií určit pomocí přístroje VITEK MS od firmy bioMérieux. Tento přístroj pracuje na principu hmotnostní spektrometrie technologií MALDI – TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight). Vzorek je nanesen na speciální kovovou destičku, kde je smíchán se speciální matricí a usušen. Po vložení do přístroje pracujícího za vysokého vakua, je

ostřelován laserovým paprskem, který ionizuje molekuly matrice, jejíž protony ionizují molekuly vzorku. Vzniklé elektrické pole poté usměrňuje ionty do vlastního hmotnostního spektrometru, kde jsou jednotlivé ionty identifikovány podle času doletu. Ten je určen poměrem hmotnosti a nábojem iontu (m/e). Po dopadu na detektor je určeno jejich množství. Výstupem je hmotnostní spektrum, které je porovnáno s knihovnou spekter v počítači. Každý mikrob má své hmotnostní spektrum a vzorku je tak přiřazena procentuální pravděpodobnost shody s daným spektrem v PC. (26)

Identifikované vzorky jsou určeny dále k analýze jejich citlivosti k antibiotikům. V prvním kroku se vzorky testují diskovým difúzním testem, který se řadí mezi metody kvalitativní. Lze takto testovat bakteriální kmeny na širokou škálu antibiotik. Jako kultivační půda se používá Mueller – Hinton agar (MH), pro choulostivější mikroby (hemofily, moraxelly aj.) MH s příměsí koňské krve. Očkování plotny se provádí po přípravě suspenze z vyšetřovaného kmene a fyziologického roztoku (3 ml). Jak uvádí Hrabák (27), koncentrace inokula buněk bakterií by měla být zhruba 10^5 buněk/ml. Je nutno dosáhnout stavu, kdy se kolonie dotýkají, ale nepřekrývají. Tato suspenze se pipetou nanese na plotnu a kývavým pohybem zajistí její rovnoměrné pokrytí. Přebytek suspenze se odsaje Pasteurovou pipetou. Po zaschnutí plotny se pokládají papírové disky nasycené daným množstvím antibiotika. Každý mikrob má speciální skladbu skupiny ATB. Plotny se kultivují do druhého dne při teplotě 36°C.

ATB difunduje do agaru a inhibuje rostoucí bakterie vytvořením tzv. inhibiční zóny (IZ). Velikost inhibiční zóny odečítá lékař posuvným měřítkem. Naměřená hodnota se porovnává s referenčními zónami doporučenými institucí European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), která uvádí tři kategorie rozdělení:

1. kmen citlivý: aktivita ATB poskytuje vysokou pravděpodobnost úspěchu léčby
 2. kmen intermediárně rezistentní: úspěch léčby s danou aktivitou ATB je nejistý
 3. kmen rezistentní: aktivita ATB vykazuje vysokou pravděpodobnost selhání léčby
- (28)

Kmeny, které mají IZ větší, než udává referenční mez, jsou považovány za citlivé. Bakterie rostoucí až k disku, nebo mající IZ menší než je referenční mez, se považují za rezistentní. Z produkce ESBL jsou podezřelé ty kmeny, které měly většinu hodnot IZ nižší, než je hodnota hraniční. (22)

Kmeny podezřelé z produkce ESBL se dále podrobují kvantitativní analýze citlivosti pomocí přístroje VITEK 2 od firmy bioMérieux. Metoda je založená na technice MIC za použití speciálních čipových karet. Jedná se o zkrácenou verzi techniky dvojitého ředění pro MIC stanovené mikrodiluční metodou. Každý čip obsahuje 63 mikrojamek obsahujících předem odměřené množství antimikrobiální látky a kultivačního média. Karta obsahuje i jamku kontrolní bez antimikrobiální látky. Vlastní analýze předchází příprava suspenze z analyzované kolonie a fyziologického roztoku (0,45%), odpovídající zákalu 0,5 McFarlanda. Po vložení do přístroje dochází pod tlakem k nasátí roztoku do jednotlivých jamek. Probíhá inkubace, během které dochází k růstu mikrobů v jamce. Po uplynutí inkubační doby dochází ke stanovení MIC každé antimikrobiální látky. Výsledky jsou interpretovány do kategorií citlivosti pomocí break-pointů antibiotik, vyjádřené hodnotou MIC v mg/l. Break-pointy stanovuje v základním dokumentu EUCAST. (29)

Detekce ESBL se stanovuje pomocí chromatogenní půdy chromID ESBL od firmy bioMérieux, která obsahuje směs ATB, především cefpodoxim. Tato půda je určena k identifikaci producentů ESBL čeledi *Enterobacteriaceae*. Po inkubaci 18-24 hodin lze rozlišit jednotlivé druhy podle barvy kolonie.

Přesnější metodou detekce ESBL je Double Disk Synergy Test (DDST). Metoda je založena na principu detekce deformace inhibičních zón, způsobené testovaným kmenem na MH agaru mezi disky s cefalosporiny a aztreonamem, a diskem s amoxicilinem/klavulanovou kyselinou. Suspenze buněk bakterií ve fyziologickém roztoku (0,5 McFarlandova zákalu) se inokuluje na MH agar, přebytek tekutiny se odsaje sterilní pipetou. Po zaschnutí plotny se položí skupina ATB o předepsaném složení a umístění, které znázorňuje schéma 1.

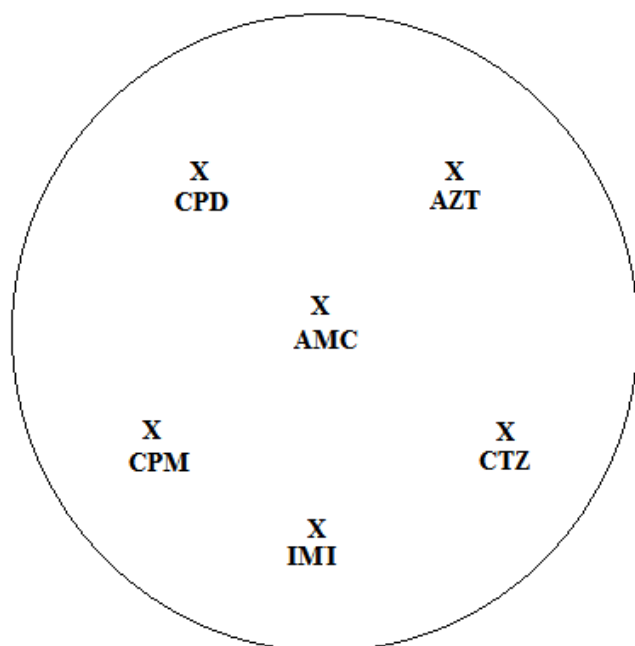


Schéma 1 Doporučené rozložení disků ATB při metodě DDST (27)

Legenda: CPD – cefpodoxim, AZT – aztreonam, AMC – amoxicilin + kyselina klavulanová, CTZ – ceftazidim, IMI – imipenem, CPM – cefepim

Jak uvádí Hrabák (27), producent ESBL vytváří zvětšenou inhibiční zónu ve tvaru „zátky od šampaňského“ kolem disku alespoň jednoho z antibiotik (aztreonam, cefotaxim, ceftazidim, cefepim) na straně sousedící s diskem kombinace amoxicilin/kyselina klavulanová (viz. příloha 3 a 4).

Pro rychlé zjištění produkce beta-laktamázy lze použít produkt firmy BIO-RAD β LACTA test. Slouží k rychlé detekci rezistence bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* vůči třetí generaci cefalosporinů. Jedná se o kvalitativní kolorimetrický test, který se provádí přímo na vypěstovaných koloniích po kultivaci 16-24 hodin na kultivačních médiích. Test je schopen identifikovat beta-laktamázy typu ESBL, AmpC, metalo- β -laktamázy a karbapenamázy. (14) Princip testu je založen na schopnosti štěpení substrátu. Tím je chromogenní cefalosporin. Rozštěpení substrátu způsobí pouze bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* s produkcí beta-laktamáz. Substrát nejsou schopny hydrolyzovat získané penicilinázy. V balení jsou obsaženy 2 reagentie, které se

smíchají, a výsledek se odečte za 15 minut. (30) Princip provedení testu je zobrazen na schématu 2.

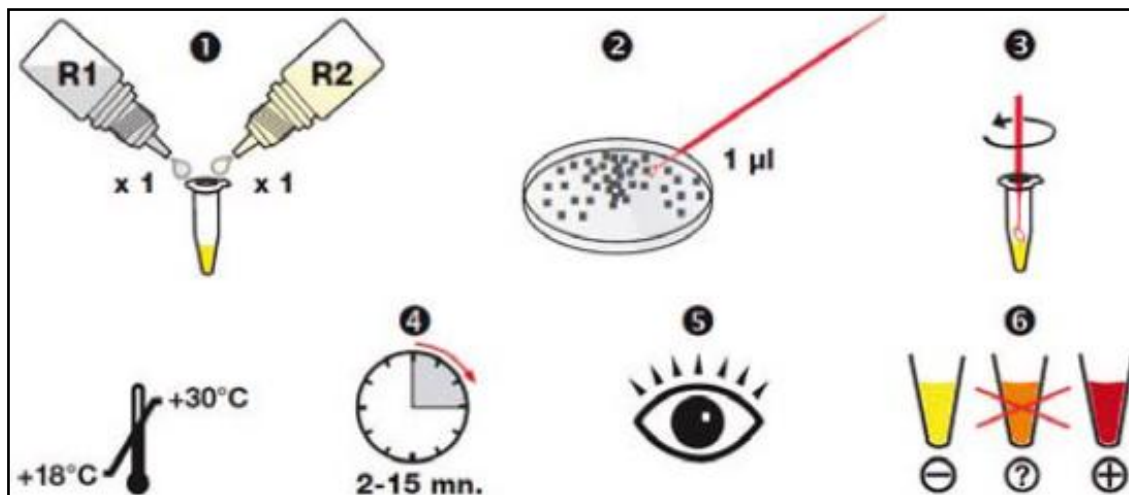
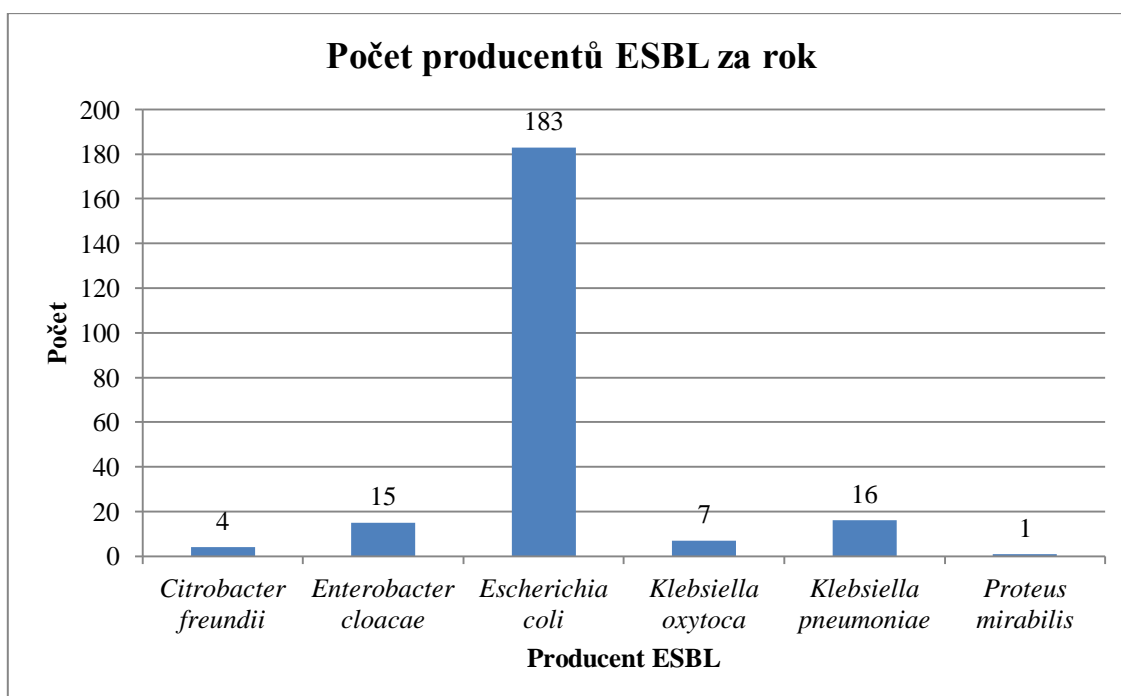


Schéma 2 Provedení β LACTA testu (30)

4 Výsledky

V průběhu roku 2013 bylo na Bakteriologickém oddělení NemČB zpracováno celkem 12 347 izolátů z čeledi *Enterobacteriaceae* – konkrétně kmeny *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* a *Proteus mirabilis*. Z toho byla u 226 producentů potvrzena produkce ESBL. Jednotlivé počty producentů ukazuje graf 1. Detailnější údaje jsou uvedeny v příloze 5.

Graf 1 Počet producentů ESBL za rok 2013



V době od 22. 4. -21. 5. 2013 se izolovalo 9186 mikrobů, z toho 1035 izolátů z čeledi *Enterobacteriaceae* – konkrétně *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia stuartii* a *Salmonella Brandenburg*. Zachytilo se 25 producentů ESBL. Počty zobrazuje tabulka 2.

Tabulka 2 Přehled izolovaných kmenů, včetně producentů ESBL 22. 4. - 21. 5. 2013

Druh	Počet celkem	Počet ESBL
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	77	4
<i>Escherichia coli</i>	763	13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	180	5
<i>Providencia stuartii</i>	8	1
<i>Salmonella Brandenburg</i>	1	1
celkem	1035	25

4.1 Rozdělení izolátů dle typu nemocničního oddělení

V této části jsou vzorky rozděleny dle nemocničního oddělení na interní či chirurgické. Mezi interní oddělení byla zařazena tato oddělení: anesteziologicko-resuscitační (ARO), gastroenterologické, hemodialyzační, infekční, interní, kardiologické, neurologické, oddělení následné péče, plicní, rehabilitační. Chirurgické oddělení tvořila oddělení kardiochirurgická, neurochirurgická, ortopedická, porodnicko-gynekologická, traumatologická, urologická. Nebyla zařazena oddělení: dětské, neonatologické, kožní, psychiatrické. Analýzu výskytu uvádí tabulka 3 a 4.

Tabulka 3 Výskyt ESBL pozitivních kmenů dle typu oddělení za rok 2013

Druh	Interna	Chirurgie
<i>Citrobacter freundii</i>	3	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	6	8
<i>Escherichia coli</i>	122	51
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	3
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0
celkem	146	65

Tabulka 4 Výskyt ESBL pozitivních kmenů dle typu oddělení 22. 4. – 21. 5. 2013

Druh	Interna	Chirurgie
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	4
<i>Escherichia coli</i>	11	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	1
<i>Providencia stuartii</i>	1	0
<i>Salmonella Brandenburg</i>	1	0
celkem	18	7

4.2 Rozdělení izolátů dle typu klinických materiálů

Data byla rozdělena dle výskytu daného kmene v konkrétním typu klinického materiálu. Byl sledován výskyt v moči, stěru (absces, drén, hnis, punktát, sekret z rány, stěry ze sterna, dekubitu, výtěr z defektu), dolních cestách dýchacích (bronchiální aspirát, sputum), hemokultuře. Jiné vzorky byly zařazeny do kolonky ostatní. Výsledky dle producenta a materiálu jsou zobrazeny v tabulce 5 a 6, celkové počty dle typu biologického materiálu jsou vyobrazeny v grafu 2 a 3.

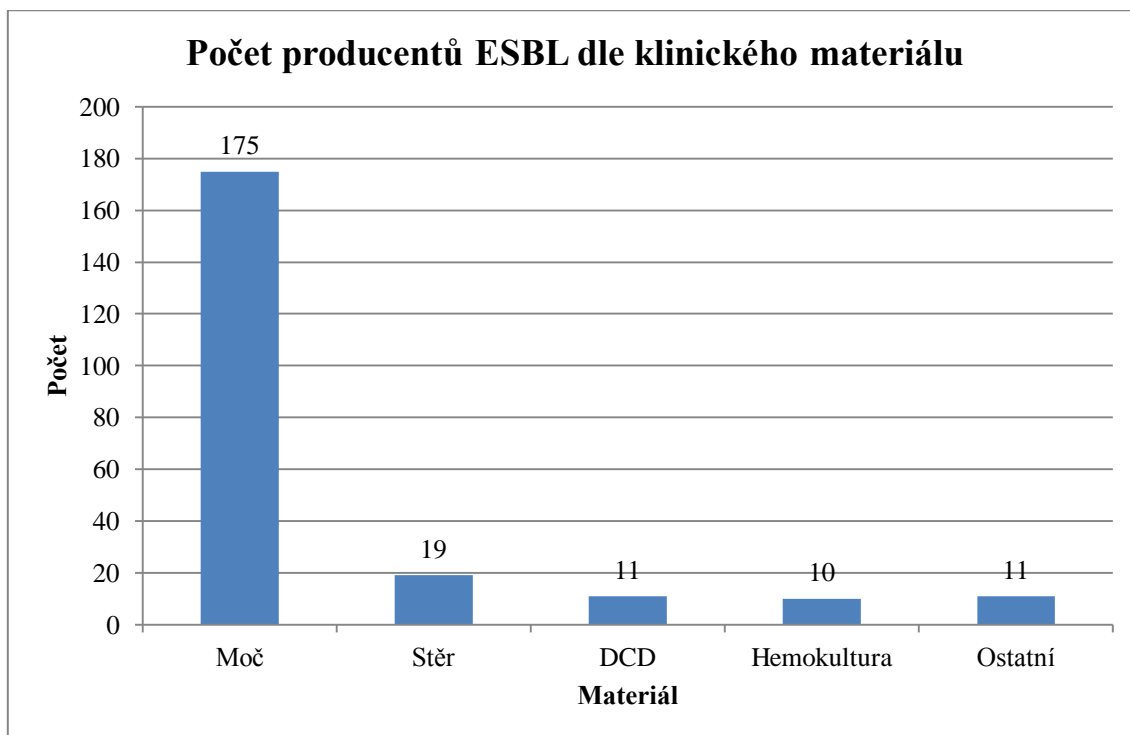
Tabulka 5 Výskyt producentů ESBL dle klinického materiálu v roce 2013

Druh	Moč	Stěr	DCD	Hemokultura	Ostatní	Celkem
<i>Citrobacter freundii</i>	3	0	0	1	0	4
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	3	5	0	3	15
<i>Escherichia coli</i>	154	15	5	6	3	183
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	1	0	0	1	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	0	1	3	4	16
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	1
celkem (počet)	175	19	11	10	11	226

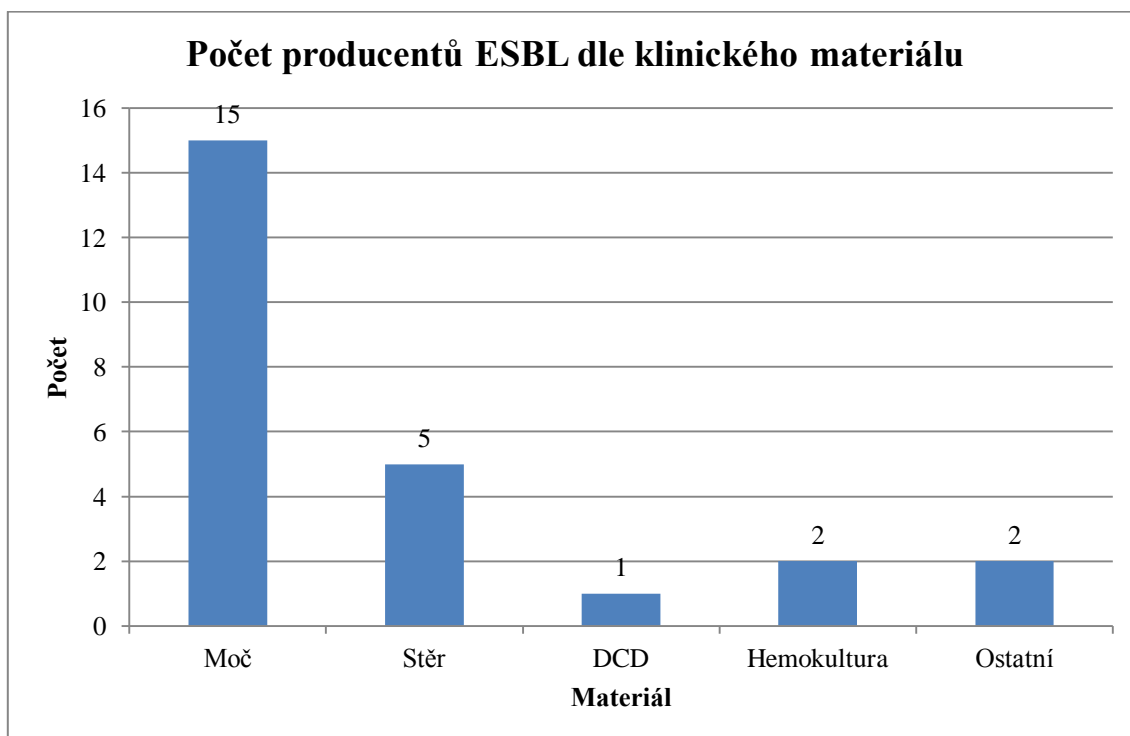
Tabulka 6 Výskyt producentů ESBL dle klinického materiálu 22. 4. - 21. 5. 2013

Druh	Moč	Stěr	DCD	Hemokultura	Ostatní	Celkem
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	2	0	0	0	4
<i>Escherichia coli</i>	9	1	0	2	1	13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	1	0	0	0	5
<i>Providencia stuartii</i>	0	1	0	0	0	1
<i>Salmonella Brandenburg</i>	0	0	0	0	1	1
celkem (počet)	15	5	1	2	2	25

Graf 2 Celkový počet klinických materiálů s ESBL producenty za rok 2013



Graf 3 Celkový počet klinických vzorků s ESBL producenty 22. 4. - 21. 5. 2013



4.3 Počet producentů ESBL v nemocnici a v komunitě

V této části je zobrazen vztah mezi výskytem producentů ESBL v nemocnici a v komunitě. Mezi komunitu jsou zařazeni obvodní lékaři, kteří spadají do oblasti Nemocnice České Budějovice, a. s. Výsledky zobrazuje tabulka 7 a 8.

Tabulka 7 Počet producentů ESBL v nemocnici a v komunitě za rok 2013

Místo odběru	Počet ESBL	Počet celkem
nemocnice	222	10 791
komunita	4	1556
celkem	226	12 347

Tabulka 8 Počet producentů ESBL v nemocnici a v komunitě 22. 4. - 21. 5. 2013

Místo odběru	Počet ESBL	Počet celkem
nemocnice	25	895
komunita	0	140
celkem	25	1035

4.4 Účinnost ATB u producentů ESBL

Tabulka 9 a 10 zobrazuje rezistenci gramnegativních patogenů k vybraným antibiotikům, která se běžně užívají ke zjištění citlivosti mikroba na ATB. Je třeba říci, že účinnost cefepimu, cefotaximu, ceftazidimu, cefuroximu a piperacilinu + tazobaktamu je v terapii nejistá. Cefoxitin se jako lék na močové infekce již nevyrábí, ale používá se k laboratorní diagnostice průkazu produkce ESBL.

Tabulka 9 Rezistence vybraných producentů ESBL k antimikrobním přípravkům za rok 2013

ATB	Bakteriální druh		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
AMI	13	0	0
AXC	112	2	2
CFP	96	3	2
CFX	37	1	2
CIP	128	5	2
COL	0	0	0
CRX	114	2	1
CTX	163	5	5
CTZ	105	5	2
EPM	-	0	0
FUR	13	2	0
GEN	35	5	3
IMP	1	0	0
MER	1?	0	0
NFN	109	4	2
PPT	28	4	2
TGC	0	2	0
TMN	63	4	2
TMP	101	4	2
TMS	129	5	3

Legenda: AMI – amikacin, AXC – amoxicilin + kyselina klavulanová, CFP – cefepim, CFX – cefoxitin, CIP – ciprofloxacin, COL – kolistin, CRX – cefuroxim, CTX – cefotaxim, CTZ – ceftazidim, EPM – ertapenem, FUR – nitrofurantoin, GEN – gentamicin, IMP – imipenem, MER – meropenem, NFN – norfloxacin, PPT – piperacilin + tazobaktam, TGC – tigecyklin, TMN – tobramycin, TMP – trimetoprim, TMS – trimetoprim + sulfonamid

Tabulka 10 Rezistence vybraných producentů ESBL k antimikrobním přípravkům 22. 4. - 21. 5. 2013

ATB	Bakteriální druh		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
AMI	0	0	-
AXC	8	4	2
CFP	8	4	2
CFX	1	2	2
CIP	8	4	2
COL	0	0	0
CRX	8	1	2
CTX	12	4	2
CTZ	5	4	2
EPM	0	0	-
FUR	1	2	0
GEN	4	4	2
IMP	0	0	0
MER	0	0	0
NFN	7	1	2
PPT	0	3	2
TGC	0	2	-
TMN	5	1	2
TMP	8	0	2
TMS	11	2	2

5 Diskuze

Prevalence ESBL-pozitivních mikrobů z čeledi *Enterobacteriaceae* se pohybovala okolo 1,83 %. Při porovnání se studií Koláře et al. z roku 2010 ve třech moravských nemocnicích byla procenta nižší, zde 4 – 12 %. (16) Stále je však výsledek příznivější, než studie prováděné ve světě, analýza Scicluna et al. na Maltě poukazuje na 13,2% výskyt ESBL pozitivních kmenů, Ko et al. dokonce 14% v nemocnicích v Koreji. (31; 32)

5.1 Zhodnocení a porovnání výsledků Nemocnice České Budějovice, a. s. za rok 2013

Nejčastějším producentem ESBL za rok 2013 byl kmen *Escherichia coli* (183 izolátů), následován kmeny *Klebsiella pneumoniae* (16 izolátů) a *Enterobacter cloacae* (15 izolátů). Během měsíce 22. 4. – 21. 5. 2013 bylo pořadí producentů stejné. Ve studii Koláře et al. je na prvním místě kmen *Klebsiella pneumoniae* (578 izolátů), následně kmen *Klebsiella oxytoca* (42 izolátů) a *Escherichia coli* (228 izolátů). (16) Nejen, že je výskyt producentů nižší, změnilo se i pořadí ESBL producentů. Tuto skutečnost si lze vysvětlit kombinací různých příčin. První z nich je selekční tlak podávaných antibiotik, dále vliv vnějšího prostředí, ve kterém se rezistentní bakterie nacházejí a hlavně výměna genetického materiálu mezi bakteriemi stejného i odlišného druhu. (33)

Při rozdělení izolátů dle typu nemocničního oddělení vyšlo najevo, že většina kmenů ESBL producentů se vyskytuje na interních odděleních, konkrétně *Escherichia coli* 122 izolátů, *Klebsiella pneumoniae* 10 izolátů. V jediném případě, a to u kmene *Enterobacter cloacae*, se vyskytl vyšší výskyt na chirurgickém oddělení, 8 izolátů ze 13. Během měsíce 22. 4. – 21. 5. 2013 převažoval výskyt na interním oddělení, ale kmen *Enterobacter cloacae* se nacházel pouze na chirurgickém oddělení. Převaha na interním oddělení je dána hlavně rozdílnou skladbou pacientů. Na interních odděleních se nachází pacienti, kteří pravděpodobně již byli hospitalizováni, užívali ATB a přicházeli do styku s nozokomiálními kmeny déle než pacienti na chirurgickém

oddělení. Odlišnost je dána i rozdílným množstvím lůžek na jednotlivých odděleních – 574 lůžek na interním oddělení a 505 lůžek na chirurgickém oddělení (stav k r. 2012).

Porovnáním počtu vzorků z jednotlivých typů klinických materiálů byl jednoznačně největší výskyt kmenů v moči - konkrétně 175 izolátů, z toho 154 vzorků kmene *Escherichia coli*. Potvrzuje tak své prvenství původce uroinfekcí, vlivem specifických faktorů virulence – adhesiny (pili) specifickými vazbou na epitelie močových cest. Při srovnání s tříměsíční studií Ko et al. dochází k záchytu poměrně velkého množství ESBL kmenů za tak krátké období. Převažujícím materiálem s izoláty je zde také moč (90 izolátů), poté materiál z dolních cest dýchacích (61 izolátů), hemokultura a stěry. Liší se však původce, který dominuje. Ve studii jasně vítězí kmeny *Klebsiella pneumoniae*, které jsou významným původcem nejen uroinfekcí, ale i nozokomiálních nákaz. (32) Přehled izolátů ukazuje tabulka 11.

Tabulka 11 Výskyt producentů ESBL dle klinického materiálu v korejských nemocnicích (32)

Isolation source	Total			<i>E. coli</i>			<i>K. pneumoniae</i>			<i>E. cloacae</i>		
	No. of isolates (%)	ESBL (%)	<i>P</i> ^a	No. of isolates (%)	ESBL (%)	<i>P</i> ^a	No. of isolates (%)	ESBL (%)	<i>P</i> ^a	No. of isolates (%)	ESBL (%)	<i>P</i> ^a
Sputum	298 (20.1)	49 (16.4)	0.190	16 (3.5)	6 (37.5)	0.003	188 (34.4)	32 (17.0)	0.026	22 (21.0)	5 (22.7)	0.344
Blood	151 (10.2)	16 (10.6)	0.194	54 (11.7)	4 (7.4)	0.468	61 (11.2)	9 (14.8)	0.144	14 (13.3)	2 (14.3)	1.000
Bile	36 (2.4)	8 (22.2)	0.155	9 (2.0)	2 (22.2)	0.232	8 (1.5)	3 (37.5)	0.388	4 (3.8)	1 (25.0)	0.512
Aspirate	29 (2.0)	12 (41.4)	<0.001	4 (0.9)	3 (75.0)	0.004	14 (2.6)	8 (57.1)	0.005	2 (1.9)	1 (50.0)	0.299
Urine	598 (40.3)	90 (15.1)	0.379	312 (67.8)	26 (8.3)	0.053	158 (28.9)	56 (35.4)	<0.001	17 (16.2)	1 (5.9)	0.296
Urine catheterized	136 (9.2)	33 (24.3)	<0.001	48 (10.4)	6 (12.5)	0.613	56 (10.3)	26 (46.4)	<0.001	4 (3.8)	0	1.000
Urine voided	427 (28.8)	53 (12.4)	0.239	238 (51.7)	18 (7.6)	0.052	102 (18.7)	30 (29.4)	0.130	12 (11.4)	1 (8.3)	0.685
Pus	95 (6.4)	7 (7.4)	0.052	18 (3.9)	2 (11.1)	0.705	38 (7.0)	2 (5.3)	0.008	8 (7.6)	1 (12.5)	1.000
Peritoneal fluid	26 (1.8)	3 (11.5)	1.000	4 (0.9)	0	1.000	10 (1.8)	1 (10.0)	0.469	5 (4.8)	2 (40.0)	0.184
Skin	17 (1.1)	1 (5.9)	0.494	4 (0.9)	0	1.000	7 (1.3)	1 (14.3)	1.000	2 (1.9)	0	1.000
Nasal	47 (3.2)	1 (2.1)	0.017	1 (0.2)	0	1.000	11 (2.0)	1 (9.1)	0.470	9 (8.6)	0	0.349
Wound	25 (1.7)	2 (8.0)	0.563	6 (1.3)	0	1.000	3 (0.5)	0	1.000	6 (5.7)	2 (33.3)	0.249
Others	153 (10.3)	18 (11.8)	0.384	32 (7.0)	4 (12.5)	0.555	48 (8.8)	10 (23.8)	0.755	16 (15.2)	2 (12.5)	1.000
Total	1484	209 (14.1)		460	47 (10.2)		546	123 (22.4)		105	17 (16.2)	

^a Fisher exact *t* test or χ^2 test. Statistical significance was analyzed to compare ESBL production rate in isolates from a particular source with those in other sources.

Dále byly sledovány případy, kdy se ESBL původce vyskytl v komunitě. Z celkového počtu 2371 izolátů, které byly zaslány z ordinací praktických lékařů, 4 vzorky obsahovaly ESBL pozitivní kmen. Všichni původci byli nalezeni v moči, 3 kmeny *Escherichia coli* a 1 kmen *Enterobacter cloacae*. Relativně nízký počet výskytu

v komunitě poukazuje na fakt, že lékaři nemají možnost předepisovat širokospektrá ATB a tím podporovat vznik rezistence. Na zlepšení přístupu lékařů k předepisování antibiotik v primární péči má zřejmě i vliv Národní antibiotický program (NAP), jehož úkolem je nejen sledovat aktuální stav rezistence, ale i informovat odbornou veřejnost, zajišťovat správnou preskripci v léčebném i profylaktickém používání antimikrobních látek a mimo jiné o používání ATB informovat i laickou veřejnost. Zároveň je nutno poukázat na fakt, že nebyla lékařem zjištěna pacientova osobní anamnéza a případně tak byly vyloučeny kmeny, které by pocházely z nemocničního prostředí. Výskyt komunitních ESBL producentů se však ve světě neustále zvyšuje, což dokládá i studie Khanfara et al., kdy dokonce počet komunitních ESBL producentů kmene *Escherichia coli* převažoval nad nemocničními, viz tabulka 12.

Tabulka 12 Počty nemocničních a komunitních pacientů (34)

Organism	In-patients		Out-patients	
	Total	ESBL (%)	Total	ESBL (%)
<i>E.coli</i>	690	109 (15.7)	4813	234 (4.8)
<i>K. pneumoniae</i>	225	31 (13.7)	955	30 (3.1)
<i>K. oxytoca</i>	12	3 (25)	55	2 (3.6)
Total	927	143 (15.4)	5823	266 (4.5)

V poslední fázi výzkumu byla sledována laboratorní účinnost k běžně podávaným antibiotikům. Z výsledků je zřejmá vysoká rezistence kmenů *Escherichia coli* i k více skupinám ATB, tedy multirezistence. Více jak 60% rezistenci vykazovaly kmeny k inhibitoru beta-laktamáz – amoxicilinu s kyselinou klavulanovou, chinolonům – ciprofloxacinu, cefalosporinům 2. generace – cefuroximu a cefoxitinu, trimetoprimu se sulfonamidem a největší rezistenci (89,10 %) k cefalosporinům 3. generace – cefotaximu a ceftazidimu. Relativně vysokou účinnost vykazovala antibiotika ze skupin aminoglykosidů, nitrofuránů, a samozřejmě karbapenemy, které jsou v současnosti lékem poslední volby. Vyskytl se zde ale i kmen, který měl rezistenci k imipenemu a hraniční citlivost k meropenemu. Tento způsob rezistence je však příkladem rezistence způsobené snížením permeability buněčné stěny redukcí počtu porinů, nikoli produkcí beta-laktamáz. Zvyšující se rezistence kmenů *Escherichia coli* ke karbapenemům je

celosvětovým problémem. Evropský vývoj ukazují mapy European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), schéma 3 a 4, str. 57.

Účinnost ATB u kmenů *Klebsiella pneumoniae* byla ve většině případů zachována, více jak 25% rezistenci vykazovaly kmeny v ojedinělých případech k chinolonům – ciprofloxacinu, norfloxacinu; cefalosporinům 3. generace – cefotaximu, ceftazidimu; aminoglykosidům – gentamicinu, tobramycinu a trimetoprimu se sulfonamidem. Kmen *Enterobacter cloacae* vykazuje vyšší rezistenci (33 %) pouze k cefotaximu.

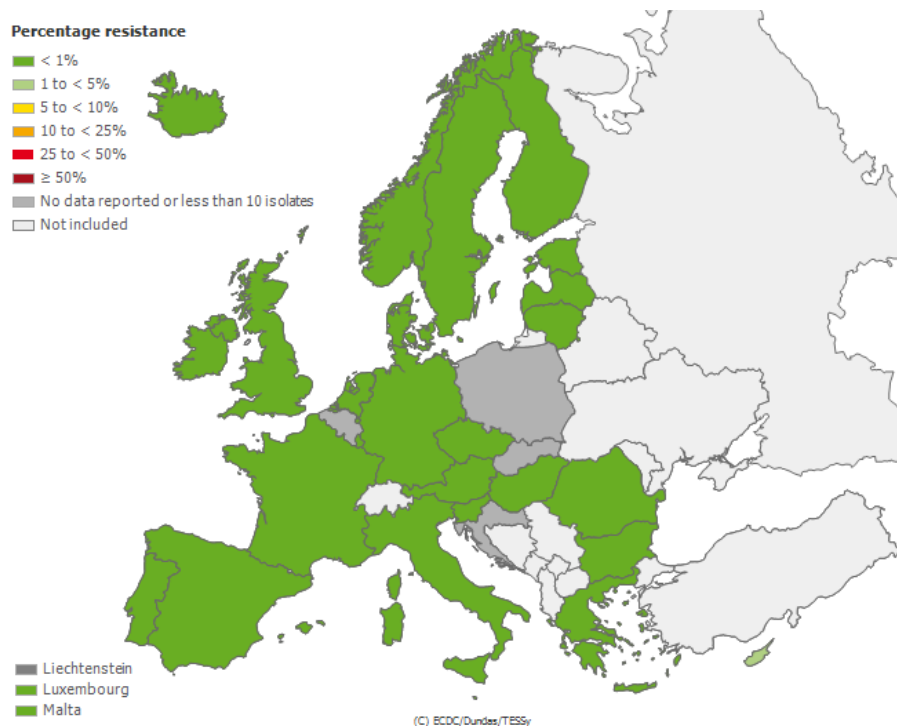


Schéma 3 Rezistence *Escherichia coli* ke karbapenemům v Evropě 2007 (35)

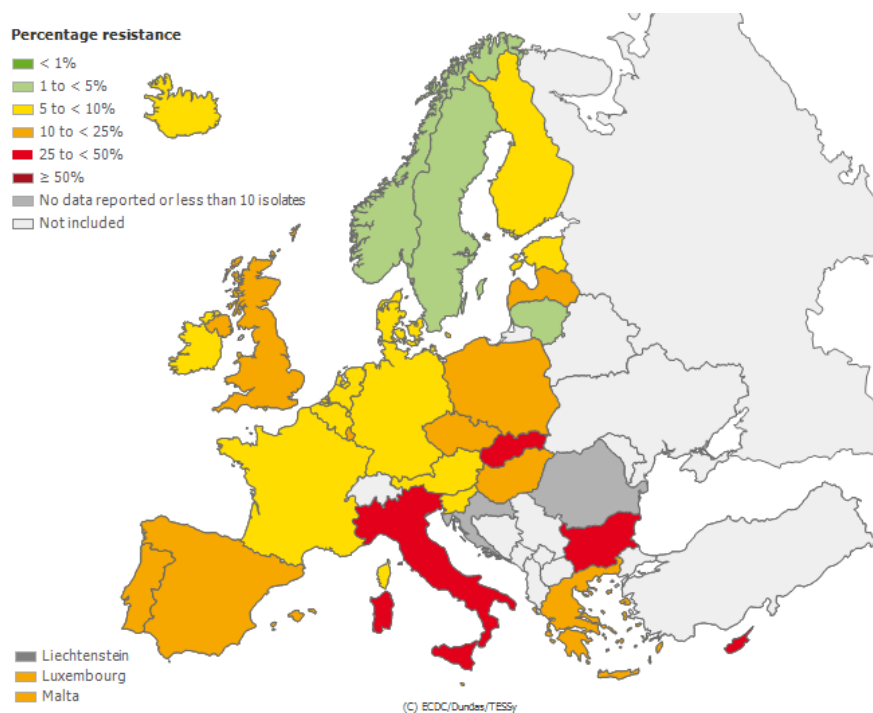


Schéma 4 Rezistence *Escherichia coli* ke karbapenemům v Evropě 2012 (35)

Studie provedená Sedlákovou et al. ve Fakultní nemocnici Olomouc během 17 měsíců zachytila 9 izolátů, které měly MIC meropenemu 2mg/l a vyšší. Producenty byly kmeny *Klebsiella pneumoniae* a *Enterobacter cloacae*, u žádného kmene nebyla potvrzena produkce karbapenemáz či metalo-beta-laktamázy, ale byla zachycena produkce ESBL a AmpC, které způsobovaly rezistenci. Genetickou detekci zobrazuje tabulka 13. (8)

Přestože Hrabák a Žemličková upozorňují na šíření bakterií produkujících transferabilní karbapenemázy, výsledkem je výrazně ztížená léčba těchto pacientů z důvodu omezení v dostupnosti účinných antibiotik. Jediným účinným antibiotikem v tomto případě zůstává většinou pouze kolistin. Bakteriální druh, u kterého se vyskytuje gen rezistence, je schopný pomocí plazmidu či transpozonu šířit tento gen a způsobovat rezistenci i k ostatním skupinám ATB, dokonce horizontálně přenášet gen rezistence na jiné druhy. (36)

Za rok 2013 bylo zachyceno 13 kmenů, které produkovaly současně širokospektrou i inducibilní beta-laktamázu, konkrétně u kmenů *Citrobacter freundii* a *Enterobacter cloacae*.

Tabulka 13 Výsledky genetické detekce karbapenemáz, ESBL a AmpC (8)

	Genetické stanovení karbapenemáz				Genetické stanovení širokospektrých beta-laktamáz		
	Species	Serinové tř. A	MBL	OXA-23	OXA-48	ESBL	AmpC
1	KLPN	negativní	negativní	negativní	negativní	CTX-M	-
2	KLPN	negativní	negativní	negativní	negativní	CTX-M	-
3	KLPN	negativní	negativní	negativní	negativní	-	EBC
4	KLPN	negativní	negativní	negativní	negativní	CTX-M	-
5	KLPN	negativní	negativní	negativní	negativní	CTX-M	-
6	KLPN	negativní	negativní	negativní	negativní	CTX-M	-
7	KLPN	negativní	negativní	negativní	negativní	CTX-M	-
8	ENCL	negativní	negativní	negativní	negativní	SHV	-
9	ENCL	negativní	negativní	negativní	negativní	-	DHA

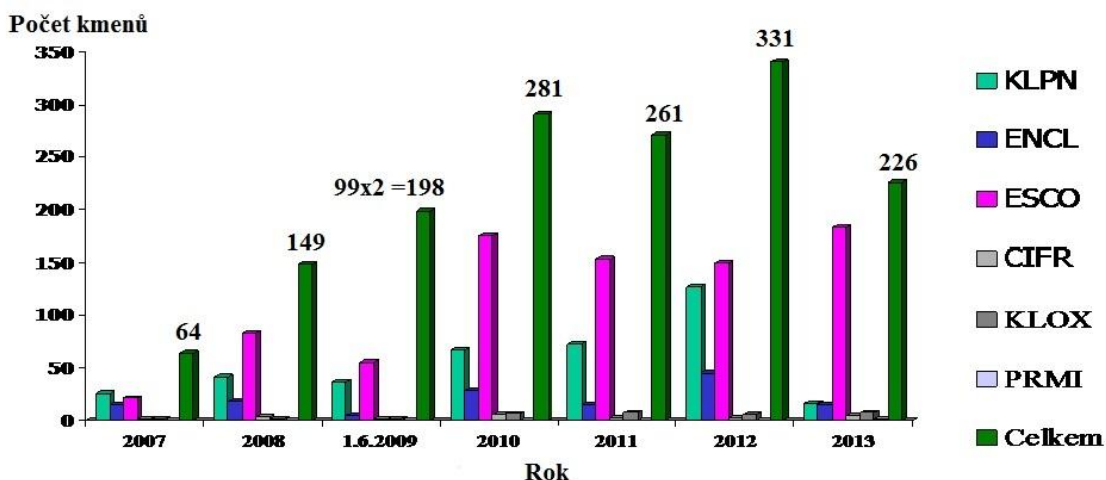
5.2 Porovnání s prevalencí ESBL producentů v Nemocnici České Budějovice, a. s. 2007-2013

Zjištěná data byla porovnána s interními výsledky Nemocnice České Budějovice, a. s., za období 2007-2013. Data byla získána od MUDr. Magdaleny Horníkové. K dispozici jsou pouze celkové počty producentů za daný rok a rozdělení dle druhů. V roce 2009 laboratoř přecházela na jiný laboratorní program, data byla získána pouze za první pololetí, celkový počet je zhruba dvojnásobný a výsledek pouze přibližný, viz graf 4 na str. 60.

Během let 2007-2012 je patrná vzestupná tendence výskytu producentů ESBL. Každým rokem se počet téměř zdvojnásobuje. Zatímco v roce 2007 se vyskytlo pouze 64 producentů, v roce 2012, kdy je hodnota nejvyšší, počet producentů je až pětikrát větší, t.j. 331 producentů. Lze tak pozorovat, že celosvětový vzestupný trend se nevyhnul ani České republice. Situace v roce 2013 je příznivější, došlo k poklesu a hodnota je dokonce nižší než v roce 2010 a 2011. Tento fakt lze přisuzovat příznivému vlivu aplikace antibiotického programu a aktivnímu sledování antibiotické rezistence.

Ve sledovaném období dochází ke změně četnosti jednotlivých bakteriálních druhů. V roce 2007 byl vedoucím producentem kmen *Klebsiella pneumoniae* (KLPN), následovaný kmenem *Escherichia coli* (ESCO) a *Enterobacter cloacae* (ENCL). Již následující rok je nejčastějším producentem ESCO a toto prvenství přetrvává dodnes. Výskyt KLPN se také zvyšuje, ale ne v takovém množství jako ESCO, výjimkou je rok 2012, kdy četnost obou kmenů je téměř stejná. Naopak v roce 2013 dochází k výraznému poklesu výskytu KLPN. Výskyt kmene ENCL nepřekračuje hodnoty vyšší jak 50 izolátů, nárůst byl v roce 2012. V posledních letech dochází i ke zvýšení výskytu kmene *Klebsiella oxytoca*, produkujícího ESBL. Tento fakt lze vysvětlit zavedením citlivější moderní metody MALDI-TOF, která pomáhá stanovit jednotlivé druhy rodu *Klebsiella*.

Graf 4 Incidence producentů širokospektré beta-laktamázy, dle bakteriálního druhu 2007-2013



Zdroj: Nemocnice České Budějovice a. s.

Legenda: KLPN – *Klebsiella pneumoniae*, ENCL – *Enterobacter cloacae*, ESCO – *Escherichia coli*, CIFR – *Citrobacter freundii*, KLOX – *Klebsiella oxytoca*, PRMI – *Proteus mirabilis*

5.3 Možné přístupy k řešení problému bakteriální rezistence

Antibiotická rezistence, která má celosvětově nebezpečně se zvyšující trend, je vážným problémem i v České republice. Šíření rezistentních kmenů, vedoucí ke ztrátě účinnosti většiny dostupných antibiotik, způsobuje zvýšení morbidity, s tím spojené lékařské péče a v neposlední řadě i zvýšení mortality. Tím, že antibiotika ztrácejí svou účinnost a zároveň se nedaří objevit nové skupiny léků, lidstvo se pomalu dostává do předantibiotické éry. Tento problém vyžaduje spolupráci lékařů ze všech medicínských oborů včetně veterinářů. Nejzávažnější příčinou vzniku bakteriální rezistence je nadužívání a často nesprávné předepisování antibiotik a nedostatečná opatření v nemocničních zařízeních předcházející šíření nozokomiálních nákaz.

Zavedením surveillance bakteriální rezistence dochází k zisku informací o stavu a vývoji rezistence bakteriálních původců v jednotlivých medicínských oblastech. Výhodou je i účast ČR v EARS-Net, umožňující sledovat vývoj i porovnání s ostatními zeměmi Evropy. U každého sledování by měla být provedena i genetická analýza, sledující typ dané rezistence a podobnost multirezistentních bakterií.

Nutností je zhodnotit množství spotřebovaných antibiotických přípravků, což vede ke zjištění nevhodného předepisování a použití. Stanovením vhodných postupů pro preskripci může dojít ke snížení spotřeby ATB tam, kde to není nutné. Celkové zvýšení kvality preskripce se zlepší, pokud lékař upřesní kdy daný lék aplikovat, za jakých podmínek, v jakém časovém rozmezí, upřesněním vhodných dávek.

Antibiotika jsou většinou nevhodně předepsána v primární či ambulantní péči, vznikající bakteriální rezistence se nemusí u lehkých infekcí ihned projevit. Problém nastává v případě pozdější hospitalizace s vážnějším onemocněním a selháním účinnosti jinak účinných antibiotik. Příčinou je předepisování antibiotik i v případě například virových onemocnění a zbytečné předepisování širokospektrých, alternativních antibiotik pod vlivem marketingu farmaceutického průmyslu. V ordinacích praktických lékařů dochází často k preskripci ATB i bez provedení náležitého mikrobiologického vyšetření.

Důležitým krokem je i informovat laickou veřejnost o užívání antibiotik. Pacienti často o tomto problému nevědí a svým chováním vznik rezistence podporují. Jako rizikové chování lze označit snižování užívaných dávek, vynechání dávky, nedobráení balení ATB, užívání ATB z předešlé léčby na jiná onemocnění, naléhání na lékaře k předepsání ATB k léčbě nachlazení způsobeného viry aj.

Hlavní roli na předepisování ATB má lékař. Je velmi důležité zajistit jeho pregraduální, postgraduální a kontinuální vzdělání ohledně problematiky rezistence bakterií k antibiotikům. Při preskripci ATB by se měl řídit postupy, které upřesňují vhodné užití daného ATB. Mikrobiologické vyšetření pacienta by mělo předcházet před preskripcí ATB. Dochází tak k určení původce nemoci a zvolení vhodného specifického přípravku. Lékař by měl dále informovat pacienta o jeho vhodném užívání.

Je nutné pomocí vhodných opatření zabránit šíření rezistentních bakterií i mezi pacienty a v prostředí. Dodržováním vhodných hygienických a epidemiologických postupů dochází ke snížení počtu nozokomiálních nákaz. V případě potvrzení výskytu rezistentní bakterie u daného pacienta je nutné zajistit jeho izolaci, provést kultivační

vyšetření u pacientů na stejném oddělení, vyhrazení lékařských nástrojů, dodržování důkladné hygieny rukou po vyšetření pacienta, uvést poznámku do karty pacienta po propuštění. Zvýšená pozornost by měla být u pacientů, kteří byli dříve hospitalizováni v nemocnicích s vysokým výskytem rezistentních bakterií, nacházející se především v cizině.

6 Závěr

Jak lze pozorovat, rezistence bakterií k dostupným antibiotikům, je jedním z problémů, který ohrožuje obyvatelstvo celého světa. Neustále narůstající počet rezistentních kmenů komplikuje léčbu jindy běžných onemocnění. Nezatěžuje jen pacienty a lékaře, ale i rozpočty zdravotnictví jednotlivých států. Produkce beta-laktamáz typu ESBL patří mezi jeden z nejzávažnějších typů rezistence. Jejich výskyt se neustále zvyšuje a tento problém je nutno řešit, jelikož produkce ESBL je často spojována s rezistencí i na jiné skupiny antibiotik, než jsou beta-laktamová, což znemožňuje účinnou léčbu.

Jedním z cílů práce bylo zmapování výskytu ESBL pozitivních kmenů v Nemocnici České Budějovice, a. s. v roce 2013 a porovnání s minulými roky. Překvapivě je počet producentů ESBL za rok 2013 nižší než v předchozích dvou letech. V porovnání s jinými studiemi je to pozitivní poznatek, který lze přisuzovat správnému monitoringu antibiotickým střediskem a aplikaci cílů antibiotického programu. Tento přístup by měl být příkladem jiným nemocnicím v České republice, kde se výskyt bakterií produkujících ESBL neustále zvyšuje. Hrozba šíření ESBL producentů v komunitě v Českých Budějovicích zatím není tak velká, což dokazuje relativně nízký počet producentů mezi ambulantními pacienty za rok 2013. Důležitým úkolem je tento stav zachovat a snížit riziko šíření rezistentních kmenů v komunitě na minimum.

Závažným problémem je snížená účinnost cefalosporinových antibiotik, která jsou častou volbou při léčbě infekcí. Lékař tak většinou jedná ve smyslu nasazení ATB co nejdříve po zjištění septického stavu. Rezistence bakterií na tento typ antibiotik však komplikuje průběh onemocnění a stav pacienta se nezlepší do té doby, než jsou známy výsledky citlivosti mikroba na antibiotika, což trvá přibližně 48 hodin. Je proto na místě neustále sledovat výskyt rezistentních kmenů na jednotlivých odděleních nemocnice a provádět hygienicko-epidemiologická opatření, vedoucí k zabránění šíření nozokomiálních kmenů a v případě podezření na ESBL pozitivní kmen zvážit volbu antibiotika (karbapenem).

Důležitým krokem v případě prevence šíření rezistentních kmenů je dostatečná aplikace antibiotického programu. Závažný problém lze pozorovat v nedostatečné edukaci a přizpůsobení zdravotního personálu v této oblasti, ať již praktických lékařů, tak zdravotních sester a lékařů v nemocnicích. Významnou roli hraje zapojení antibiotických středisek, která pomáhají sledovat výskyt a šíření rezistentních kmenů. Podílí se na monitoringu spotřeby daných antibiotik a pomáhá ve výběru vhodného antibiotika. Prvořadým cílem antibiotické politiky by mělo být zabránit šíření rezistentních kmenů a nezvyšovat tak roční statistiky. Zvyšující se výskyt některých ESBL producentů řadí Českou republiku na přední příčky v evropských statistikách. Aplikace vhodných opatření by měla zabránit posunutí ČR do kritických pozic, ve kterých se nachází například Itálie, Řecko, Bulharsko dokonce i sousední Slovensko.

Možným přínosem pro zlepšení diagnostiky ESBL producentů by byl vynález technologie, která by urychlovala kultivaci a identifikaci kmenů. Tím by se snížilo množství aplikace nevhodně zvolených antibiotik a zachránila by se tak léčba, která se v posledních letech stává poslední možností.

7 Seznam použitých zdrojů

1. BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996, 558 s. ISBN 80-238-0297-6.
2. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2., přepr. vyd. Brno: Neptun, 2005, 351 s. ISBN 80-868-5000-5.
3. RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. 2. vyd. Praha : Galén, 2006. str. 329. ISBN 80-7262-324-9.
4. BENEŠ, Jiří. Počátky antibiotické éry a některé důsledky pro dnešní dobu. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. Praha: Trios, 2012, č. 5, s. 142-149.
5. MODR, Zdeněk. *Antibiotika a chemoterapeutika: stručný přehled pro praxi*. Praha : lek pharma, 1995. 125 s.
6. SIMON, C., W. STILLE a M. HEJZLAR. *Antibiotika v současné lékařské praxi*. Praha: Grada, 1998, 711 s. ISBN 80-716-9268-9.
7. HTOUTOU SEDLÁKOVÁ, M., V. HANULÍK, M. CHROMÁ, K. HRICOVÁ, M. ŠENKÝŘOVÁ a M. KOLÁŘ. Rezistence enterobakterií ke karbapenemům. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2011, č. 1, s. 12-18.
8. BENEŠ, Jiří. *Infekční lékařství*. Praha: Galén, 2009, 651 s. ISBN 978-807-2626-441.
9. KOLÁŘ, M., T. LÁTAL a P. ČERMÁK. *Klinicko - mikrobiologické podklady racionální antibiotické léčby*. Praha: TRIOS, 2002, 56 s. ISBN 80-238-9301-7.
10. URBÁŠKOVÁ, P., J. HRABÁK a H. ŽEMLIČKOVÁ. Antibiotická rezistence bakterií - hrozba selhání léčby infekcí neustále sílí. *Medical Tribune CZ* [online]. 2012, č. 2 [cit. 2013-11-02]. Dostupné z: <http://www.tribune.cz/clanek/25673-antibioticka-rezistence-bakterii-hrozba-selhani-lecby-infekci-neustale-sili>
11. HORNÍKOVÁ, Magdalena. Epidemiologie bakteriální rezistence, příčiny a mechanismy vzniku, praktický dopad. *Farmakoterapie: Aktuální pohled na problematiku bakteriální rezistence*. 2011, roč. 7, s. 3-6.
12. LOCHMANN, Otto. *Základy antimikrobní terapie*. Praha: Triton, 1994, 175 s. ISBN 80-858-7505-5.

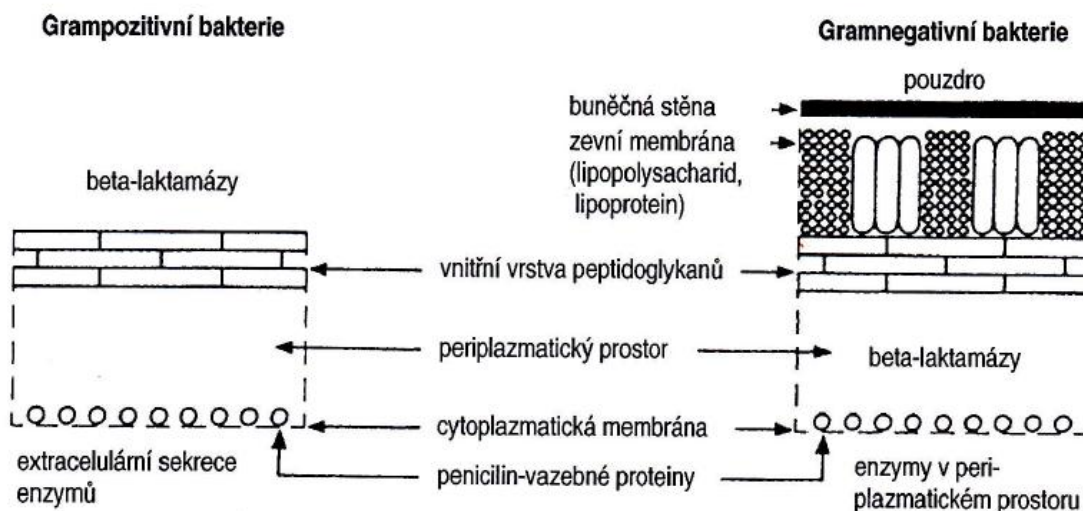
13. AMBLER, R.P. The structure of β - lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 1980, č. 289, s. 321-331.
14. BUSH, K., G. A. JACOBY a A. A. MEDEIROS. A functional classification scheme for β - lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995, roč. 39, č. 6, s. 1211-1233.
15. HTOUTOU SEDLÁKOVÁ, M. a V. HANULÍK. Rezistence gramnegativních bakterií k antimikrobiálním přípravkům. *Farmakoterapie: Aktuální pohled na problematiku bakteriální rezistence*. 2011, roč. 7, s. 12-17.
16. KOLÁŘ, M., M. CHROMÁ, K. HRICOVÁ, V. HUSIČKOVÁ, Y. LOVEČKOVÁ, P. RYBNÍKÁŘOVÁ, E. CHMELAŘOVÁ a N. BARTONÍKOVÁ. Prevalence ESBL-pozitivních enterobakterií ve velkých moravských nemocnicích. *Klinická Mikrobiologie a Infekční Lékařství*. 2010, roč. 16, č. 5, 152 - 157.
17. HANULÍK, Vojtěch. Rezistence grampozitivních bakterií k antimikrobiálním přípravkům. *Farmakoterapie: Aktuální pohled na problematiku bakteriální rezistence*. 2011, roč. 7, s. 7-11.
18. PODSTATOVÁ, Renata a Rastislav MAĎAR. *Protiepidemická opatření při výskytu gramnegativních tyčinek v nemocničním prostředí*. Banská Bystrica: Agentúra DUMAS, 2005. ISBN 80-968999-5-3.
19. VOTAVA, Miroslav et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902-8966-5.
20. KOLÁŘ, Milan. Bakteriální rezistence k antibiotikům - vznik, šíření a možnosti prevence. *Nozokomiálne nákazy*. Zvolen: MEDISTAR, 2009, roč. 8, č. 3, s. 22-30.
21. HRABÁK, J., E. BÉBROVÁ, O. NYČ a M. FRIDRICHOVÁ. Záchyt kmene *Serratia marcescens* současně produkujícího metalo – β – laktamázu (MBL), širokospektrou β – laktamázu (ESBL) a dvě β – laktamázy typu AmpC ve FN Motol. *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie*. 2009, roč. 18, č. 4, s. 139-141.
22. VOTAVA, Miroslav et al. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010, 495 s. ISBN 978-80-86850-04-7.

23. BIOMÉRIEUX INC. *BacT/ALERT 3D: User Manual*. Durham, 2010. Dostupné z: http://www.frankshospitalworkshop.com/equipment/automated_analyzer_user_manuals.html
24. HB&L UROQUATTRO. *BioVendor: Laboratorní medicína* [online]. 2013 [cit. 2013-11-21]. Dostupné z: <http://eshop.biovendor.cz/hb-1-tm-uroquattro/p200.SI%20190.300/#tab=popis>
25. ISENBERG, Henry D. *Clinical microbiology procedures handbook*. 2. vyd. Washington: American Society for Microbiology, 2007, 1 sv. (různé stránkování). ISBN 155581038112.
26. Products: VITEK MS. *BioMérieux* [online]. c 1996 - 2013 [cit. 2013-12-12]. Dostupné z: http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?open=CNL_CLN_PRD&doc=CNL_CLN_PRD_G_PRD_CLN_72&pubparams.sform=1&lang=en
27. HRABÁK, J., V. VANIŠ, T. BERGEROVÁ a P. URBÁŠKOVÁ. Průkaz beta-laktamáz širokého spektra (ESBL) a typu AmpC u enterobakterií. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*. Praha: Státní zdravotní ústav, 2007, roč. 16, č. 1, s. 31-36.
28. EUCAST European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST definitions of clinical breakpoints and epidemiological cut-off values (online). Dostupné na <http://www.srga.org/Eucastwt/eucastdefinitions.htm>
29. EUCAST. Determination of antimicrobial susceptibility test breakpoints. EUCAST Definitive Document E.DEF 2.1. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6: 570-572. Dostupný na: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/4ESCMID_Library/3Publications/EUCAST_Documents/Publications/E_Def_2_1_08_2000.pdf
30. *βLACTA test*. Marnes-la-Coquette, France, 2012. Dostupné z: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/68250_881101_CZ.pdf

31. SCICLUNA, EA., J. HAIDER, MA. BORG a P. CUSCHIERI. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Maltese hospitalized patients. *Journal of Hospital Infection* [online]. 2007, č. 65, s. 86-88 [cit. 2014-03-04]. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195670106003690>
32. KO, KS. et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated in Korean hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [online]. 2008, č. 61, s. 453-459 [cit. 2014-03-04]. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889308001624>
33. KOLÁŘ, M. Možnosti řešení problému rezistence bakterií k antibiotikům. *Farmakoterapie: Aktuální pohled na problematiku bakteriální rezistence*. 2011, roč. 7, s. 28-30.
34. KHANFAR, HS, KM BINDAYNA, AC SENOK a GA BOTTA. Extended spectrum beta - lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: trends in the hospital and community settings. *Journal of Infection in Developing Countries*. 2009, roč. 4, č. 3, s. 295-299.
35. Antimicrobial resistance interactive database: EARS-Net: Maps. *European Centre for Disease Prevention and Control* [online]. 2005-2014 [cit. 2014-03-09]. Dostupné z: <http://www.ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx>
36. HRABÁK, J. a H. ŽEMLIČKOVÁ. Výskyt multirezistentních gramnegativních bakterií v českých nemocnicích: upozornění na problém šíření bakterií produkujících transferabilní karbapenemázy. In: *Státní zdravotní ústav* [online]. 2011 [cit. 2014-03-11]. Dostupné z:
http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/doporucene_postupy/surveillance_g/aktivni_surveillance_multirezistentnich_gramnegativnich_bakterii.pdf

8 Přílohy

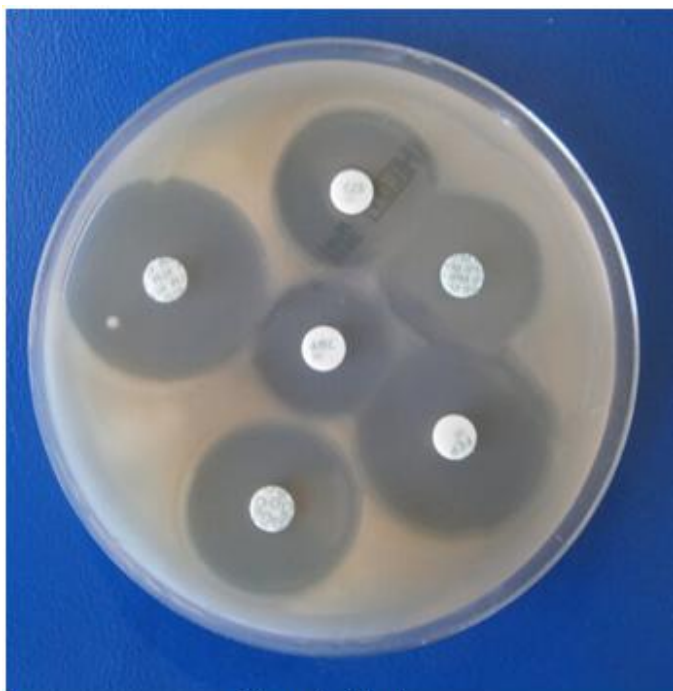
Příloha 1 Struktura pouzdra, buněčné stěny a cytoplasmatické membrány grampozitivních a gramnegativních bakterií (7)



Příloha 2 Rozdělení beta-laktamů (2)

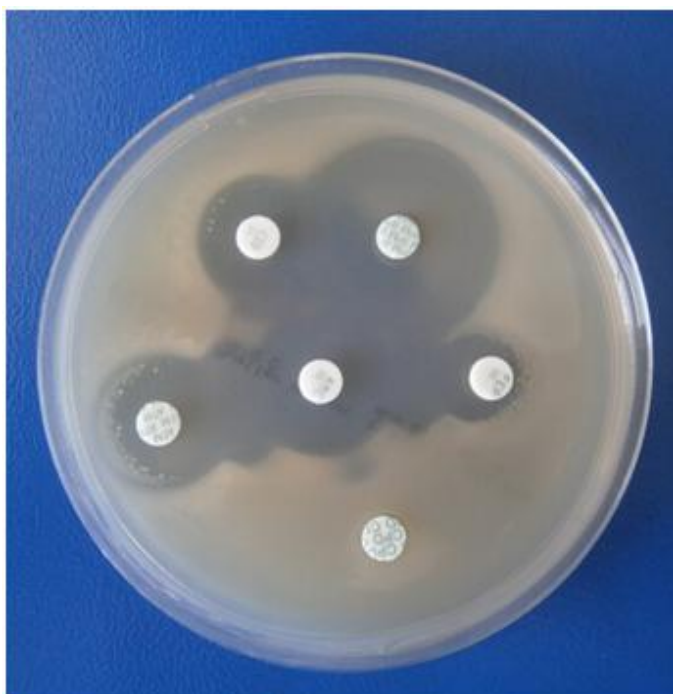
Rozdělení beta-laktamů	
peniciliny	
acidolabilní	benzylpenicilin (penicilin G)
acidostabilní	fenoxyethylpenicilin (penicilin V)
odolné vůči stafylokokové penicilinase	oxacilin
aminopeniciliny	ampicilin, amoxicilin, co-ampicilin, co-amoxicilin
ureidopeniciliny	azlocilin, piperacilin, co-piperacilin
karboxypeniciliny	co-ticarcilin
cefalosporiny	
I. generace	inj.: cefalotin, cefazolin p.o.: cefalexin, cefadroxil, cefaclor
II. generace	inj.: cefuroxim p.o.: cefuroxim axetil, cefprozil
III. generace	inj.: cefotaxim, ceftriaxon, ceftazidim, cefoperazon, co-cefoperazon p.o.: cefixim
IV. generace	inj.: cefepim p.o.:-
monobaktamy	aztreonam
karbapenemy	imipenem/cilastatin, meropenem

Příloha 3 Negativní produkce ESBL při DDST



Vlastní zdroj

Příloha 4 Pozitivní produkce ESBL při DDST



Vlastní zdroj

Příloha 5 Výskyt ESBL producentů za rok 2013 dle měsíce

Producent	Měsíc												celkem
	leden	únor	březen	duben	květen	červen	červenec	srpen	září	říjen	listopad	prosinec	
<i>Citrobacter freundii</i>	62	29	40	45	38	50	42	36	35	38	21	15	451
<i>Enterobacter cloacae</i>	92	69	52	86	109	108	94	144	98	115	107	104	1178
<i>Escherichia coli</i>	1111	908	1050	1205	1187	1012	1153	1451	1136	1157	1127	1096	13593
<i>Klebsiella oxytoca</i>	34	44	40	78	50	55	62	67	50	46	74	44	644
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	193	174	132	133	167	144	207	256	213	233	258	190	2300
<i>Proteus mirabilis</i>	181	161	200	188	159	171	144	227	191	175	203	187	2187
celkem	1673	1385	1514	1735	1710	1540	1702	2181	1723	1764	1790	1636	20353