

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**  
**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**  
Ústav mikrobiologie

**KLINICKÝ VÝZNAM ŠIROKOSPEKTRÝCH BETA-LAKTAMÁZ**  
Doktorská disertační práce

MUDr. Miroslava Htoutou Sedláková  
Olomouc, 2015

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Milanu Kolářovi, Ph.D. za profesionální, vstřícné, laskavé a inspirativní vedení v průběhu celého doktorského studia.

Poděkování patří též prof. Dr. med. Arne C. Rodloffovi za umožnění zpracování části disertační práce na Ústavu lékařské mikrobiologie Univerzity Lipsko (Institut für medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie, Universität Leipzig).

Nemenší dík patří i mým kolegyním Mgr. Vendule Pudové, Ph.D., Ing. Magdaleně Röderové, Ph.D. a dalším, kteří se jakýmkoli způsobem podíleli na realizaci mé disertační práce.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za poskytnutí klidného zázemí pro vědeckou činnost a psaní.

### **Čestné prohlášení**

Čestně prohlašuji, že disertační práci s názvem „Klinický význam širokospektrých beta-laktamáz“ jsem vypracovala samostatně. Literární zdroje, ze kterých jsem čerpala, a všechny podklady uvádím v přiloženém seznamu literatury.

V Olomouci dne 31. 8. 2015

.....  
MUDr. Miroslava Htoutou Sedláková

# OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
1.1. Beta-laktamová antibiotika .....	8
1.1.1. Peniciliny .....	10
1.1.2. Cefalosporiny .....	11
1.1.3. Monobaktamy .....	12
1.1.4. Karbapenemy .....	12
1.1.5. Nová beta-laktamová antibiotika .....	12
1.1.5.1. Ceftarolin .....	12
1.1.5.2. Ceftobiprol .....	13
1.1.5.3. Ceftolozan-tazobaktam .....	13
1.1.5.4. Ceftazidim-avibaktam .....	13
1.2. Rezistence k beta-laktamovým antibiotikům .....	14
1.2.1. Širokospektré beta-laktamázy typu ESBL a AmpC .....	17
1.2.2. Rezistence ke karbapenemům .....	19
1.2.3. Karbapenemázy .....	19
1.2.3.1. Rozšíření karbapenemáz ve světě .....	20
1.2.3.2. Rozšíření karbapenemáz v Evropě .....	21
1.2.3.3. Rozšíření karbapenemáz v České republice .....	22
1.2.4. Interpretace výsledků antibiogramu .....	22
1.2.4.1. Interpretace antibiogramu při prokázané produkci ESBL či AmpC .....	22
1.2.4.2. Interpretace antibiogramu při prokázané produkci karbapenemáz .....	23
1.2.5. Klinický význam širokospektrých beta-laktamáz .....	24
<b>2. CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>28</b>
3.1. Definice souborů testovaných bakteriálních kmenů .....	28
3.1.1. Soubor bakteriálních kmenů s produkcí širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC ke stanovení senzitivity testovaných fenotypových metod .....	28
3.1.2. Soubor bakteriálních kmenů s produkcí serinových karbapenemáz a metallo-beta-laktamáz ke stanovení senzitivity testovaných fenotypových metod .....	28

3.1.3. Soubor bakteriálních kmenů z gastrointestinálního traktu u komunitních a hospitalizovaných pacientů .....	28
3.1.4. Soubor bakteriálních kmenů z gastrointestinálního traktu u hemato-onkologických pacientů .....	28
3.1.5. Soubor původců nozokomiálních pneumonií u pacientů v intenzivní péči se zaměřením na ESBL- a AmpC-pozitivní enterobakterie .....	29
3.1.6. Soubor enterobakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy v prostředí jednotek intenzivní péče .....	29
3.1.7. Soubor enterobakterií rezistentních ke karbapenemům ve Fakultní nemocnici Olomouc .....	30
3.1.8. Soubor kmenů <i>Pseudomonas aeruginosa</i> rezistentních ke karbapenemům ve Fakultní nemocnici Olomouc a Vojenské nemocnici Olomouc .....	30
3.1.9. Soubor bakteriálních kmenů pro hodnocení vlivu spotřeby beta-laktamových antibiotik na rezistenci enterobakterií .....	30
3.1.10. Soubor bakteriálních kmenů pro hodnocení vlivu spotřeby karbapenemů na rezistenci enterobakterií a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> k meropenemu .....	30
3.2. Identifikace izolátů .....	31
3.3. Stanovení citlivosti k antibiotikům .....	31
3.4. Fenotypové metody průkazu produkce širokospektrých beta-laktamáz .....	31
3.4.1. Fenotypové metody průkazu produkce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC .....	31
3.4.2. Fenotypové metody pro detekci serinových karbapenemáz a metalo-beta-laktamáz .....	37
3.5. Genetické určení širokospektrých beta-laktamáz .....	45
3.5.1. Genetické určení širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC .....	45
3.5.2. Genetické určení serinových karbapenemáz a metalo-beta-laktamáz .....	45
3.5.3. Stanovení podobnosti izolátů pomocí srovnání polymorfismu délky štěpných fragmentů .....	45
3.6. Hodnocení selekčního tlaku .....	46
3.6.1. Stanovení spotřeby antibiotik .....	46
3.6.2. Hodnocení vztahu mezi spotřebou antibiotik a bakteriální rezistencí .....	46
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>47</b>
4.1. Možnosti fenotypových metod pro detekci širokospektrých beta-laktamáz .....	47

4.1.1. Stanovení senzitivity fenotypových metod pro detekci širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC .....	47
4.1.2. Stanovení senzitivity fenotypových metod pro detekci karbapenemáz ....	49
4.2. Analýza enterobakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC .....	51
4.2.1. Gastrointestinální nosičství ESBL- a AmpC- pozitivních enterobakterií u komunitních a hospitalizovaných pacientů .....	51
4.2.2. Gastrointestinální nosičství ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií u hemato-onkologických pacientů .....	52
4.2.3. Etiologická agens nozokomiálních pneumonií a jejich rezistence k antibiotikům se zaměřením na enterobakterie produkující širokospektré beta-laktamázy .....	54
4.2.4. Výskyt enterobakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy v prostředí jednotek intenzivní péče .....	57
4.3. Analýza rezistence ke karbapenemům .....	59
4.3.1. Četnost enterobakterií rezistentních ke karbapenemům ve Fakultní nemocnici Olomouc .....	59
4.3.2. Výskyt kmenů <i>Pseudomonas aeruginosa</i> s rezistencí ke karbapenemům ve Fakultní nemocnici Olomouc a Vojenské nemocnici Olomouc .....	62
4.4. Vliv spotřeby antibiotik na vývoj rezistence .....	62
4.4.1. Vliv selekčního tlaku beta-laktamových antibiotik na rezistenci u vybraných enterobakterií .....	62
4.4.2. Vliv selekčního tlaku karbapenemů na bakteriální rezistenci .....	68
<b>5. DISKUSE .....</b>	<b>71</b>
5.1. Možnosti fenotypových metod pro detekci širokospektrých beta-laktamáz .....	71
5.1.1. Senzitivita fenotypových metod pro detekci širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC .....	71
5.1.2. Senzitivita fenotypových metod pro detekci serinových karbapenemáz a metallo-beta-laktamáz .....	72
5.2. Výskyt a analýza enterobakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC .....	74
5.2.1. Gastrointestinální nosičství ESBL- a AmpC- pozitivních enterobakterií u komunitních a hospitalizovaných pacientů .....	74
5.2.2. Gastrointestinální nosičství u hemato-onkologických pacientů .....	76

5.2.3. Etiologická agens nozokomiálních pneumonií a jejich rezistence k antibiotikům se zaměřením na enterobakterie produkující širokospektré beta-laktamázy .....	77
5.2.4. Výskyt enterobakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy v prostředí jednotek intenzivní péče .....	79
5.3. Analýza rezistence ke karbapenemům .....	80
5.3.1. Četnost a analýza enterobakterií rezistentních ke karbapenemům ve Fakultní nemocnici Olomouc .....	80
5.3.2. Četnost kmenů <i>Pseudomonas aeruginosa</i> s rezistencí ke karbapenemům ve Fakultní nemocnici Olomouc a Vojenské nemocnici Olomouc .....	82
5.4. Vliv spotřeby antibiotik na vývoj rezistence .....	82
5.4.1. Vliv selekčního tlaku beta-laktamových antibiotik na rezistenci u vybraných enterobakterií .....	82
5.4.2. Vliv selekčního tlaku karbapenemů na bakteriální rezistenci .....	86
<b>6. ZÁVĚRY .....</b>	<b>87</b>
<b>7. SOUHRN .....</b>	<b>89</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>92</b>
<b>9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>95</b>
<b>10. PUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY .....</b>	<b>110</b>
10.1. Publikace v časopisech s impakt faktorem .....	110
10.2. Publikace v recenzovaných časopisech bez impakt faktoru .....	110
10.3. Přednášky a postery s abstraktem .....	111
<b>11. SEZNAM TABULEK, GRAFŮ, OBRÁZKŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>114</b>
11.1. Seznam tabulek .....	114
11.2. Seznam grafů .....	116
11.3. Seznam obrázků .....	116
11.4. Seznam zkratk .....	118

## 1. ÚVOD

Bakteriální infekce byly, jsou a s velkou pravděpodobností i budou významným problémem v jakémkoli odvětví humánní medicíny. Vývoj antibiotik od čtyřicátých let dvacátého století poskytl lékařům účinnou zbraň k boji proti bakteriálním infekcím, díky které byly zachráněny miliony lidských životů. Přesto jsou infekční choroby celosvětově v současnosti jednou z nejčastějších příčin mortality. Infekce dolních cest dýchacích stojí na žebříčku příčin úmrtí na čtvrtém místě a ročně umírají na tyto infekce přibližně tři milióny lidí na světě. Na otázku, proč se přes pokroky ve vývoji antibiotik nedaří vymýtit bakteriální infekce, lze odpovědět jedním slovem: rezistence.

Celosvětově je dokumentováno vysoké procento rezistentních bakterií, které běžně způsobují infekce jako sepse, infekce v místě operačního výkonu, infekce urogenitálního systému či pneumonie. Rezistence bakterií zvyšuje morbiditu pacientů, prodlužuje jejich pobyt v nemocnici, prodražuje léčbu a zvyšuje riziko úmrtí. Objevují se nové mechanismy rezistence, které se celosvětově šíří a které ohrožují možnosti antibiotické léčby. Bez efektivní protiinfekční terapie se mohou dnes zcela běžné a relativně bezpečné lékařské procedury stát v budoucnu velmi riskantními zákroky. Orgánové transplantace, léčba nádorových onemocnění a rozsáhlé chirurgické operace by nebyly možné bez účinné antimikrobní profylaxe a léčby. Nelze vyloučit, že antibiotická éra, která začala před necelými sto lety objevem penicilinu, se blíží svému konci. Bez včasného a efektivního zásahu v podobě obnovení účinnosti antibiotik nebo nahrazení antibiotik jinými způsoby léčby infekčních onemocnění mohou dosud zcela běžně léčitelné infekce opět zabíjet.

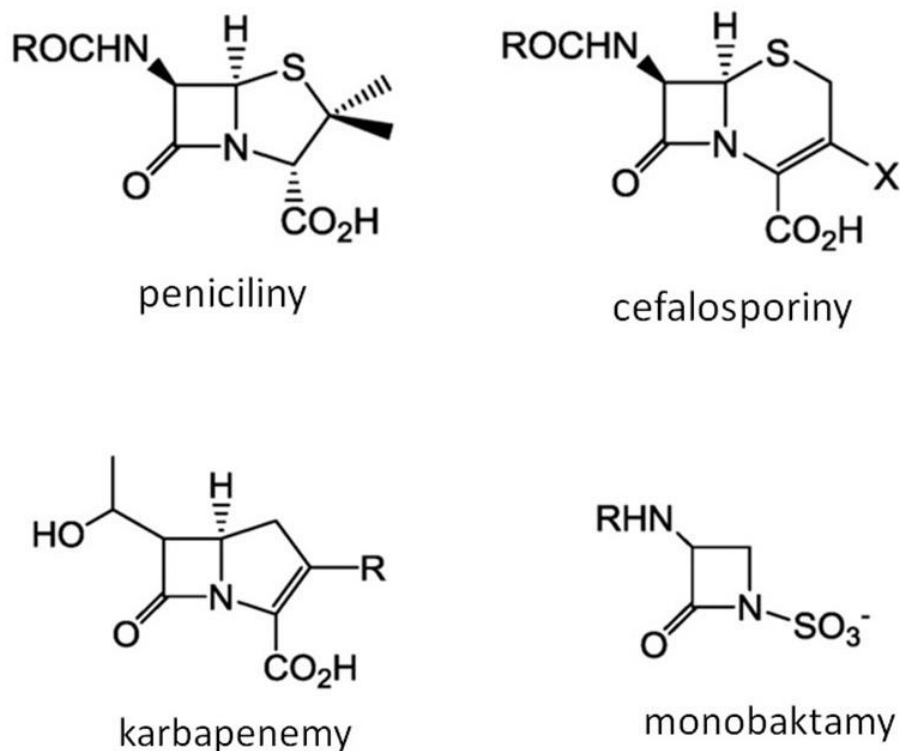
Předložená disertační práce se zabývá rezistencí klinicky významných gramnegativních bakterií k beta-laktamovým antibiotikům, popisuje výskyt nejdůležitějších širokospektrých beta-laktamáz a možnosti jejich přesné a rychlé fenotypové detekce v mikrobiologické praxi.

### 1.1. Beta-laktamová antibiotika

Beta-laktamová antibiotika jsou širokou a různorodou skupinou látek, které mají společnou chemickou strukturu, a to beta-laktamový kruh. Tradičně se beta-laktamová antibiotika rozdělují na peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy. Jednotlivé skupiny se liší složením dalších struktur navázaných na beta-laktamový kruh. Příklady chemických struktur beta-laktamových antibiotik uvádí obrázek 1.



**Obrázek 1.** Beta-laktamová antibiotika



Mechanismus účinku spočívá v inhibici tvorby buněčné stěny. Vazba beta-laktamového antibiotika na enzymy zvané PBP (z angl. *Penicillin-Binding Proteins*, proteiny vázající penicilin) způsobí zastavení katalytických reakcí pro tvorbu peptidových a glycinových můstků v peptidoglykanu a zároveň také uvolnění autolytických enzymů, vyúsťující v smrt buňky. Beta-laktamy jsou tedy baktericidní antibiotika působící na množící se buňky, která mohou být s úspěchem nasazena na progredující infekce, včetně septických stavů. Z mechanismu účinku také vyplývá selektivní toxicita vůči prokaryontním buňkám (eukaryontní buňky peptidoglykan neobsahují), takže podávání beta-laktamů lze považovat za bezpečné a vhodné i pro těhotné ženy či kojence.

Beta-laktamová antibiotika jsou obecně velmi oblíbená pro svůj rychlý baktericidní účinek, nízkou toxicitu, široké terapeutické rozmezí, malé množství lékových interakcí, výhodné farmakokinetické vlastnosti a relativně nízkou cenu. Nevýhodou u nich bývají alergické reakce, krátký dávkovací interval a snadný vznik rezistence.

Spektrum beta-laktamových antibiotik je velmi široké a liší se dle jednotlivých skupin přípravků. Obecně lze říci, že působí na grampozitivní i gramnegativní bakterie, včetně anaerobních. Nejsou účinné na mykobakterie, intracelulární bakterie, mykoplazmata a ureaplazmata.

Z farmakokinetických vlastností je nutné zmínit se o závislosti účinku na čase. Beta-laktamy se vylučují ledvinami velmi rychle, biologický poločas u většiny přípravků je pouze 30-60 minut a z toho vyplývá nutnost častého podávání těchto přípravků (každých 6 až 8 hodin). Výjimkou je ceftarolin, který se podává dvakrát denně, a ceftriaxon, který je možné podávat pouze jednou denně. Pro účinnost antibiotika je nutné udržet jeho hladinu v krvi nad hodnotou MIC (z angl. *Minimal Inhibition Concentration*, minimální inhibiční koncentrace) co nejdéle během dávkovacího intervalu. U imunokompetentních osob je dostačující udržet hladinu antibiotika nad hodnotou MIC minimálně 40 % dávkovacího intervalu, ale u pacientů v sepsi je optimální udržet hladinu antibiotika nad hodnotou MIC minimálně 90 % dávkovacího intervalu (1,2). Z tohoto důvodu je preferována prodloužená infúze (3,4).

Vzhledem k polární molekule beta-laktamů se tyto přípravky omezeně vstřebávají z gastrointestinálního traktu, zůstávají v podstatě jen v extracelulární tekutině a jen minimálně pronikají do buněk.

Z nežádoucích účinků lze zmínit na prvním místě alergické reakce. U beta-laktamových antibiotik vznikají různé typy alergií od urtiky, přes lékovou horečku, kontaktní dermatitidu až po anafylaktický šok. Dále se uplatňují také pseudoalergie jako exantém u infekční mononukleózy či šesté nemoci, popř. Hoigného syndrom u prokain-penicilinu. Alergie mohou být u beta-laktamů zkřížené mezi peniciliny a cefalosporiny I. generace, jejichž zástupci mají podobné postranní řetězce navázané na beta-laktamový kruh. Zkřížené alergické reakce mezi peniciliny a vyššími generacemi cefalosporinů se vyskytují jen výjimečně. Z velmi vzácných nežádoucích účinků je nezbytné vyjmenovat také nefrotoxicitu, neurotoxicitu, trombocytopenii a v neposlední řadě i dysmikrobní projevy od postantibiotického průjmu až po pseudomembranózní kolitidu.

### **1.1.1. Peniciliny**

Prvním penicilinem a moderním antibiotikem vůbec byl penicilin G (benzylpenicilin), popsán v roce 1928 Alexandrem Flemingem a izolovaný o dvanáct let později H. W. Floreyem a E. B. Chainem. Penicilin G byl pro svůj razantní baktericidní účinek a netoxičnost považován za zázračný lék, nicméně kvůli úzkému spektru, nemožnosti orálního použití a velmi krátkému biologickému poločasu byly vyvinuty další skupiny – peniciliny s prodlouženým účinkem (prokain-penicilin, benzatin-penicilin), orální peniciliny (penicilin V, penamecilin), peniciliny stabilní vůči stafylokokové beta-laktamáze (meticilin, oxacilin), peniciliny s rozšířeným spektrem (aminopeniciliny) a protipseudomonádové peniciliny (piperacilin).

Spektrum základních penicilinů zahrnuje streptokoky, včetně pneumokoků, enterokoky, grampozitivní tyčky (korynebakterie, listerie, *Bacillus anthracis*), neisserie, spirochety a anaerobní bakterie, včetně klostridií a aktinomycet. Aminopeniciliny jsou účinné navíc i proti některým gramnegativním bakteriím (*Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp.). Mnoho bakteriálních kmenů si však vyvinulo sekundární rezistenci vůči aminopenicilinům produkcí beta-laktamáz, což vedlo k objevení inhibitorů beta-laktamáz (kyselina klavulanová, sulbaktam, tazobaktam a avibaktam) a jejich použití v kombinaci s těmito antibiotiky (amoxicilin s kyselinou klavulanovou, ampicilin se sulbaktamem). Díky tomu jsou tato kombinovaná antibiotika stále účinná i proti producentům řady beta-laktamáz.

### 1.1.2. Cefalosporiny

Cefalosporiny působí, podobně jako peniciliny, na grampozitivní a gramnegativní bakterie, některé anaeroby (peptostreptokoky, aktinomycety) a spirochety. Na rozdíl od penicilinů nejsou účinné proti listeriím a enterokokům. Cefalosporinová antibiotika se podle chronologie rozdělují do pěti generací. Cefalosporiny I. generace (cefalotin, cefazolin, cefalexin, cefaclor, cefadroxil) jsou účinné na grampozitivní bakterie, zejména na streptokoky a stafylokoky. Proti stafylokokům však působí o něco hůře než protistafylokokové peniciliny. Cefalosporiny II. generace (cefuroxim, cefprozil, cefoxitin) mají rozšířené spektrum i na gramnegativní bakterie – působí proti *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria* sp. a také proti některým enterobakteriím. Jsou stabilnější vůči bakteriálním beta-laktamázám, jejich účinek lze přirovnat ke kombinovaným aminopenicilinům. Cefalosporiny III. generace (cefoperazon, ceftazidim, cefotaxim, ceftriaxon) jsou účinné především na gramnegativní bakterie, některé přípravky (ceftazidim, cefoperazon) působí dokonce i proti pseudomonádám. Cefalosporiny IV. generace (cefepim) mají nejširší spektrum aktivity, působí na gramnegativní bakterie včetně *Pseudomonas aeruginosa* a ve srovnání s třetí generací lépe na grampozitivní bakterie. Nejnovější skupinou jsou cefalosporiny V. generace, do které se zařazují ceftarolin, ceftobiprol a ceftolozan. Podrobnější charakteristika jednotlivých přípravků V. generace je uvedena v kapitole 1.1.5. s názvem Nová beta-laktamová antibiotika.

Vzhledem k tomu, že cefalosporinová antibiotika jsou velmi různorodou skupinou zahrnující celou řadu přípravků, lze s výhodou vybírat jednotlivá léčiva podle spektra účinku, způsobu podání a farmakologických vlastností. Například cefoperazon, který se vylučuje ze 70 % žlučí, lze s výhodou použít u biliárních infekcí nebo u pacientů s renální insuficiencí.

Ceftazidim, cefotaxim a ceftriaxon dobře pronikají do mozkomíšního moku a tím jsou vhodné pro léčbu bakteriálních meningitid.

### **1.1.3. Monobaktamy**

Jediným zástupcem této skupiny je aztreonam. Působí pouze na gramnegativní mikroby, účinek proti pseudomonádám je však nižší než u ceftazidimu či karbapenemů. Nevstřebává se z trávicího traktu a neproniká do mozkomíšního moku. V současnosti není v České republice běžně dostupný pro terapii.

### **1.1.4. Karbapenemy**

Karbapenemy vykazují nejširší spektrum účinnosti, působí proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, anaerobům včetně *Bacteroides fragilis*, nejsou však účinné na meticilin-rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus* (MRSA), a *Stenotrophomonas maltophilia*. Podávají se především u život ohrožujících infekcí polymikrobiální etiologie. V České republice jsou registrovány v současnosti tři přípravky – imipenem (působí lépe na grampozitivní koky), meropenem (je účinnější na gramnegativní bakterie) a ertapenem (nepůsobí na gramnegativní nefermentující tyčky).

### **1.1.5. Nová beta-laktamová antibiotika**

#### **1.1.5.1. Ceftarolin**

Ceftarolin je širokospektrý cefalosporin, který byl schválen pro léčbu akutních bakteriálních infekcí kůže, měkkých tkání a komunitních pneumonií. Do spektra jeho účinku se zařazují grampozitivní koky, včetně multirezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* a kmenů *Streptococcus pneumoniae* rezistentních k penicilinu. Z gramnegativních bakterií je ceftarolin účinný proti respiračním patogenům jako jsou *Moraxella catarrhalis* a *Haemophilus influenzae* (včetně kmenů produkujících beta-laktamázy) a proti dalším gramnegativním patogenům s výjimkou ESBL- či AmpC-pozitivních enterobakterií a většiny nefermentujících gramnegativních tyček. Z klinických studií vyplývá, že intravenózní podávání ceftarolinu v dávkování 600 mg každých 12 hodin má v léčbě komplikovaných infekcí kůže a měkkých tkání podobný efekt jako kombinace vankomycinu s aztreonamem (5). Rovněž léčba hospitalizovaných pacientů s komunitní pneumonií ceftarolinem vykazovala podobný účinek jako léčba ceftriaxonem (6). Ceftarolin díky svému širokému spektru účinku může být s výhodou nasazen jako monoterapie u polymikrobiálních komplikovaných infekcí kůže, měkkých tkání a komunitních pneumonií.

### **1.1.5.2. Ceftobiprol**

Ceftobiprol je nový cefalosporin řadící se do V. generace. Je stabilní vůči beta-laktamázám produkovaným grampozitivními bakteriemi a má vysokou afinitu k PBP, včetně PBP2a (přítomným u MRSA) a PBP2x (přítomným u penicilin-rezistentních kmenů *Streptococcus pneumoniae*). Uvedené vlastnosti rozšiřují spektrum ve srovnání se staršími beta-laktamy a umožňují využít jeho potenciál při léčbě komunitních i nozokomiálních pneumonií, komplikovaných infekcí kůže a měkkých tkání, včetně diabetické nohy. Jeho výjimečnost spočívá v účinku proti MRSA, penicilin-rezistentním kmenům *Streptococcus pneumoniae* a také proti citlivým enterobakteriím a kmenům *Pseudomonas aeruginosa*. Aktivita ceftobiprolu nepokrývá enterobakterie produkující širokospektré beta-laktamázy a některé další patogeny jako jsou *Enterococcus faecium* nebo *Acinetobacter baumannii*. Obecně je velmi dobře tolerován, z vedlejších účinků byly popsány pouze cefalea a neusea. Ceftobiprol reprezentuje slibnou alternativu pro terapii mono- a polymikrobních infekcí způsobených multirezistentními grampozitivními a citlivými gramnegativními patogeny.

### **1.1.5.3. Ceftolozan-tazobaktam**

Ceftolozan je nový cefalosporin, který je v kombinaci s tazobaktamem indikován pro léčbu komplikovaných močových, intraabdominálních infekcí a nemocničních pneumonií u ventilovaných pacientů. Chemická struktura ceftolozanu je podobná ceftazidimu s modifikovaným postranním řetězcem, což potencuje antipseudomonádovou aktivitu. Ceftolozan vykazuje zvýšenou aktivitu proti gramnegativním tyčinkám, včetně producentů klasických beta-laktamáz (TEM-1, SHV-1), ale podobně jako ceftazidim a ceftriaxon je rozkládán širokospektrými beta-laktamázi typu ESBL. Nicméně v kombinaci s tazobaktamem je účinný i proti ESBL-producentům a také proti anaerobním bakteriím. Jeho antipseudomonádová aktivita je založena na potenciálu překonat různé mechanismy rezistence, jako jsou efluxní pumpy, snížená permeabilita buněčné stěny a modifikace PBP.

### **1.1.5.4. Ceftazidim-avibaktam**

Avibaktam je semisyntetický, non-beta-laktamový inhibitor beta-laktamáz, který je aktivní proti enzymům typu ESBL, AmpC a také některým serinovým beta-laktamázám třídy D. Přídavek avibaktamu k ceftazidimu zvyšuje jeho aktivitu proti enterobakteriím a kmenům *Pseudomonas aeruginosa*, avšak nezlepšuje jeho působení proti *Acinetobacter* sp., *Burkholderia cepacia* komplex a většině anaerobních gramnegativních tyček. Studie

provedené na animálních modelech demonstrují, že ceftazidim–avibaktam by mohl být indikován v případech pneumonií, pyelonefritid, meningitid a sepsí způsobených ceftazidim-rezistentními gramnegativními bakteriemi. Limitované klinické studie naznačují, že ceftazidim–avibaktam (v kombinaci s metronidazolem) je stejně účinný jako karbapenem při léčbě intraabdominálních infekcí (7). Rovněž při léčbě komplikovaných uroinfekcí je ceftazidim-avibaktam srovnatelný s účinky imipenemu (8). Stejně jako ceftolozan-tazobaktam je určen pro léčbu infekcí s očekávanou nebo prokázanou multirezistentní gramnegativní etiologií (ESBL- nebo AmpC-pozitivními enterobakteriemi a multirezistentními kmeny *Pseudomonas aeruginosa*).

## 1.2. Rezistence k beta-laktamovým antibiotikům

Rezistence k beta-laktamovým antibiotikům byla popsána již dva roky před podáním prvního antimikrobního přípravku, penicilinu G, prvnímu pacientovi (9). Již Alexander Fleming varoval ve své přednášce při udílení Nobelovy ceny v roce 1945 před rezistencí k antibiotikům, kterou si bakterie umí vytvořit (10). V současnosti je problém zvyšující se odolnosti k antibiotikům natolik závažný, že je považován za jedno z největších globálních rizik přímo ohrožující stabilitu světového zdravotnického systému, a to již v horizontu následujících deseti let (11).

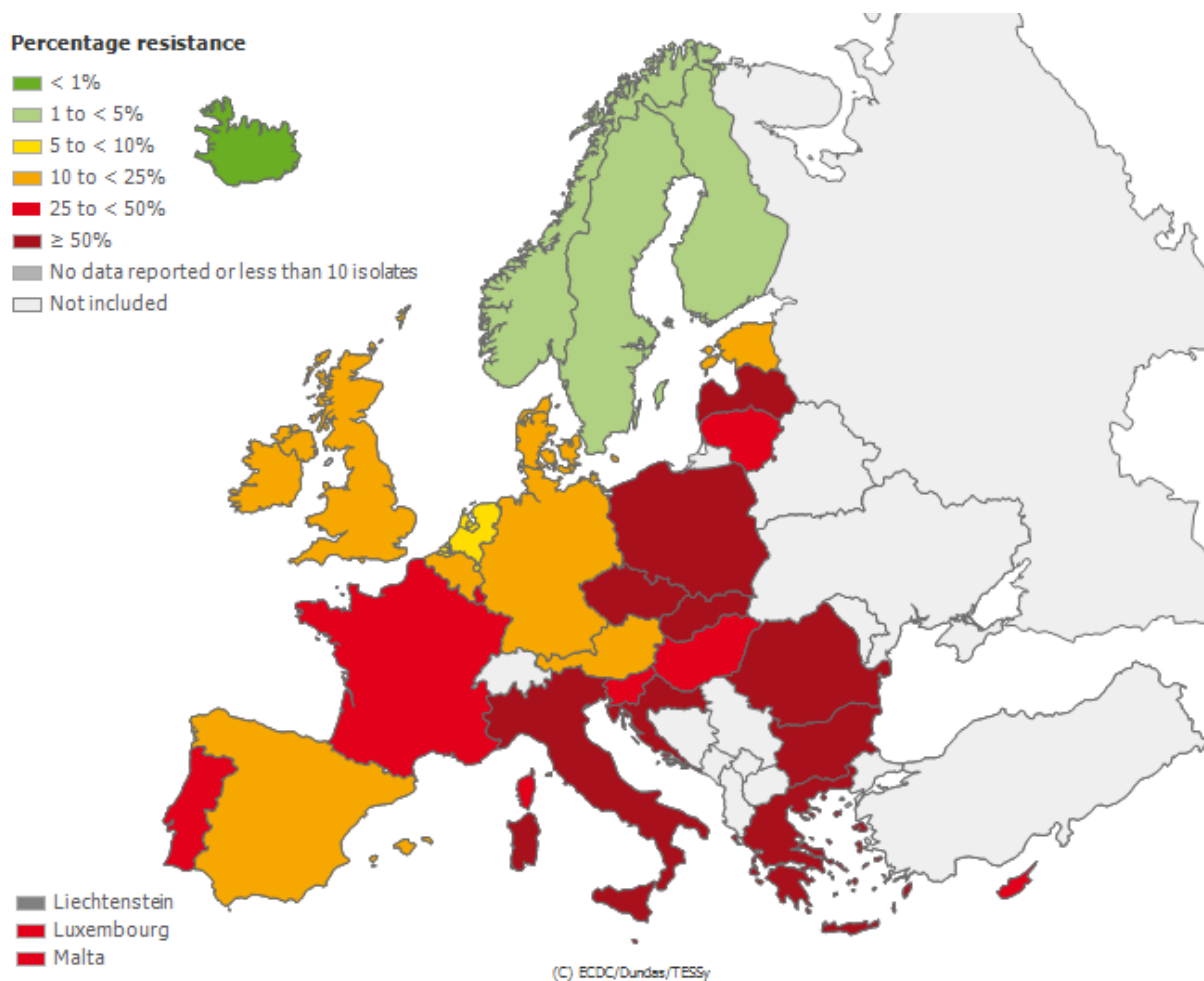
Jak vypadá rezistence k beta-laktamovým antibiotikům v současnosti, můžeme posoudit podle údajů uvedených v databázi EARS-Net (surveillance bakteriální rezistence invazivních bakteriálních izolátů v Evropě) (12). Jeden z nejčastějších nemocničních bakteriálních patogenů *Klebsiella pneumoniae* vykazuje rezistenci k cefalosporinům III. generace v roce 2013 u izolátů z krve přes 50 % v celé řadě evropských zemí, včetně České republiky (Obrázek 2). V případě *Pseudomonas aeruginosa*, neméně častého původce nozokomiálních infekcí, se rezistence ke karbapenemům pohybovala ve většině Evropy ve stejném roce mezi 10-50 % (Obrázek 3).

Rezistence k antibiotikům není jen pouhý vědecký poznatek či akademický termín; je to fenomén, který má své klinické dopady na jednotlivé pacienty. Schwaberova meta-analýza šestnácti studií dokládá, že v případě enterobakterií způsobujících infekci krevního řečiště je rezistence k cefalosporinům III. generace asociována se zpožděním nasazení efektivní antibioterapie a se zvýšenou mortalitou pacientů (13). Tumbarellova studie potvrzuje tyto závěry svými výsledky, kdy mortalita pacientů s infekcí krevního řečiště způsobenou ESBL-pozitivními enterobakteriemi dosáhla v případě neadekvátní antibiotické léčby až 60 % (14). Stejně tak i v případě *Pseudomonas aeruginosa* je mortalita infekcí krevního řečiště

prokazatelně vyšší u kmenů rezistentních ke karbapenemům než u kmenů citlivých (62 %, resp. 44 %) (15).

Nejčastěji je rezistence k této skupině antibiotik způsobena produkcí širokospektrých beta-laktamáz a dále snížením propustnosti bakteriální stěny, efluxem antibiotika z buňky a kombinací těchto mechanismů. U stafylokoků rezistence vzniká změnou cílového místa, např. přijetím genu *mec A*, který kóduje pozměněný enzym PBP2a s velmi nízkou afinitou k beta-laktamům.

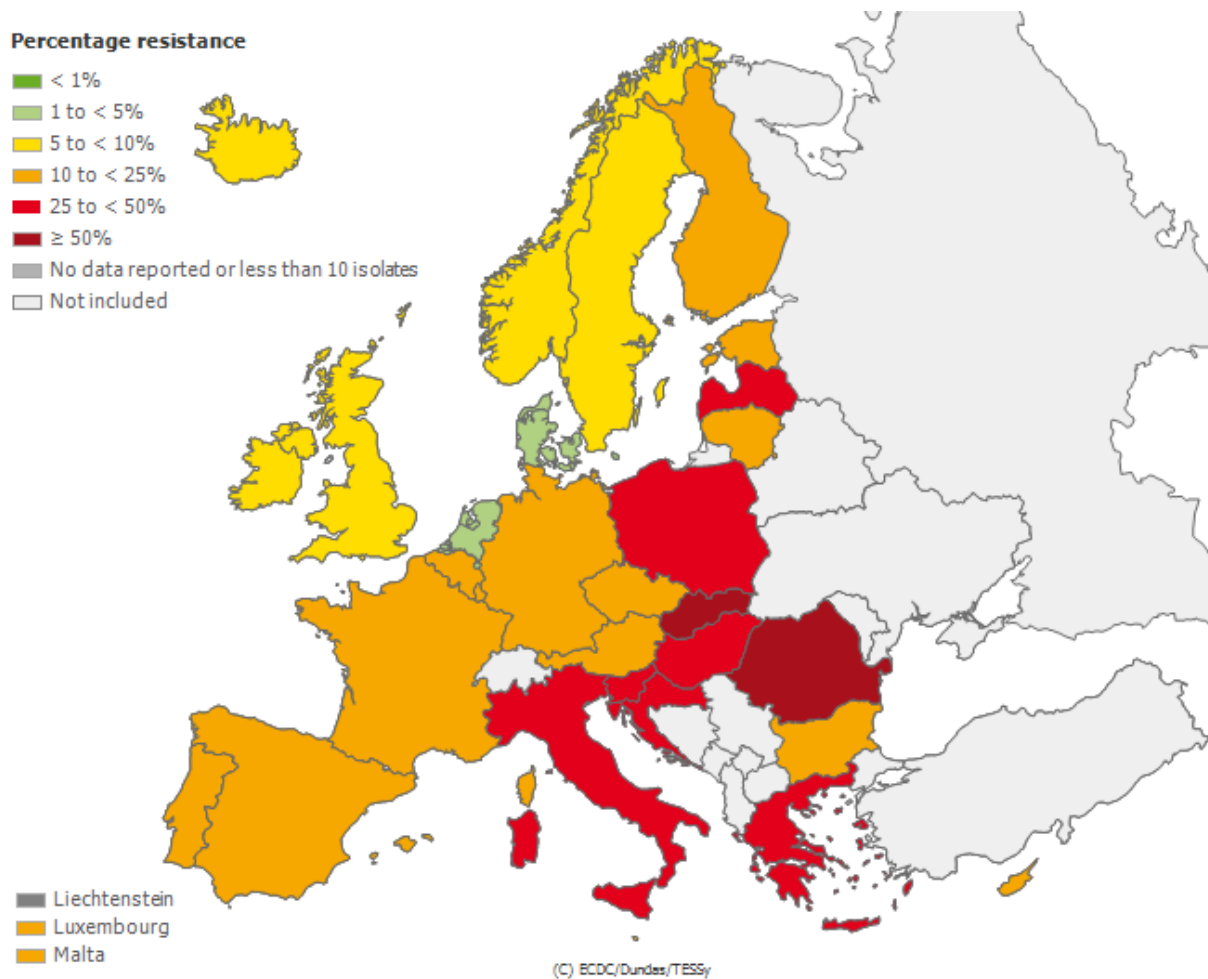
**Obrázek 2.** Rezistence invazivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* k cefalosporinům III. generace v Evropě v roce 2013



Zdroj: EARS-Net

[http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial\\_resistance/database/Pages/map\\_reports.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/map_reports.aspx)

**Obrázek 3.** Rezistence invazivních izolátů *Pseudomonas aeruginosa* ke karbapenemům v Evropě v roce 2013



Zdroj: EARS-Net

[http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial\\_resistance/database/Pages/map\\_reports.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/map_reports.aspx)



### 1.2.1. Širokospektré beta-laktamázy typu ESBL a AmpC

První zmínka o látce produkované kmenem *Escherichia coli* a schopné inhibovat účinky penicilinu pochází z roku 1940, tedy dva roky předtím, než bylo toto antibiotikum uvedeno na komerční trh (9). Dnes je již identifikováno přes 900 typů beta-laktamáz a přes 150 typů beta-laktamáz s rozšířeným spektrem, které se označují jako ESBL (Extended-Spectrum-Beta-Lactamase) (16-18).

Beta-laktamázy se klasicky rozdělují podle klasifikace Bushové, Jacobyho a Medeirose, která rozděluje beta-laktamázy podle spektra substrátů hydrolyzy a podle citlivosti k inhibitorům beta-laktamáz do tří skupin 1–3 a podskupin a-f (19). Stále užívanou klasifikací je také Amblerův systém rozdělení do 4 tříd podle chemické struktury (20).

Klinicky významné skupiny beta-laktamáz a korelace mezi funkční a molekulární klasifikací jsou ukázány v tabulce 1.

**Tabulka 1.** Hlavní skupiny beta-laktamáz u gramnegativních bakterií podle funkční klasifikace Bushové, Jacobyho a Medeirose a Amblerovy molekulární klasifikace\*

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

\* Upraveno podle Bushové K. (19)

Klinicky nejvýznamnějšími širokospektrými beta-laktamázami jsou enzymy typu ESBL (patřící do skupiny 2be a třídy A) a AmpC (zařazované do skupiny 1 a třídy C). Terapeutický problém spočívá v tom, že bakterie produkující ESBL enzymy hydrolyzují všechny peniciliny, všechny cefalosporiny (kromě cefamycinů) a monobaktamy. Bohužel i použití kombinace těchto antibiotik s inhibitory beta-laktamáz (kyselina klavulanová,

sulbaktam a tazobaktam) často v praxi selhává. Další problém, který se váže s rozhodováním o antibiotické terapii, je fakt, že rezistence k beta-laktamům podmíněná produkcí ESBL se často váže s rezistencí i k jiným antibiotickým skupinám, např. fluorochinolonům, aminoglykosidům, tetracyklinům a kotrimoxazolu, což ještě více ztěžuje léčebnou rozvahu (21). Tato sdružená rezistence je dána lokalizací genů rezistence k výše jmenovaným antibiotikům na stejném mobilním elementu, na kterém je i umístěn gen pro produkci ESBL. Přenos plasmidu s těmito geny bakteriální konjugací vede k rychlému horizontálnímu šíření multirezistence (22).

Cefalosporinázy, jinak nazývané také AmpC beta-laktamázy, jsou enzymy stejného klinického významu jako již zmiňované ESBL enzymy. Spektrum hydrolýzy mají podobné, stejně jako ESBL účinkují na peniciliny, cefalosporiny (včetně cefamycinů) a monobaktamy, ale většinou nepůsobí na cefepim. Klasické inhibitory beta-laktamázy (kyselina klavulanová, sulbaktam a tazobaktam) na tuto skupinu neúčinkují, nicméně pro laboratorní účely byl popsán jiný inhibitor těchto enzymů, a to kyselina 3-aminofenylboritá. Jejich význam spočívá v tom, že jsou často nalézány u zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* (především *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp. a *Serratia* sp.) jako chromozomální enzymy produkované konstitutivně v nízkých hladinách. Producenti těchto enzymů se jeví většinou jako citliví k cefalosporinovým antibiotikům „in vitro“. V přítomnosti induktoru, např. amoxicilinu, ceftazidimu, imipenemu, kyseliny klavulanové aj., se jejich tvorba zvyšuje a může dojít k inaktivaci cefalosporinů III. generace, popř. i jiných beta-laktamových antibiotik (23). V klinické situaci, kdy je použit cefalosporin III. generace, dojde k selekci subpopulace tzv. derepresovaných mutant, které pak jsou zodpovědné za změnu z inducibilní hyperprodukce AmpC enzymů na konstitutivní. Typický scénářem je u infekcí způsobených AmpC-producentem iniciální odpověď na léčbu následovaná selháním léčby a rekurencí infekce. Proto při pozitivním průkazu inducibilní AmpC produkce je doporučováno vyhnout se terapeutickému použití cefalosporinu III. generace i přesto, že se kmen jeví při „in vitro“ testování jako citlivý, a to především v případě sepsí (24).

Vznik derepresovaných mutant není jediná hrozba provázející tvorbu AmpC enzymů. Pokud se k hyperprodukcí AmpC enzymů přidá další mechanismus rezistence, např. deplece porinů v bakteriální membráně, bakterie se stane rezistentní i ke karbapenemovým antibiotikům.

### 1.2.2. Rezistence ke karbapenemům

Karbapenemy jsou považovány za antibiotika první volby při léčbě infekcí způsobených multirezistentními enterobakteriemi. Je logické, že v situacích zvýšeného výskytu ESBL- a/nebo AmpC-pozitivních bakterií dochází i k nárůstu spotřeby těchto přípravků. Tím se zesiluje selekční tlak a vzniká rezistence i k této záložní skupině antibiotik. Tuto korelaci názorně dokumentuje příklad jedné newyorské nemocnice s vysokým výskytem infekcí vyvolaných ESBL-pozitivními enterobakteriemi, kdy četnost ceftazidim-rezistentních kmenů *Klebsiella pneumoniae* sice poklesla o 71 % v důsledku 80% snížení spotřeby cefalosporinů, ale nežádoucím efektem zvýšeného užívání karbapenemů byl 69% nárůst imipenem-rezistentních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* (25).

Rezistence k této skupině antibiotik je podmíněna dvěma různými mechanismy: produkcí enzymů, které hydrolyzují molekuly karbapenemů (serinové karbapenemázy třídy A a D a metalo-beta-laktamázy), nebo produkcí ESBL- a/nebo AmpC-beta-laktamáz se současným poklesem exprese membránových porinů. Rezistence, která není způsobena produkcí karbapenemáz, nebývá trvalá, neboť po vysazení antibiotika dochází k opětovnému množení citlivé subpopulace (26). Naproti tomu karbapenemázová rezistence je stálá a její nebezpečí spočívá v tom, že její geny jsou umístěny na mobilních elementech, které se mohou přenášet i mezidruhově (26).

### 1.2.3. Karbapenemázy

Karbapenemázy patří do skupiny širokospektrých beta-laktamáz a třídí se podle stejných klasifikací (tj. klasifikace Bushové, Jacobyho a Medeirosa a Amblerovy klasifikace) (19, 20). Karbapenemázy se rozdělují do dvou větších molekulárních skupin, které jsou charakterizovány podle hydrolytického mechanismu v aktivním místě enzymu. První karbapenemáza byla popsána u grampozitivní bakterie *Bacillus cereus* (27). Na rozdíl od ostatních do té doby známých beta-laktamáz byl tento enzym inhibovatelný kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA) a z pozdějších prací se ukázalo, že tyto tzv. metalo-beta-laktamázy obsahují atom zinku ve svém aktivním místě, díky kterému jsou schopny hydrolyzovat beta-laktamový kruh téměř všech beta-laktamů, včetně karbapenemů (nikoli však monobaktamů). Metalo-beta-laktamázy (MBL) jsou zpravidla zařazované do třídy B podle Amblera a skupiny 3 podle Bushové, Jacobyho a Medeirosa. V osmdesátých letech dvacátého století byly objeveny další enzymy, schopné hydrolyzovat karbapenemy, a to u čeledi *Enterobacteriaceae*. Bylo zjištěno, že tyto enzymy mají serin ve svém aktivním místě, a začaly se nazývat serinové karbapenemázy. Většina serinových karbapenemáz se zařazuje

do třídy A podle Amblera a do skupiny 2f podle Bushové, Jacobyho a Medeiros; menší část jsou tzv. OXA-beta-laktamázy zařazované do třídy D a do skupiny 2df. Serinové karbapenamázy tř. A jsou schopny hydrolyzovat všechna beta-laktamová antibiotika, nejsou inhibovatelné EDTA, ale mohou být inaktivovány kyselinou 3-aminofenylboritou (3-APB).

Do devadesátých let dvacátého století byly všechny karbapenamázy popsány jako chromozomálně kódované, specifické pro konkrétní species. Nicméně detekce metalo-beta-laktamázy IMP-1 u *Pseudomonas aeruginosa*, serinových karbapenemáz KPC-1 u *Klebsiella pneumoniae* a OXA-23 u kmene *Acinetobacter baumannii* změnila dosavadní náhled na globální šíření karbapenemáz vzhledem k tomu, že se jedná o plazmidové karbapenamázy, které se mohou přenášet mezidruhově.

Nejrozšířenějšími typy karbapenemáz jsou KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), VIM (Verona integrone-encoded metalo-beta-lactamase), NDM-1 (New-Delhi metalo-beta-lactamase), IMP a OXA-48. Hlavní skupiny karbapenemáz jsou sumarizovány v tabulce 2.

**Tabulka č. 2.** Hlavní skupiny karbapenemáz podle funkční klasifikace Bushové, Jacobyho a Medeiros a Amblerovy molekulární klasifikace

Funkční skupina	Molekulární třída	Enzym	Spektrum hydrolýzy	Inhibitor karbapenemázy
2f	A	KPC, IMI, SME, GES, NMC	peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy, karbapenemy	kys. 3-aminofenylboritá, slabě kys. klavulanová
3	B	IMP, VIM, NDM-1, GIM, SPM	peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy	chelátory kovových iontů (EDTA, kyselina 2-merkaptopropionová, aj.)
2df	D	OXA	peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy	

### 1.2.3.1. Rozšíření karbapenemáz ve světě

Kmeny produkující karbapenamázy nabývají na významu svým celosvětovým rozšířením. Byly již hlášeny KPC-pozitivní enterobakterie v Izraeli, Jižní Americe, Číně i Evropě (28-32). V Kolumbii byla KPC identifikována u kmene *Pseudomonas aeruginosa*, což ukazuje neočekávané šíření těchto enzymů i mimo čeleď *Enterobacteriaceae* (33). V odborné literatuře jsou údaje o vypuknutí až epidemických situací. Surveillance vedená v brooklynských nemocnicích v New Yorku v roce 2004 prokázala u 24 % kmenů *Klebsiella*

*pneumoniae* přítomnost genu *bla*<sub>KPC</sub> (34). V Evropě je podobným endemickým místem Řecko (31).

Výskyt enzymů typu MBL je opět celosvětový, podobně jako u KPC enzymů. První transferabilní MBL byla detekována v Japonsku v roce 1990 u kmene *Pseudomonas aeruginosa* (IMP-1) (35). IMP enzym se dále rozšířil do Spojených států amerických (USA), Austrálie i Evropy (36-38). Další rodiny MBL byly identifikovány v Itálii (VIM „Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase“), v Brazílii (SPM „Sao Paulo metallo-beta-lactamase“), v Německu (GIM „German imipenemase“), a v Korei (SIM „Seoul imipenemase“) (39-42).

Castanheira et al. uvádějí ve své studii v rámci SENTRY programu 97% citlivost enterobakterií ke karbapenemům v USA, Evropě a Jižní Americe pro rok 2009 (43). V této studii bylo nalezeno v uvedených regionech 3 % karbapenem-rezistentních kmenů *Klebsiella* sp. a *Escherichia coli*, z toho 70 % tvoří producenti karbapenemáz (KPC, MBL a OXA-48). V Evropě představují karbapenem-rezistentní kmeny necelá 3 %, z toho 61 % je podíl producentů karbapenemáz. V USA je hlášeno karbapenem-rezistentních kmenů *Klebsiella* sp. a *Escherichia coli* 4 %, z toho 87 % produkuje karbapenamázy; v Latinské Americe stoupá rezistence ke karbapenemům u těchto dvou species k 6 %, z toho necelá polovina (46 %) jsou karbapenamázy-pozitivní kmeny (43). Evropská studie MYSTIC v roce 2002 zmapovala výskyt kmenů *Pseudomonas aeruginosa* a *Acinetobacter baumannii* rezistentních ke karbapenemům ve 14 evropských centrech s výsledkem 29 %, respektive 16 % (44).

### **1.2.3.2. Rozšíření karbapenemáz v Evropě**

Situace v Evropě byla a stále je velmi různorodá. V roce 2005 se prevalence karbapenem-rezistentních kmenů *Klebsiella pneumoniae* ve většině evropských zemí držela pod 1 %, nicméně v Německu to bylo již 2 % a v Řecku dokonce ve 28 %. O pět let později se v Řecku prevalence těchto kmenů zvýšila na 49 %, přičemž KPC (především KPC-2)-producenti tvořili 53 % a VIM-pozitivní kmeny zbývajících 47 % karbapenem-rezistentních klebsiel (45-47). V letech 2010-2013 proběhl v německém Lipsku největší „outbreak“ KPC-pozitivních kmenů *Klebsiella pneumoniae* v Evropě, jednalo se o 103 pacientů, nicméně u dalších 32 pacientů byly během tohoto období zachyceny další typy karbapenemáz (NDM-1, VIM, OXA-48) (48).

### 1.2.3.3. Rozšíření karbapenemáz v České republice

V České republice byly od roku 2008 rovněž zachyceny kmeny produkující karbapenemázy, i když se jedná o ojedinělé případy. V roce 2008 byla detekována neobvyklá MBL, IMP-7, u *Pseudomonas aeruginosa* (49). O rok později se objevil panrezistentní kmen *Serratia marcescens*, který produkoval zároveň metalo-beta-laktamázu (typ VIM), širokospektrou beta-laktamázu typu ESBL (TEM-6), inherentní beta-laktamázu typu AmpC a získanou AmpC (typ DHA-1) (26). Dále byly zachyceny enzymy VIM u kmenů *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae* a *Pseudomonas aeruginosa* (VIM-2) a také enzym KPC-2 a KPC-3 u importovaných kmenů *Klebsiella pneumoniae* (50). Během roku 2011 bylo v České republice zachyceno dalších 15 kmenů *Klebsiella pneumoniae* produkujících karbapenemázy (VIM-1, VIM-4, KPC-2 and KPC-3) (51). První metalo-beta-laktamáza typu NDM-1, byla detekována u kmene *Acinetobacter baumannii* u českého pacienta repatriovaného v červenci 2011 z Egypta (51). V únoru 2015 byla poprvé zachycena NDM-1 u kmene *Klebsiella pneumoniae* (52).

### 1.2.4. Interpretace výsledků antibiogramu

Jednou z nejdůležitějších úloh klinického mikrobiologa je nepochybně interpretace mikrobiologických výsledků, včetně testů ke zjištění citlivosti či rezistence daného agens k antibiotikům. Cílem tohoto „in vitro“ testování a následné interpretace je předpovědět úspěch či selhání antibiotické léčby „in vivo“. Nicméně výsledek v kategorii „citlivý“ nezaručuje klinický úspěch stejně jako výsledek v kategorii „rezistentní“ nevyjadřuje stoprocentní jistotu, že antibiotikum bude neúčinné. Efekt antimikrobní léčby závisí kromě konkrétního etiologického agens také na místě infekce, stavu imunitního systému pacienta, velikosti bakteriální nálože, přítomnosti biofilmu, produkci toxinů, farmakodynamice léku a dalších faktorech. Návrh antibiotické terapie na základě antibiogramu by proto měl být vždy hodnocen společně s klinickým obrazem, epidemiologickými údaji a dalšími laboratorními nálezy.

#### 1.2.4.1. Interpretace antibiogramu při prokázané produkci ESBL či AmpC

Většina kmenů produkujících ESBL vykazuje tzv. efekt inokula, při kterém se s rostoucím inokulem při testování citlivosti zvyšuje i minimální inhibiční koncentrace (MIC) cefalosporinů. Práce Medeirosa a Crellina popsala dramatické zvýšení MIC většiny cefalosporinů při změně denzity inokula z  $10^5$  na  $10^7$  CFU/ml (53). Předpokládá se, že u mnohých infekcí dosahuje bakteriální nálož právě těchto i vyšších hodnot. Z toho důvodu

bylo doporučováno, aby každý mikroorganismus, u kterého je potvrzena ESBL produkce, byl hlášen jako rezistentní k cefalosporinovým antibiotikům bez ohledu na výsledek testování citlivosti (54).

Evropská komise pro testování antibiotické citlivosti (EUCAST) navrhla hodnoty hraničních citlivostí cefalosporinů u enterobakterií tak, aby byly zachyceny všechny klinicky důležité mechanismy rezistence včetně produkce ESBL a plazmidových AmpC enzymů (55). Důležitou změnou je, že ESBL- či AmpC-pozitivní kmeny, které budou podle nových „breakpointů“ citlivé k cefalosporinům III. a IV. generace, by měly být hlášeny jako citlivé. To znamená, že podle nových hraničních citlivostí EUCAST přítomnost nebo absence ESBL neovlivňuje zařazení do kategorie citlivý/rezistentní (55). Tato nová doporučení EUCAST sice vedou ke zjednodušení interpretace antibiogramu, nicméně mnohé dřívější práce prokázaly, že nelze vyloučit falešnou citlivost těchto kmenů a následné selhání léčby cefalosporiny III. generace u infekcí způsobených ESBL-pozitivními bakteriemi (54, 56-58).

Co se týče kombinace širokospektrých penicilinů s inhibitorem beta-laktamáz, tato je považována za účinnou proti mikroorganismu produkujícího ESBL především v případě nízké hodnoty MIC u močových infekcí, kde se předpokládá vysoká koncentrace antibiotika v moči (59).

#### **1.2.4.2. Interpretace antibiogramu při prokázané produkci karbapenemáz**

Podobně jako u širokospektrých cefalosporinů v případě ESBL a AmpC-producentů, i pro karbapenemy platí podle kritérií EUCAST, že současné hraniční citlivosti detekují všechny klinicky důležité mechanismy rezistence ke karbapenemům (včetně většiny karbapenemáz). Některé enterobakterie, které produkují karbapenemázy a spadají do kategorie „citlivý“, by měly být takto hlášeny; tj. potenciální nasazení karbapenemu do terapie by se mělo řídit podle hodnoty MIC. Detekce a charakterizace karbapenemáz se doporučuje pro účely surveillance bakteriální rezistence (55). Nicméně určení typu karbapenemáz může klinickému mikrobiologovi poskytnout větší operační prostor při konzultacích antibiotické terapie. Příkladem může být rozdíl ve spektru hydrolýzy serinových karbapenemáz třídy A a metalo-beta-laktamáz v případě monobaktamů. Jiným příkladem může být enterobakterie produkující OXA-48, ale nikoli ESBL, pak je účinnost širokospektrého cefalosporinu „in vitro“ mnohem vyšší než karbapenemu, a to i v případě MIC karbapenemu v citlivých hodnotách (60,61). Vzhledem k prozatimnímu nedostatku validních dat je vhodná opatrnost a v případě průkazu produkce karbapenemáz je pravděpodobně lépe uchýlit se ke kombinované terapii. Dokonce i v případě, že infekce je způsobena producentem karbapenemáz, lze použít karbapenem

v kombinované terapii. Je dokumentováno, že použití karbapenemu v kombinaci s dalším „in vitro“ účinným přípravkem vykazuje nižší mortalitu než kombinovaná terapie neobsahující karbapenemy (62,63).

#### **1.2.5. Klinický význam širokospektrých beta-laktamáz**

V dnešní době nejsou pochybnosti, že infekce způsobena multirezistentní gramnegativní bakterií je asociována s horší prognózou, možností selhání léčby a vyšší mortalitou (13, 14). Základní problém spočívá v neúčinnosti záložních beta-laktamových antibiotik, jako jsou širokospektré cefalosporiny, piperacilin s tazobaktamem, karbapenemy, která jsou častou empirickou volbou u závažně nemocných pacientů. Tím dochází ke zpoždění podání skutečně účinného antibiotika až do chvíle mikrobiologické identifikace patogena s určením citlivosti/rezistence k antibiotikům, což trvá minimálně 2 dny. Podle doporučení „Surviving Sepsis Campaign“ je však žádoucí, aby antibiotikum bylo v léčbě těžké sepse podáno co nejdříve, optimálně do 1 hodiny od zjištění diagnózy (64). Pro ošetřujícího lékaře z toho vyplývá, že pro nasazení adekvátní iniciální antibiotické terapie musí vycházet ze sofistikovaného odhadu etiologického agens a znalosti vzorců citlivosti/rezistence k antibiotikům. Klinický mikrobiolog tedy musí monitorovat výskyt nejčastějších bakteriálních species a jejich fenotypy rezistence v daném regionu, zjistit jejich zdroje a způsoby šíření a převádět tyto poznatky do rozhodovacího procesu v klinické praxi.



## **2. CÍLE PRÁCE**

Cílem této disertační práce bylo zjistit výskyt multirezistentních kmenů čeledi *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonas aeruginosa*, izolovaných z klinického materiálu pacientů Fakultní nemocnice Olomouc (FNOL) a Vojenské nemocnice Olomouc (VNO), komunitních pacientů a z nemocničního prostředí a analyzovat jejich mechanismus. Neméně důležitým cílem bylo stanovit optimální fenotypovou metodu detekce širokospektrých beta-laktamáz, včetně karbapenemáz.

Konkrétní cíle lze definovat následujícími body:

### **2.1. Stanovení možností fenotypových metod pro detekci širokospektrých beta-laktamáz**

#### **2.1.1. Stanovení senzitivity fenotypových metod pro detekci širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC**

Cílem bylo stanovit senzitivitu fenotypových metod pro detekci produkce ESBL a AmpC enzymů a doporučit nejvhodnější pro rutinní mikrobiologickou praxi.

#### **2.1.2. Stanovení senzitivity fenotypových metod pro detekci serinových karbapenemáz a metalo-beta-laktamáz**

Cílem bylo stanovit senzitivitu fenotypových metod pro detekci produkce serinových karbapenemáz třídy A, metalo-beta-laktamáz a enzymů OXA a doporučit nejvhodnější pro rutinní mikrobiologickou praxi.

### **2.2. Výskyt enterobakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC**

#### **2.2.1. Stanovení gastrointestinálního nosičství ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií u komunitních a hospitalizovaných pacientů**

Cílem bylo určit prevalenci ESBL- a AmpC- pozitivních enterobakterií v gastrointestinálním traktu komunitních a hospitalizovaných pacientů.

#### **2.2.2. Stanovení gastrointestinálního nosičství ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií u hemato-onkologických pacientů**

Cílem bylo určit prevalenci ESBL- a AmpC- pozitivních enterobakterií v gastrointestinálním traktu hemato-onkologických pacientů.

### **2.2.3. Stanovení etiologických agens nozokomiálních pneumonií a jejich rezistence k antibiotikům se zaměřením na enterobakterie produkující širokospektré beta-laktamázy**

Cílem bylo určit nejčastější etiologická agens se zaměřením na enterobakterie produkující širokospektré beta-laktamázy v endotracheálním sekretu ventilovaných pacientů s nozokomiální pneumonií, zhodnotit jejich rezistenci k antibiotikům a klinický význam.

### **2.2.4. Výskyt enterobakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy v prostředí jednotek intenzivní péče**

Cílem bylo určit výskyt ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií ve stěrech z nemocničních povrchů, od personálu, ve vzduchu a na základě dosažených výsledků pak zhodnotit potenciál přenosu na pacienty v rámci intenzivní péče.

## **2.3. Analýza rezistence ke karbapenemům**

### **2.3.1. Stanovení četnosti enterobakterií rezistentních ke karbapenemům ve Fakultní nemocnici Olomouc**

Cílem bylo stanovit prevalenci karbapenem-rezistentních enterobakterií ve Fakultní nemocnici Olomouc a zjistit mechanismus tohoto typu rezistence.

### **2.3.2. Stanovení četnosti kmenů *Pseudomonas aeruginosa* s rezistencí ke karbapenemům ve Fakultní nemocnici Olomouc a Vojenské nemocnici Olomouc**

Cílem bylo stanovit prevalenci karbapenem-rezistentních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* ve Fakultní nemocnici Olomouc a Vojenské nemocnici Olomouc a zjistit mechanismus rezistence.

## **2.4. Analýza vlivu spotřeby antibiotik na vývoj rezistence**

### **2.4.1. Stanovení vlivu selekčního tlaku beta-laktamových antibiotik na rezistenci u vybraných enterobakterií**

Cílem byla analýza vývoje rezistence u vybraných druhů čeledi *Enterobacteriaceae* k beta-laktamovým antibiotikům ve Fakultní nemocnici Olomouc a zhodnocení selekčního tlaku těchto antibiotik.

#### **2.4.2. Stanovení vlivu selekčního tlaku karbapenemů na bakteriální rezistenci**

Cílem byla analýza vztahu spotřeby karbapenemů a rezistence vybraných gram-negativních bakterií ve Fakultní nemocnici Olomouc a zhodnocení selekčního tlaku těchto antibiotik.

### **3. MATERIÁL A METODY**

#### **3.1. Definice souborů testovaných bakteriálních kmenů**

V následujících podkapitolách jsou definovány jednotlivé soubory kmenů izolovaných od pacientů, popř. z nemocničního prostředí, v rámci jednotlivých projektů, jak jsou definovány v kapitole 2. Cíle práce.

##### **3.1.1. Soubor bakteriálních kmenů s produkcí širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC ke stanovení senzitivity testovaných metod**

Kmeny pocházely z klinického materiálu pacientů hospitalizovaných ve FNOL (moč, stolice, výtěr z krku, endosekret, sputum, krev, punktát, výtěr z rány apod.). Do studie byl zařazen vždy jen jeden izolát s jedinečným fenotypovým profilem od každého pacienta.

##### **3.1.2. Soubor bakteriálních kmenů s produkcí serinových karbapenemáz a metalo-beta-laktamáz ke stanovení senzitivity testovaných metod**

Kmeny pocházely z různých klinických materiálů (moč, stolice, výtěr z krku, endosekret, sputum, krev, punktát, výtěr z rány apod.) pacientů hospitalizovaných v Univerzitní nemocnici Lipsko (Universitätsklinikum Leipzig, Německo). Do studie byl zařazen vždy jen jeden izolát s jedinečným fenotypovým profilem od každého pacienta.

##### **3.1.3. Soubor bakteriálních kmenů z gastrointestinálního traktu u komunitních a hospitalizovaných pacientů**

V období 1. 3. – 1. 5. 2010 byly provedeny rektální výtěry ambulantních pacientů olomouckého regionu a pacientů hospitalizovaných ve FNOL. Výtěry byly inokulovány na selektivní chromogenní médium Brilliance ESBL Agar (Oxoid) a vyrostlé kolonie byly podrobeny následné analýze.

##### **3.1.4. Soubor bakteriálních kmenů z gastrointestinálního traktu u hemato-onkologických pacientů**

V období 1. 11. 2012 – 31. 1. 2013 byly provedeny rektální výtěry pacientů hospitalizovaných na Hemato-onkologické klinice (HOK) FNOL. Výtěry byly inokulovány na selektivní chromogenní médium Chrom ID ESBL agar (BioMérieux). V období 1. 11. 2012 – 1. 3. 2013 byly současně izolovány i ESBL- a AmpC-pozitivní enterobakterie z klinického materiálu od pacientů s diagnózou febrilní neutropenie a komplikujícími bakteriálními infekcemi z důvodu stanovení případné klonality.

### **3.1.5. Soubor původců nozokomiálních pneumonií u pacientů v intenzivní péči se zaměřením na ESBL- a AmpC-pozitivní enterobakterie**

Do studie byli zařazeni pacienti hospitalizovaní od 1. 5. 2013 – 31. 1. 2014 na Anesteziologicko-resuscitační klinice Thomayerovy nemocnice v Praze (TN), KARIM Fakultní nemocnice Brno (FN Brno), KARIM Fakultní nemocnice Hradec Králové (FN HK) a Kliniky anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny (KARIM) FNOL s čerstvým nebo progredujícím infiltrátem na skiagramu hrudníku společně s nejméně dvěma příznaky infekce respiračního traktu (febrilie, hnisavé sputum, leukocytóza  $>10 \times 10^3/\text{mm}^3$  nebo leukopenie  $<4 \times 10^3/\text{mm}^3$ , zánětlivý poslechový nález na plicích, kašel a/nebo respirační insuficience s hodnotou oxygenačního indexu  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{mmHg}$ ), které se objevily nejdříve po 48 hodinách od hospitalizace. Od těchto pacientů byl odebrán endotracheální sekret okamžitě při zařazení do studie a poté dvakrát týdně. Pokud během hospitalizace došlo k úpravě klinického stavu a poté k relapsu, byl tento posuzován jako další nová epizoda HAP. Každý vzorek byl zpracován běžnými mikrobiologickými postupy. U pacientů byla hodnocena klinická data jako časná, nebo pozdní nozokomiální pneumonie, antibiotická terapie v den odběru a nemocniční mortalita.

### **3.1.6. Soubor enterobakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy v prostředí jednotek intenzivní péče**

V období 1. 11. 2010 – 31. 12. 2010 byla provedena epidemiologická studie mikrobiální kontaminace vzduchu, povrchů a personálu KARIM a oddělení Intenzivní péče chirurgických oborů (IPCHO) FNOL. Mikrobiální kontaminace vzduchu byla hodnocena pomocí monitorovacího systému MAS-100 (Merck). Na každém oddělení bylo vytipováno 10 míst vhodných k odběrům vzorků. Na každém místě bylo vyšetřeno 100 litrů vzduchu. Kromě toho na každém oddělení bylo vyšetřeno 30 různých povrchů (okenní parapety, ovladače infúzních pump, žaluzie, výlevky dřezů, umyvadel, ředících roztoků, stojany na infúze, postranice postelí apod.). Od personálu byly odebrány výtěry nosu a stěry z pravé ruky. Na každém oddělení bylo vyšetřeno 15 osob. Výtěry byly zpracovány standardními mikrobiologickými metodami. Ve stejném období byly sbírány i ESBL- a AmpC-pozitivní enterobakterie z klinického materiálu (hemokultury, intravaskulární katetry, moč, materiál z dolních cest dýchacích, jiné tělní tekutiny a exsudáty) od pacientů hospitalizovaných na KARIM a IPCHO FNOL pro stanovení případné klonality.

### **3.1.7. Soubor enterobakterií rezistentních ke karbapenemům ve Fakultní nemocnici Olomouc**

V časovém úseku 1. 4. 2009 – 31. 8. 2010 byly z klinického materiálu pacientů hospitalizovaných ve FNOL (1406 lůžek, z toho 155 na JIP) izolovány enterobakterie s rezistencí ke karbapenemům. V období 1. 1. 2014 – 31. 1. 2015 byly testovány karbapenem-rezistentní kmeny čeledi *Enterobacteriaceae* izolované z rektálních výtěrů pacientů hospitalizovaných na HOK FNOL pomocí selektivního chromogenního média Chrom ID ESBL (Oxoid). Od jednoho pacienta byl zařazen vždy jen jeden kmen se stejným fenotypovým profilem.

### **3.1.8. Soubor kmenů *Pseudomonas aeruginosa* rezistentních ke karbapenemům ve Fakultní nemocnici Olomouc a Vojenské nemocnici Olomouc**

V období od 1. 1. 2008 – 30. 6. 2013 byly z klinického materiálu pacientů hospitalizovaných ve FNOL a VNO izolovány karbapenem-rezistentní kmeny *Pseudomonas aeruginosa*. Od jednoho pacienta byl zařazen vždy jen jeden kmen *Pseudomonas aeruginosa*.

### **3.1.9. Soubor bakteriálních kmenů pro hodnocení vlivu spotřeby beta-laktamových antibiotik na rezistenci enterobakterií**

V období 1. 1. 2000 – 31. 12. 2011 byly retrospektivně hodnoceny vybrané druhy enterobakterií (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* a *Proteus mirabilis*). Bakteriální kmeny byly izolovány z klinického materiálu pacientů hospitalizovaných ve FNOL. Výběr kmenů byl realizován tak, že od jednoho pacienta byl zařazen vždy jen jeden kmen daného druhu, který byl izolován z příslušného materiálu jako první v časovém intervalu 90 dní.

### **3.1.10. Soubor bakteriálních kmenů pro hodnocení vlivu spotřeby karbapenemů na rezistenci enterobakterií a *Pseudomonas aeruginosa* k meropenemu**

Analyzován byl soubor nejčastějších gramnegativních patogenů zachycených během sedmiletého období (1. 1. 2005 – 31. 12. 2011) v klinickém materiálu pacientů hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Olomouc. Hodnoceny byly následující species: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis* a *Pseudomonas aeruginosa*. Výběr kmenů byl realizován tak, že od jednoho pacienta byl zařazen vždy jen jeden kmen daného druhu, který byl izolován z příslušného materiálu jako první v časovém intervalu 90 dní.

### **3.2. Identifikace izolátů**

Každý izolát byl identifikován standardními mikrobiologickými postupy za použití biochemických identifikačních testů, včetně využití automatických systémů Phoenix (Becton Dickinson) nebo MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics).

### **3.3. Stanovení citlivosti k antibiotikům**

Rezistence k antimikrobiálním přípravkům byla stanovena standardní diluční mikrometodou podle kritérií EUCAST (55). Ve vybraných případech byla použita disková difúzní metoda, automatizovaný systém Phoenix nebo Etest (Biomerieux). Referenční kmeny *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218 a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sloužily k protokolované kontrole kvality.

### **3.4. Fenotypové metody průkazu produkce širokospektrých beta-laktamáz a karbapenemáz**

Následující kapitoly popisují jednotlivé fenotypové metody pro detekci širokospektrých beta-laktamáz.

#### **3.4.1. Fenotypové metody pro průkaz produkce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC**

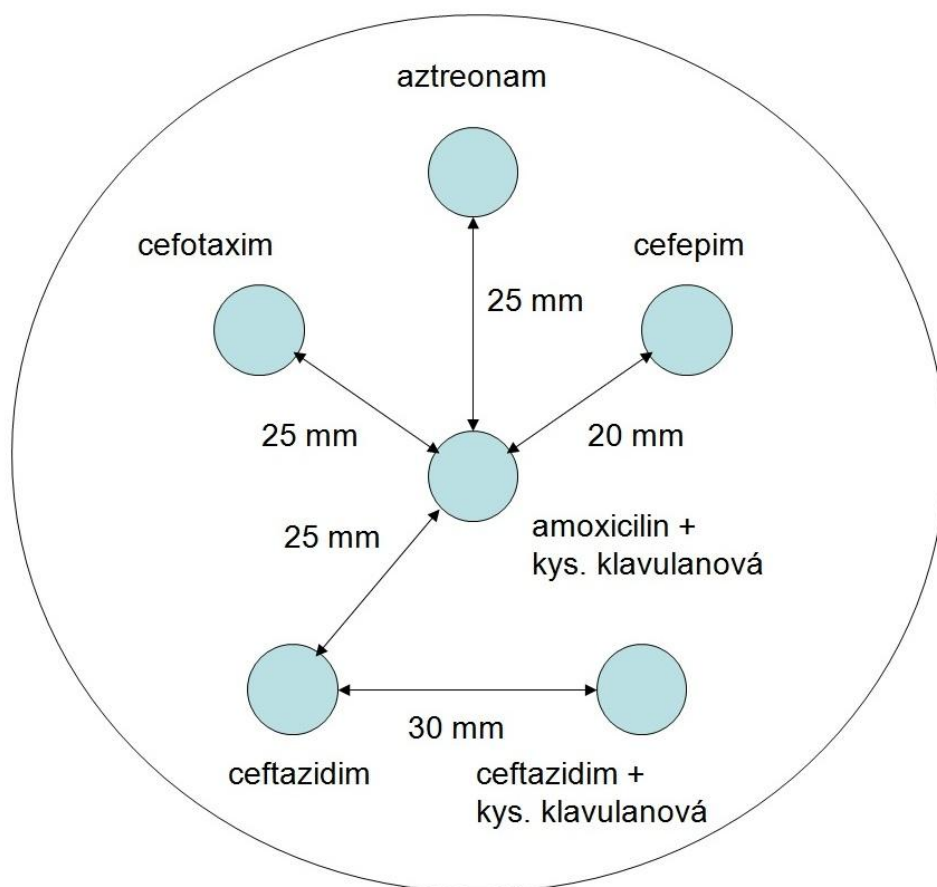
Určené ESBL-pozitivní kmeny byly testovány pomocí automatizovaného systému Phoenix, modifikované mikrodiluční metody s determinací minimální inhibiční koncentrace (MIC) cefoxitinu a poměru MIC cefoperazonu a cefoperazonu se sulbaktamem (Obrázek 4), dále ESBL Etestu (AB Biodisk) a modifikovaného DDST (Obrázek 5). AmpC-pozitivní izoláty byly testovány modifikovaným AmpC diskovým testem s použitím 3-aminofenylborité kyseliny jako specifického inhibitoru (Obrázek 6) a modifikovanou mikrodiluční metodou s určením MIC cefoxitinu a poměru MIC cefotaximu, resp. ceftazidimu a příslušného cefalosporinu s kyselinou 3-aminofenylboritou (Obrázek 4). Kritéria pozitivních výsledků jsou zobrazeny v tabulce 3.

**Obrázek 4.** Modifikovaná sestava antibiotik pro současnou detekci produkce ESBL/AmpC enzymů (koncentrace v mg/l)

AMS	AZT	CXT	CTX	CTX/3APB	CTZ	CTZ/3APB	CPR	CPS	CPM	PIP	PPT
64	64	64	64	64/300	64	64/300	64	64	64	256	256
32	32	32	32	32/300	32	32/300	32	32	32	128	128
16	16	16	16	16/300	16	16/300	16	16	16	64	64
8	8	8	8	8/300	8	8/300	8	8	8	32	32
4	4	4	4	4/300	4	4/300	4	4	4	16	16
2	2	2	2	2/300	2	2/300	2	2	2	8	8
1	1	1	1	1/300	1	1/300	1	1	1	4	4
0.5	0.5	0.5	0.5	0.5/300	0.5	0.5/300	0.5	0.5	0.5	2	2

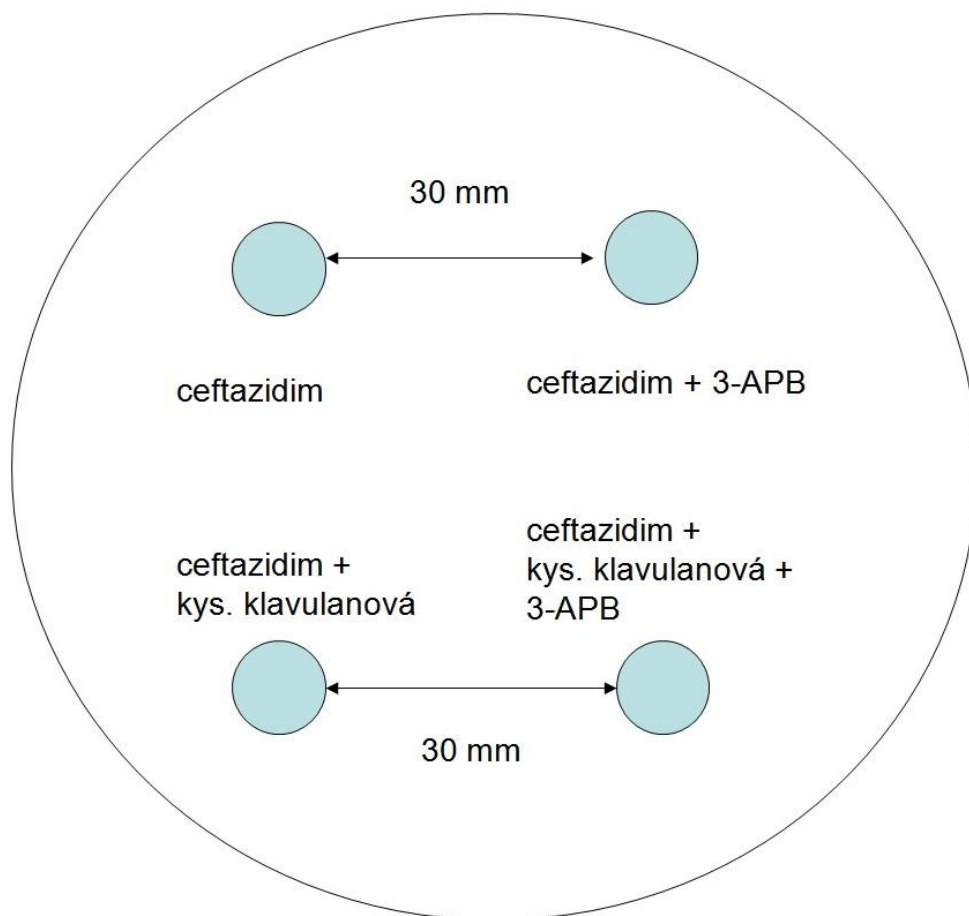
AMS – ampicilin/sulbaktam, AZT – aztreonam, CXT – cefoxitin, CTX – cefotaxim, CTZ – ceftazidim, CPR – cefoperazon, CPS – cefoperazon/sulbaktam, CPM – cefepim, PIP – piperacilin, PPT – piperacilin/tazobaktam, 3APB – 3-aminofenylboritá kyselina

**Obrázek 5.** Modifikovaný DDST pro detekci ESBL





**Obrázek 6.** AmpC test k průkazu AmpC

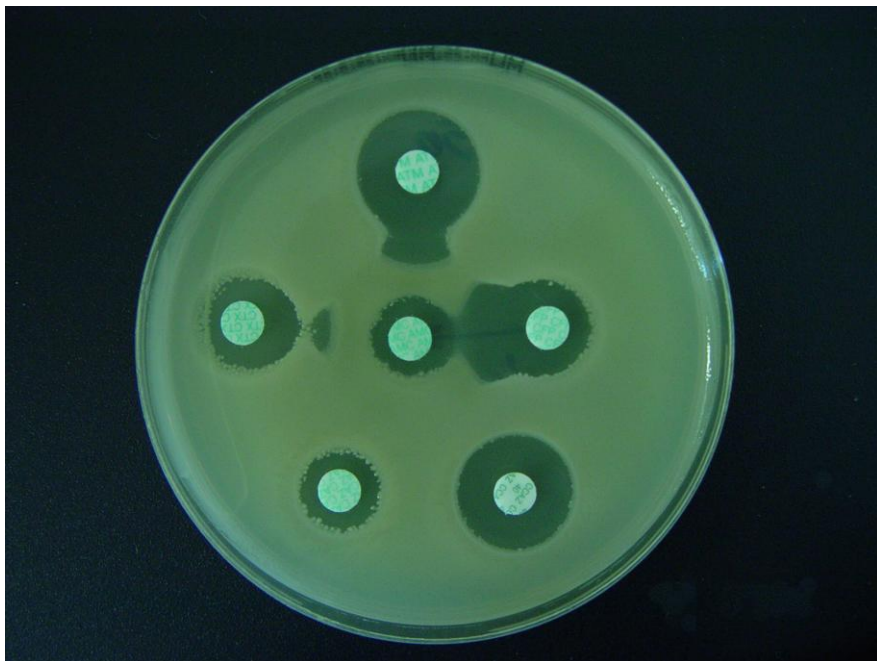


**Tabulka 3.** Kritéria positivity použitých fenotypových testů k detekci ESBL a AmpC enzymů.

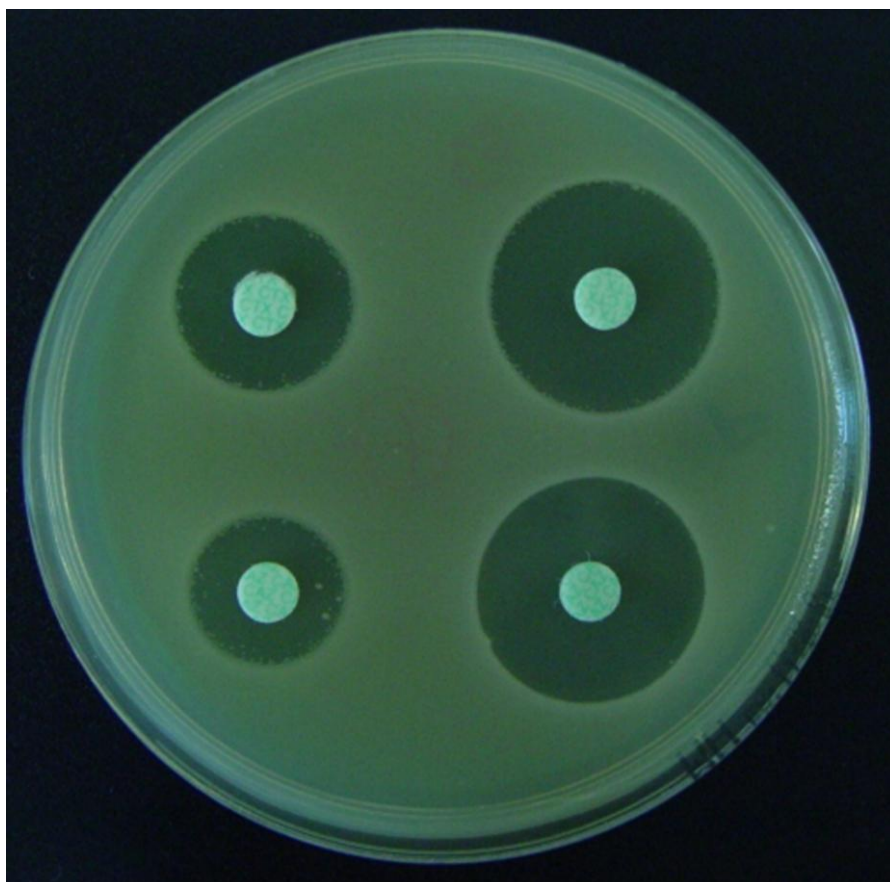
Test	Průkaz ESBL	Průkaz AmpC
mDDST <sup>1)</sup>	Rozšíření/protažení inhibiční zóny směrem k disku s kyselinou klavulanovou a/nebo zvětšení průměru inhibiční zóny minimálně o 5 mm kolem disku s kyselinou klavulanovou (Obrázek 7)	
mAmpC test <sup>2)</sup>		Rozšíření/protažení inhibiční zóny směrem k disku s 3-APB a/nebo zvětšení průměru inhibiční zóny minimálně o 5 mm kolem disku s 3-APB (Obrázek 8)
mMIC <sup>3)</sup>	MIC cefoxitinu $\leq$ 16 mg/l a poměr MIC cefoperazonu a cefoperazonu se sulbaktamem $\geq$ 4:1	MIC cefoxitinu $>$ 16 mg/l a poměr MIC cefotaximu a cefotaximu s 3-APB nebo MIC ceftazidimu a ceftazidimu s 3-APB $\geq$ 4:1
ESBL Etest	Minimálně čtyřnásobný pokles MIC daného širokospektrého cefalosporinu s inhibítorem (cefotaxim/kyselina klavulanová, ceftazidim/kyselina klavulanová a cefepim/kyselina klavulanová) oproti samotnému cefalosporinu, popř. přítomnost fantomové zóny (Obrázek 9)	

Legenda: mDDST – modifikovaný “double-disk synergy test”, mAmpC test – modifikovaný AmpC diskový test, mMIC – modifikovaná mikrodiluční metoda

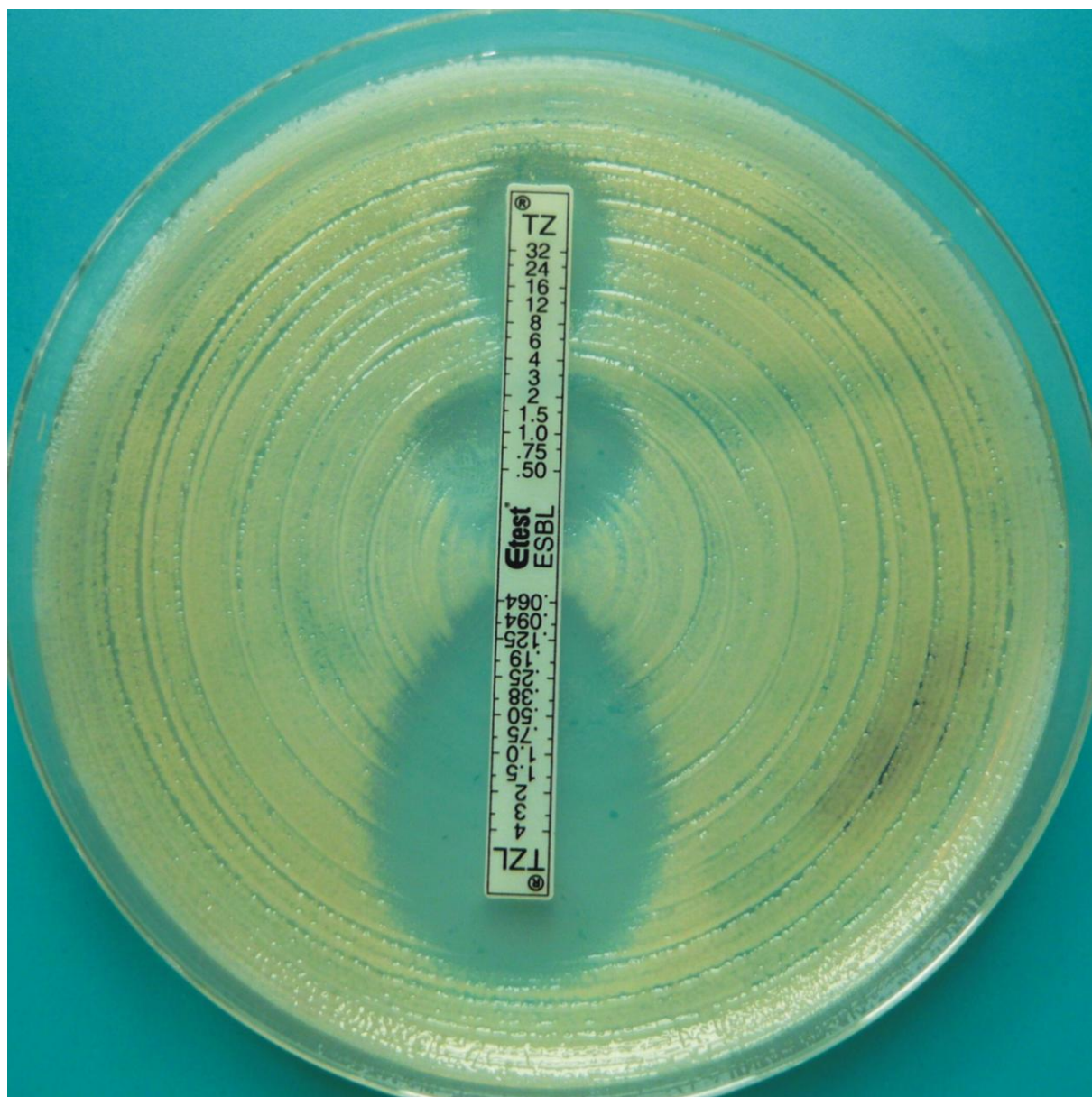
**Obrázek 7.** Pozitivní výsledek mDDST u kmene *Klebsiella pneumoniae* produkujícího ESBL.



**Obrázek 8.** Pozitivní výsledek mAmpC testu u kmene *Klebsiella pneumoniae* produkujícího AmpC.



**Obrázek 9.** Pozitivní výsledek ESBL Etestu u kmene *Klebsiella pneumonia* produkujícího ESBL



### 3.4.2. Fenotypové metody pro detekci serinových karbapenemáz a metalo-beta-laktamáz

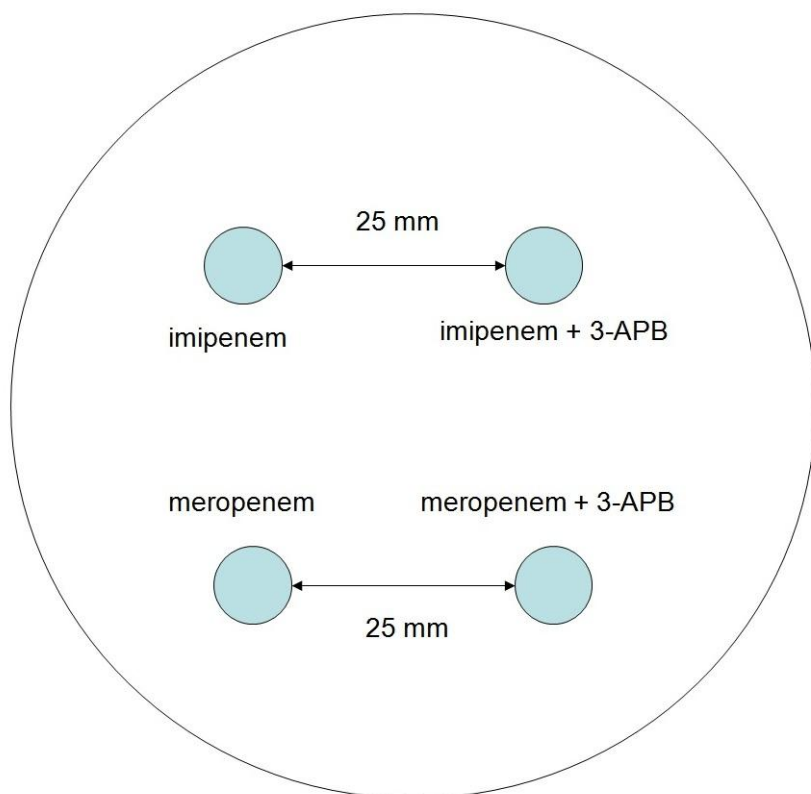
Kmeny byly testovány Etestem pro detekci MBL a následujícími třemi agarovými difúzními testy, CD-testem k detekci serinových karbapenemáz třídy A, MBL-testem (modifikovaný double disk synergy test pro detekci MBL) a tzv. Combi-testem (kombinovaný test pro současnou detekci serinových karbapenemáz a/nebo MBL) (65, 66, 67). Dále byl použit modifikovaný Hodge test (mHodge test) a Carba NP test (68, 69).

CD-test používá následující disky: imipenem, imipenem s 3-aminofenylboritou kyselinou (3-APB), meropenem, a meropenem s 3-APB (Obrázek 10). V případě produkce serinových karbapenemáz se inhibiční zóna (IZ) kolem disku karbapenemu s 3-APB zvětší minimálně o 5 mm ve srovnání s IZ kolem samotného karbapemu. MBL-test používá centrální disk s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA), imipenem, imipenem s EDTA, meropenem a meropenem s EDTA (Obrázek 11). Pozitivní výsledek je definován jako zvětšení IZ okolo disku s inhibitory minimálně o 5 mm ve srovnání s IZ okolo samotného karbapenemu, a/nebo jako přítomnost tzv. fantomových zón či protažení IZ ve směru k centrálnímu disku s EDTA. Combi-test používá disky meropenemu, meropenemu s 3-APB, meropenemu s EDTA a meropenemu s oběma inhibitory (Obrázek 12). Pozitivní výsledek se projeví jako zvětšení IZ kolem disku s inhibitory minimálně o 5 mm ve srovnání s IZ kolem karbapenemu samotného, popř. jako protažení IZ ve směru k disku se specifickým inhibitory.

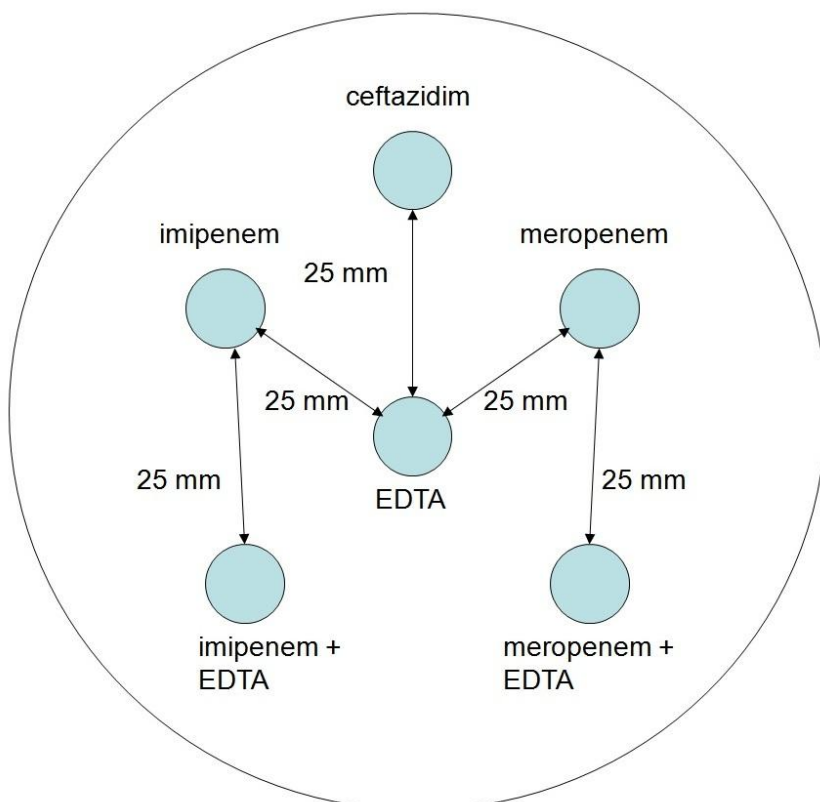
Modifikovaný Hodge test (mHodge test) umí detekovat všechny třídy serinových karbapenemáz a/nebo MBL, není však vhodný pro použití v případě *Pseudomonas aeruginosa*. V případě pozitivního výsledku enzym rozkládající karbapenemové antibiotikum, které je umístěné ve středu masopeptonového agaru, umožňuje růst karbapenem-citlivému kmeni (*Escherichia coli* ATCC 25922) směrem k disku s karbapenemem.

Carba NP test byl představen dvojicí Nordmann a Poirel v roce 2012 jako jednoduchá a levná metoda založená na hydrolýze imipenemu, která s vysokou senzitivitou a specificitou detekuje produkci karbapenemáz u enterobakterií i gramnegativních nefermentujících bakterií (např. *Pseudomonas aeruginosa*). Princip spočívá ve změně barvy indikátoru pH (fenolová červen) na základě kyselé reakce při hydrolýze imipenemu, pokud je přítomna karbapenemáza. Modifikací testu lze zjistit také typ karbapenemázy na základě použití specifického inhibitoru. Tento tzv. Carba NP II test umí rozlišit mezi serinovými karbapenemázami, metalo-beta-laktamázami a enzymy typu OXA-48. Kritéria pozitivních výsledků jsou zobrazeny v tabulce 4.

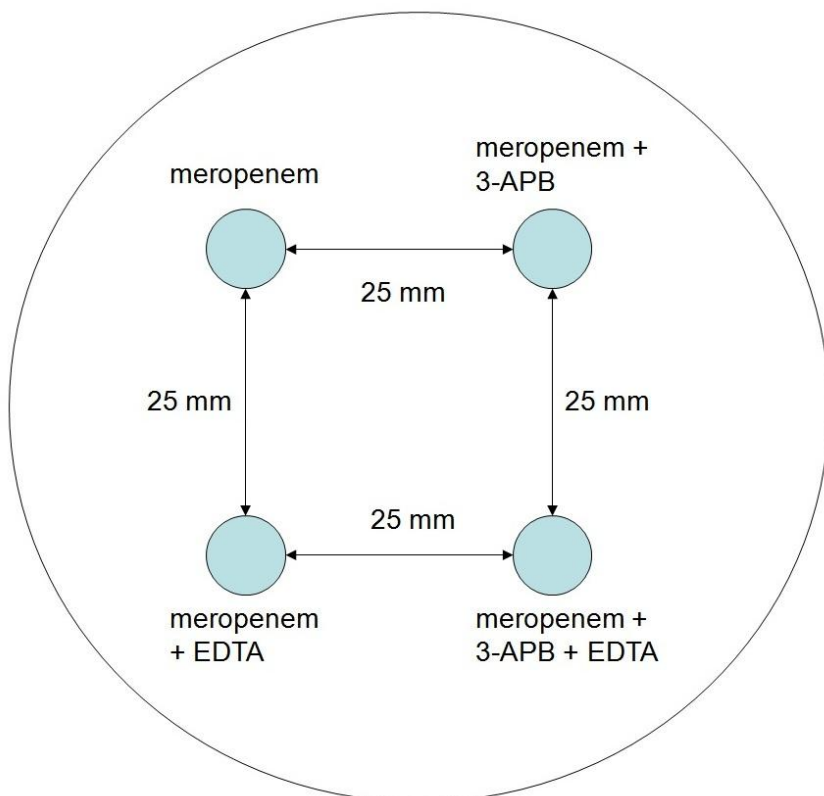
**Obrázek 10.** CD-test pro detekci serinových karbapenemáz třídy A



**Obrázek 11.** MBL-test pro detekci metalo-beta-laktamáz



**Obrázek 12.** Combi-test pro detekci serinových karbapenemáz třídy A a metallo-beta-laktamáz

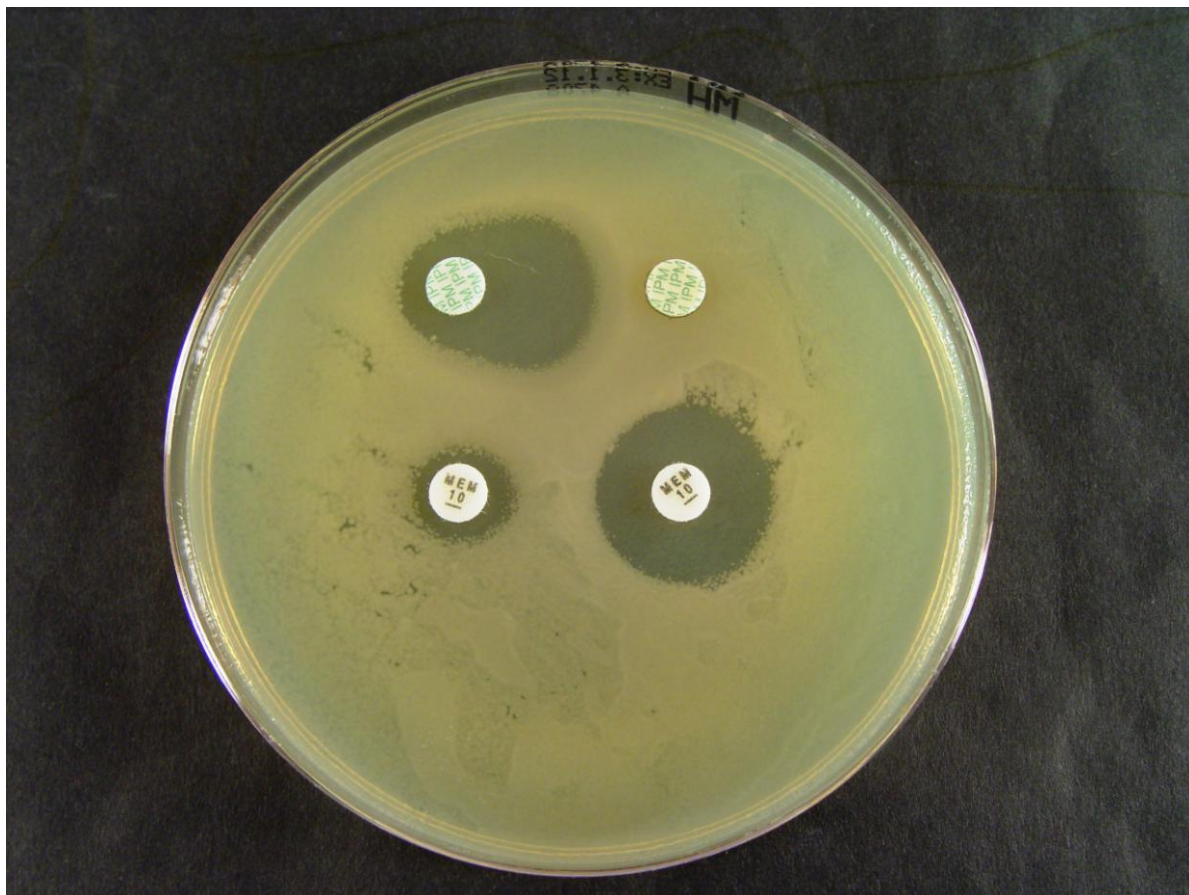


**Tabulka 4.** Kritéria pozitivních testů pro detekci enterobakterií a gramnegativních nefermentujících tyčků produkujících karbapenemázy.

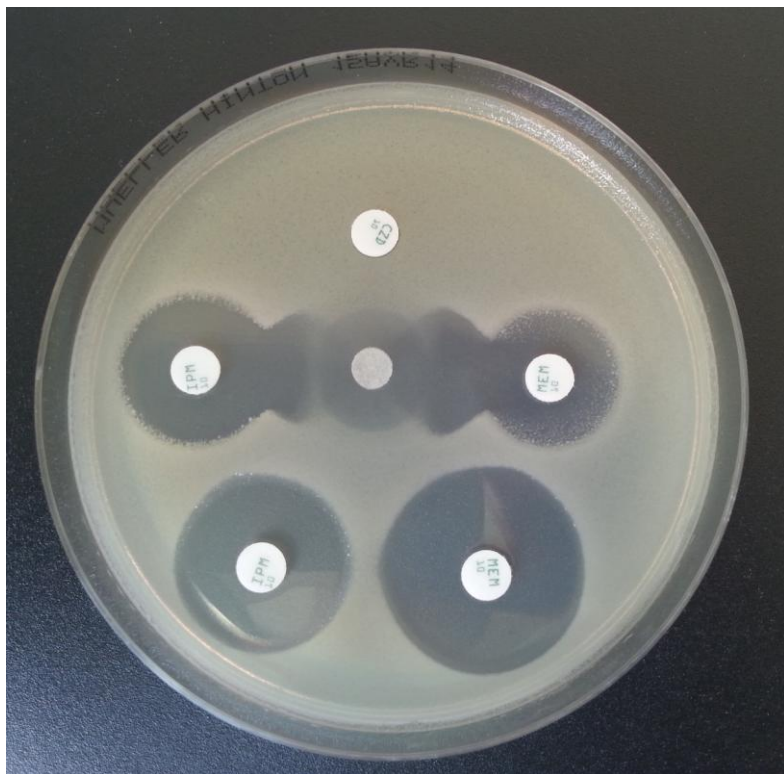
Test	Detekce serinových karbapenemáz třídy A	Detekce metalo-beta-laktamáz třídy B
CD test	Rozšíření/protažení inhibiční zóny směrem k disku s 3-APB a/nebo zvětšení průměru inhibiční zóny aspoň o 5 mm kolem disku s 3-APB (Obrázek 13)	
MBL test		Rozšíření/protažení inhibiční zóny směrem k disku s EDTA a/nebo přítomnost fantomových zón či zvětšení průměru inhibiční zóny aspoň o 5 mm kolem disku s EDTA (Obrázek 14)
Combi test	Rozšíření inhibiční zóny směrem k disku s 3-APB a/nebo zvětšení průměru inhibiční zóny aspoň o 5 mm kolem disku s 3-APB	Rozšíření inhibiční zóny směrem k disku s EDTA a/nebo zvětšení průměru inhibiční zóny aspoň o 5 mm kolem disku s EDTA (Obrázek 15)
MBL Etest		Minimálně čtyřnásobný pokles MIC karbapenemu s inhibitorem (imipenem s EDTA, meropenem s EDTA) oproti samotnému karbapenemu, popř. přítomnost fantomové zóny. (Obrázek 16)
mHodge test	Růst karbapenem-citlivého kmene ( <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922) směrem k centrálnímu disku s karbapenemem ve směru čáry inokulovaného testovaného karbapenemáza-produkujícího kmene. (Obrázek 17)	Růst karbapenem-citlivého kmene ( <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922) směrem k centrálnímu disku s karbapenemem ve směru čáry inokulovaného testovaného karbapenemáza-produkujícího kmene.
Carba NP test	Změna barvy z červené na žlutou po 30-90 minutách inkubace.	Změna barvy z červené na žlutou po 30-90 minutách inkubace. (Obrázek 18)



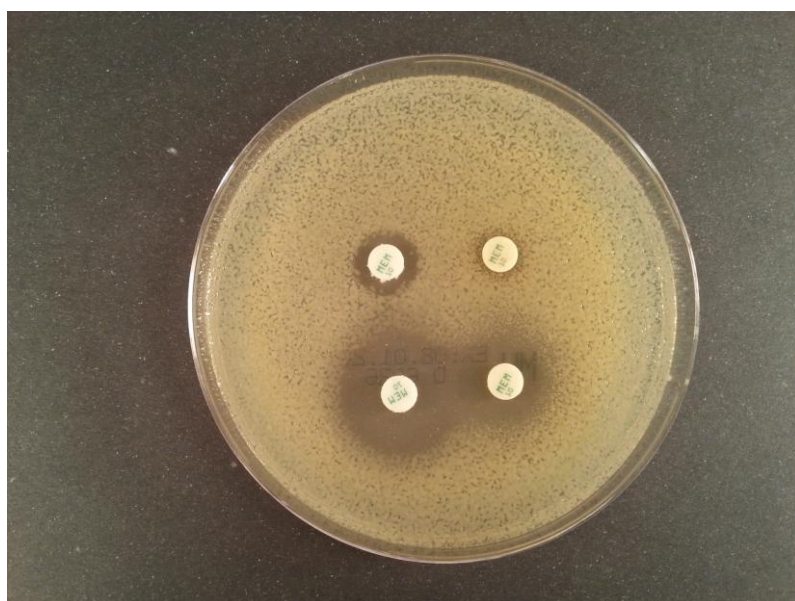
**Obrázek 13.** Zvětšení inhibiční zóny kolem disku s meropenemem a 3-APB o více než 5 mm ve srovnání s diskem se samotným meropenemem deformace zóny u disku s imipenemem ve směru k disku s inhibitorem u pozitivního CD-testu u kmene *Klebsiella pneumoniae* produkujícího KPC-typ serinové karbapenemázy



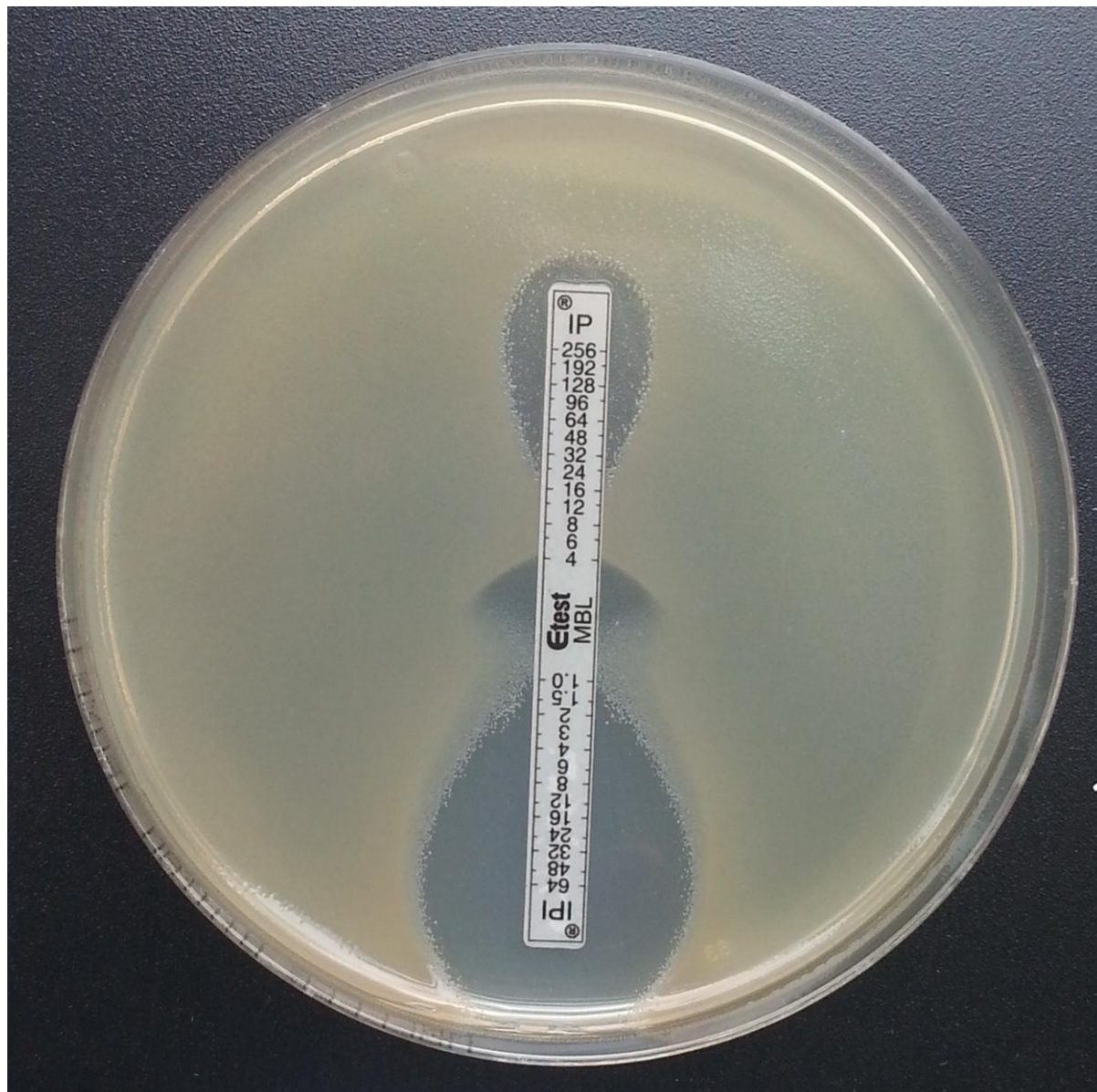
**Obrázek 14.** Zvětšení inhibiční zóny kolem disku s meropenem (imipenemem) a EDTA o 5 mm ve srovnání s diskem se samotným meropenem (imipenemem) a viditelná deformace inhibičních zón směrem k centrálnímu disku s EDTA u pozitivního MBL testu u kmene *Klebsiella pneumoniae* produkujícího NDM-1 typ metalo-beta-laktamázy



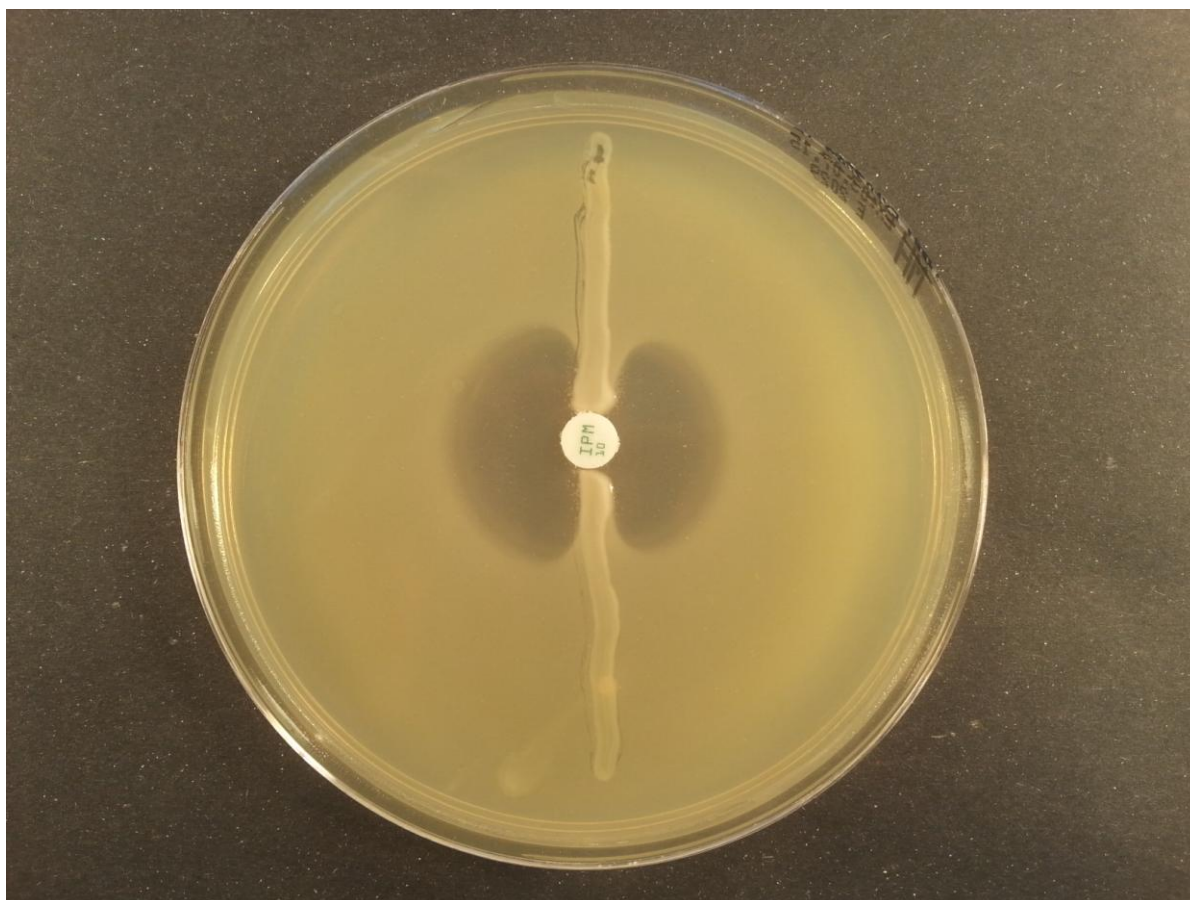
**Obrázek 15.** Zvětšení inhibiční zóny kolem disku s meropenem a EDTA o více než 5 mm ve srovnání s diskem se samotným meropenem u pozitivního Combi testu v případě produkce NDM-1 metalo-beta-laktamázy u kmene *Klebsiella pneumoniae*



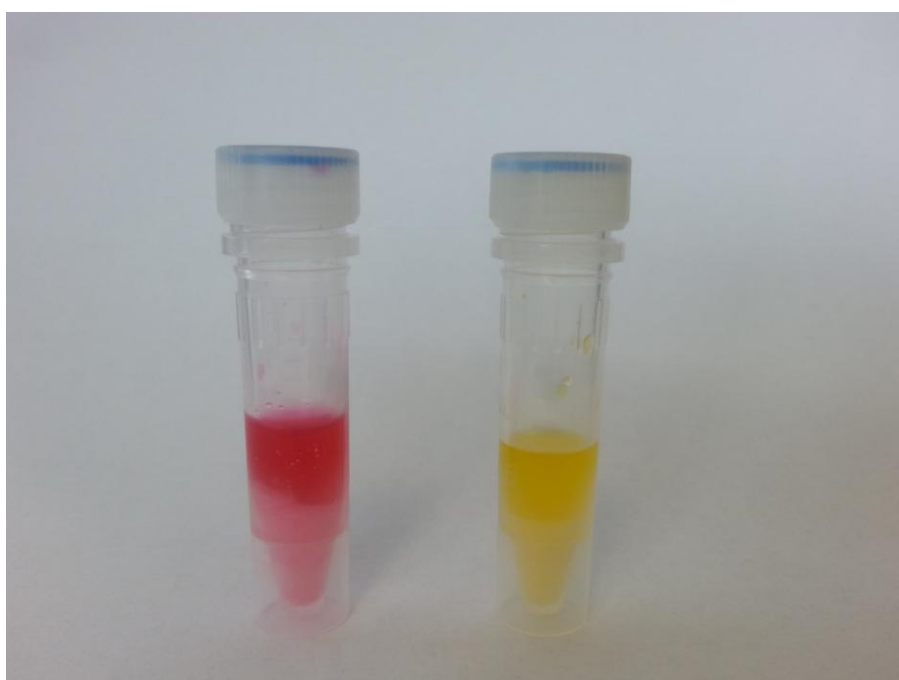
**Obrázek 16.** Pozitivní Etest pro průkaz MBL v případě produkce NDM-1 metalo-beta-laktamázy u kmene *Klebsiella pneumoniae*



**Obrázek 17.** Pozitivní výsledek mHodge testu u dvou kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí KPC enzymů. Indikátorový citlivý kmen *Escherichia coli* roste v okolí testovaného kmene směrem ke středovému disku imipenemu



**Obrázek 18.** Pozitivní Carba NP test (žlutý) oproti negativní kontrole (červená)



### **3.5. Genetické určení širokospektrých beta-laktamáz a karbapenemáz**

Následující kapitoly charakterizují metody použité ke genetické detekci širokospektrých beta-laktamáz.

#### **3.5.1. Genetické určení širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC**

Výskyt ESBL byl detekován využitím PCR a oligonukleotidových primerů zachycujících specifickou oblast *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> a *bla*<sub>CTX-M</sub> (70-72). Získané amplikony byly následně analyzovány pomocí restričních endonukleáz za účelem detekce nejběžnějších mutací zodpovědných za vznik ESBL fenotypu. Pro SHV amplikony byl použit enzym *NheI*, pro TEM enzymy *MspI*, *MseI*, *HphI* a *Sau3AI* (70, 71). Genetická detekce AmpC beta-laktamáz spočívala ve stanovení přítomnosti jednotlivých genů pomocí multiplex PCR (73).

#### **3.5.2. Genetické určení serinových karbapenemáz a metallo-beta-laktamáz**

K detekci genů kódujících produkci metallo-beta-laktamáz a serinových karbapenemáz byla použita polymerázová řetězová reakce (PCR). Byla zvolena sada specifických oligonukleotidových primerů kódujících nejčastěji se vyskytující serinové karbapenemázy patřící do třídy A (NMC, SME, IMI, KPC a GES typy), třídy D (OXA-23 a OXA-48) a metallo-beta-laktamázy (IMP, VIM, SIM typy) (74–82). Jako pozitivní kontrola byl použit kmen se známým zastoupením karbapenemáz (produkující KPC-2 enzym) poskytnutý doc. Ing. J. Hrabákem, Ph.D., z Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni.

Ve vybraných případech byla použita multiplex PCR (LightMix® Modular Assays, firma Roche-Diagnostics) k detekci karbapenemáz typu KPC, NDM-1, VIM (varianty 1-36), IMP (varianty 9, 16, 18, 22, 25), a většiny variant skupiny OXA-48 (162, 163, 181, 204, 232, 244, 245, 247).

#### **3.5.3. Stanovení podobnosti izolátů srovnáním polymorfismu délky štěpných fragmentů**

Pomocí pulzní gelové elektroforézy (PFGE) byla stanovena genetická příbuznost izolátů, a tím hodnoceno případné klonální šíření. Celková genomová DNA byla štěpena restričním enzymem *XbaI* (Roche Diagnostics, Německo), následná separace takto naštěpených fragmentů probíhala pomocí PFGE na přístroji CHEF-DRII System (Bio-rad, USA). Restriční mapy jednotlivých izolátů byly porovnány za použití softwaru GelCompar II, version 2.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Identičnost, resp. jedinečnost kmenů byla určena na základě sestavení dendrogramů.

### **3.6. Hodnocení selekčního tlaku**

Vlastní stanovení selekčního tlaku bylo hodnoceno podle korelace spotřeby antibiotik a bakteriální rezistence ve FNOL ve sledovaném období.

#### **3.6.1. Stanovení spotřeby antibiotik**

Definované denní dávky pro jednotlivá antibiotika byly vyjádřeny v absolutní (celkové) roční spotřebě (DDDatb) na základě ATC/DDD klasifikace (83). Relativní roční spotřeba antibiotik (RDDDatb) byla určena jako počet definovaných denních dávek na 100 ošetrovacích dnů/lůžkodnů podle následujícího vzorce:  $RDDDatb = DDDatb \times 100 / \text{počet lůžkodnů}$  (84). Data byla získána z Ústavu farmakologie FNOL.

#### **3.6.2. Hodnocení vztahu mezi spotřebou antibiotik a bakteriální rezistencí**

Pro zhodnocení selekčního tlaku byl studován vztah mezi rezistencí sledovaných bakteriálních druhů k vybraným antibiotikům a spotřebou relevantních skupin antibiotik. Dále byl hodnocen vztah mezi rezistencí a spotřebou sekundárního antibiotika, tj. spotřebou léčiva z jiné antibiotické skupiny. Vztah mezi četností kmenů rezistentních k danému antibiotiku a spotřebou antibiotik potenciálně vykazujících selekční tlak byl analyzován lineární regresní analýzou pomocí Spearmanovy korelace. Statistická významnost byla stanovena pro  $p < 0,05$ .

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Možnosti fenotypových metod pro detekci širokospektrých beta-laktamáz

Následující kapitoly uvádějí výsledky hodnocení fenotypových metod pro detekci jednotlivých typů širokospektrých beta-laktamáz.

#### 4.1.1. Stanovení senzitivity fenotypových metod pro detekci širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC

Celkem bylo testováno 106 kmenů čeledi *Enterobacteriaceae*. Z tohoto souboru bylo pomocí PCR a přímým sekvenováním potvrzeno 85 kmenů jako producenti ESBL a 21 kmenů jako producenti AmpC enzymů (Tabulka 5). Za použití mikrodiluční metody s kritérii CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) z roku 2009 vysoké procento kmenů vykazovalo falešnou citlivost k širokospektrým cefalosporinům: cefoperazon (21 % pro ESBL a 76 % pro AmpC), cefotaxim (29 % a 67 %), ceftazidim (32 % a 29 %) a cefepim (60 % pro ESBL). Falešná citlivost se ukázala rovněž při použití kritérií CLSI u diskové difúzní metody (cefoperazon 9 % pro ESBL a 43 % pro AmpC; cefotaxim 8 % a 14 %; ceftazidim 45 % a 14 %; cefepim 52 %). Poté, co byly sníženy hraniční zóny pro cefepim, cefotaxim a ceftazidim na 1 mg/l, jak je uvedeno v doporučeních EUCAST, procento falešné citlivosti u testovaných ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií signifikantně pokleslo. Výsledky jsou sumarizovány v tabulkách 6 a 7.

Co se týká hodnocení dalších metod k detekci širokospektrých beta-laktamáz, automatizovaný systém Phoenix rozpoznal ESBL s vysokou senzitivitou (99 %), ale v případě AmpC-pozitivních kmenů dosáhl pouze 38% senzitivity. Vysoké senzitivity bylo dosaženo, pokud se použily testy specifické pro daný typ širokospektré beta-laktamázy za použití příslušného inhibitoru. ESBL Etest detekoval ESBL v 95 % případů. Modifikovaný DDST vykázal 100% senzitivitu pro ESBL a modifikovaný AmpC test s 3-aminofenylboritou kyselinou detekoval správně 95 % AmpC-pozitivních kmenů. Ve skupině ESBL-pozitivních kmenů mělo 87 % MIC cefoxitinu  $\leq 16$  mg/l a poměr MIC cefoperazonu a kombinovaného cefoperazonu se sulbaktamem  $\geq 4:1$ . Senzitivita modifikované mikrodiluční metody pro AmpC beta-laktamázy byla 95 % (Tabulka 8).

**Tabulka 5.** Soubor ESBL- a AmpC-pozitivních izolátů k určení senzitivit fenotypových metod

Species	Počet	Typ širokospektré beta-laktamázy
<i>Escherichia coli</i>	50	ESBL (CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M)-15, CTX-M-27, SHV-12)
	4	AmpC (CMY-2)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	33	ESBL (SHV-2, SHV-2a, SHV-12, CTX-M-1-like, CTX-M-9-like)
	11	AmpC (DHA)
<i>Serratia marcescens</i>	2	ESBL (SHV-12)
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	AmpC (EBC)
<i>Citrobacter freundii</i>	2	AmpC (CIT)
<i>Providencia rettgeri</i>	1	AmpC (DHA)

**Tabulka 6.** Procento falešné citlivosti k cefalosporinům III. a IV. generace ve skupině ESBL a AmpC producentů za použití mikrodiluční metody

Antibiotikum	Falešná citlivost (%)					
	CLSI kritéria			EUCAST kritéria		
	Breakpoint (mg/l)	ESBL (%)	AmpC (%)	Breakpoint (mg/l)	ESBL (%)	AmpC (%)
cefoperazon	≤16	21	76	nestanoven	N	N
cefotaxim	≤8	29	67	≤1	7	43
ceftazidim	≤8	32	29	≤1	5	5
cefepim	≤8	60	N	≤1	8	N

Legenda: N – nehodnoceno

**Tabulka 7.** Procento falešné citlivosti k cefalosporinům III. a IV. generace ve skupině ESBL a AmpC producentů za použití diskové difúzní metody

Antibiotikum	Falešná citlivost (%)					
	CLSI kritéria			EUCAST kritéria		
	Breakpoint (mm)	ESBL (%)	AmpC (%)	Breakpoint (mm)	ESBL (%)	AmpC (%)
cefoperazon	≥21	9	43	nestanoven	N	N
cefotaxim	≥23	8	14	≥21	11	29
ceftazidim	≥18	45	14	≥20	38	10
cefepim	≥18	52	N	≥24	19	N

Legenda: N – nehodnoceno



**Tabulka 8.** Senzitivita testovaných fenotypových metod ve skupině ESBL a AmpC producentů

Fenotypová metoda	Senzitivita (%)	
	ESBL	AmpC
Phoenix	99	38
mDDST	100	N
mAmpC test	N	95
mMIC	87	95
ESBL Etest	95	N

Legenda: N – nehodnoceno, mDDST – modifikovaný “double-disk synergy test”, mAmpC test – modifikovaný AmpC diskový test, mMIC – modifikovaná mikrodiluční metoda

#### 4.1.2. Stanovení senzitivity fenotypových metod pro detekci karbapenemáz

Celkem bylo testováno 119 kmenů čeledi *Enterobacteriaceae*. Všechny kmeny z tohoto souboru byly pomocí multiplex PCR potvrzeny jako nositelé genů pro karbapenemázy, u 101 kmenů byl detekován gen pro serinové karbapenemázy třídy A (KPC), u dalších 14 kmenů MBL (6 NDM-1 a 8 VIM) a 4 kmenů OXA-48 (Tabulka 9). U testovaných kmenů byly stanoveny hodnoty MIC ke třem karbapenemům pomocí diluční difúzní metody (Etest). Rozmezí hodnot MIC byly 0,064 – >32 mg/l pro meropenem, 0,5 – >32 mg/l pro imipenem a 0,5 – >32 mg/l pro ertapenem. MIC<sub>90</sub> a MIC<sub>50</sub> byly vypočítány pro jednotlivá antibiotika takto: meropenem 32 mg/l, resp. 6 mg/l, imipenem >32 mg/l, resp. 6 mg/l a ertapenem >32 mg/l, resp. 16 mg/l. Za použití kritérií EUCAST byla prokázána falešná citlivost k imipenemu u 13 % kmenů, meropenemu 12 % a ertapenemu 2 %. Falešná citlivost se významně lišila u izolátů podle produkovaného typu karbapenemázy (tabulka 10). Z uvedených výsledků vyplývá, že nejvyšší senzitivitu pro screeningový záchyt karbapenemáz na základě hodnoty MIC a rezistence ke karbapenemům vykazuje ertapenem vzhledem k nejnižšímu procentu falešně citlivých kmenů.

Metody, jejichž senzitivita byla hodnocena, byly následující: mHodge test, Carba NP test, Etest pro MBL a diskové difúzní metody (CD-test, MBL-test a Combi-test). Nejvyšší senzitivitu vykázal mHodge test (97 %), který vykázal 100% senzitivitu v případě KPC a OXA enzymů, nicméně v případě MBL jeho senzitivita činila pouhých 71 %. Diskové difúzní testy s přítomností specifických inhibitorů nevykázaly samostatně vysokou senzitivitu (79 %, 79 %, resp. 88 %), nicméně kombinace všech tří testů pomohla zvýšit senzitivitu této metody na 92 %. Z výsledků vyplývá, že Combi test pro detekci KPC a MBL enzymů je funkční pouze za použití meropenemu jako substrátu. V případě použití imipenemu senzitivita tohoto testu činila pouze 10 %. V našem srovnání dosáhl 92% senzitivity i Carba NP test, který navíc

disponuje výhodou detekce OXA enzymů. Velmi nízkou senzitivitu (57 %) vykázal Etest pro detekci MBL. Výsledky jsou sumarizovány v tabulce 11.

**Tabulka 9.** Soubor enterobakterií produkujících karbapenemázy k určení senzitivity použitých fenotypových metod

Species	Počet	Typ karbapenemázy
<i>Escherichia coli</i>	1	KPC
	1	NDM-1
	1	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	KPC
	3	NDM-1
	2	OXA-48
	1	VIM
<i>Citrobacter freundii</i>	2	VIM
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	VIM
	1	OXA-48
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	NDM-1
	1	VIM
<i>Hafnia alvei</i>	1	VIM

**Tabulka 10.** Procento falešné citlivosti ke karbapenemům za použití Etestu podle kritérií EUCAST

	Breakpoint pro citlivé kmeny(mg/l)	Falešná citlivost (%)			
		KPC	MBL	OXA	CELKEM
meropenem	≤2	5	43	75	12
imipenem	≤2	7	43	75	13
ertapenem	≤0,5	0	0	50	2

**Tabulka 11.** Senzitivita testovaných fenotypových metod v jednotlivých skupinách producentů karbapenemáz

Fenotypová metoda	Senzitivita (%)			
	KPC	MBL	OXA	CELKEM
mHodge test	100	71	100	97
CD-test	79	N	N	N
MBL test	N	79	N	N
Combi test s meropenemem	90	71	N	88
Combi test s imipenemem	6	36	N	10
MBL Etest	N	57	N	N
CD-test, MBL test a Combi test s meropenemem	N	N	N	92
Carba NP test	99	50	50	92

Legenda: N – nehodnoceno

## **4.2. Analýza enterobakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC**

Následující kapitoly charakterizují výskyt producentů širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC u jednotlivých skupin pacientů a v nemocničním prostředí.

### **4.2.1. Gastrointestinální nosičství ESBL- a AmpC- pozitivních enterobakterií u komunitních a hospitalizovaných pacientů**

Celkem bylo v období 1. 3. 2010 – 1. 5. 2010 vyšetřeno 378 rektálních výtěrů od hospitalizovaných pacientů ve FNOL a 901 rektálních výtěrů od komunitních pacientů olomouckého regionu. Na selektivním chromagaru vyrostlo 76 bakteriálních kultur z celkového počtu 1279 vzorků. Následnou fenotypovou detekcí bylo potvrzeno 60 ESBL- a 11 AmpC-pozitivních enterobakterií. Nejčastější species s produkcí ESBL byly *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae* (93 %); nejčastěji izolované AmpC-pozitivní bakterie byly *Escherichia coli* a *Citrobacter freundii* (55 %). Detailní distribuci typů širokospektrých beta-laktamáz v souboru ukazuje tabulka 12.

Prevalence ESBL-pozitivních enterobakterií v gastrointestinálním traktu hospitalizovaných pacientů FNOL byla 8 %. Nejčastějším species v souboru ESBL-pozitivních nemocničních kmenů byla *Klebsiella pneumoniae* (61 %), v souboru kmenů z komunitního prostředí se jednalo o *Escherichia coli* (90 %). Co se týká AmpC-pozitivních kmenů, pouze jeden byl zachycen v souboru nemocničních pacientů, deset z jedenácti bylo zachyceno v komunitním prostředí s prevalencí 1 %. Genetická analýza určila jako nejvíce prevalující ESBL-genotyp CTX-M (95 %), a to jak v nemocničním, tak v komunitním prostředí. V případě AmpC potvrdila multiplex PCR přítomnost genu u 9 kmenů z jedenácti. V každém izolátu byl detekován pouze jeden produkt PCR. U šesti kmenů (55 %) se jednalo o typ CIT, u dvou typ DHA a jeden kmen byl typu EBC.

V souboru nemocničních kmenů byla zkoumána příbuznost, resp. identičnost izolátů pomocí PFGE. V případě *Escherichia coli* byly izoláty jedinečného restričního profilu. V případě *Klebsiella pneumoniae* byly pozorovány jedna šestice, jedna trojice a jedna dvojice identických izolátů. Vzhledem k tomu, že tyto byly izolovány od různých pacientů, jedná se o klonální šíření z exogenního zdroje.

**Tabulka 12.** Distribuce ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií v gastrointestinálním traktu hospitalizovaných pacientů FNOL a pacientů z komunitního prostředí olomouckého regionu (absolutní počty kmenů)

	Celkový počet izolátů		Hospitalizovaní pacienti		Komunitní pacienti	
	ESBL	AmpC	ESBL	AmpC	ESBL	AmpC
<i>Escherichia coli</i>	35	3	9	0	26	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21	0	19	0	2	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	1	2	1	1	0
<i>Citrobacter freundii</i>	0	3	0	0	0	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	2	0	0	0	2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0	1	0	0	0
<i>Citrobacter werkmanii</i>	0	1	0	0	0	1
<i>Morganella morganii</i>	0	1	0	0	0	1
<b>CELKEM</b>	<b>60</b>	<b>11</b>	<b>31</b>	<b>1</b>	<b>29</b>	<b>10</b>

#### 4.2.2. Gastrointestinální nosičství ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií u hemato-onkologických pacientů

Do zkoumaného souboru hemato-onkologických pacientů s diagnózou febrilní neutropenie a komplikujícími bakteriálními infekcemi bylo v období 1. 11. 2012 – 1. 3. 2013 celkem zařazeno 71 pacientů. Nejčastěji se objevily diagnózy akutní myeloblastická leukemie, akutní lymfoblastická leukemie, chronická lymfocytická leukemie, chronická myelomonocytární leukémie, mnohočetný myelom, Hodgkinův lymfom, B-buněčný lymfom z velkých buněk a jiné non-hodgkinovy lymfomy. Mezi pacienty bylo 43 mužů a 28 žen ve věkovém rozmezí 21-76 let. Průměrný věk byl 54 let, medián 58 let. Ve sledovaném období 46 pacientů (65 %) prodělalo febrilní neutropenii.

Patnáct pacientů (21 %) mělo ve svém gastrointestinálním traktu (GIT) zachyceno kmen čeledi *Enterobacteriaceae* produkující širokospektré beta-laktamázy. ESBL- a AmpC-pozitivní enterobakterie byly nalezeny u 8 (11 %), resp. 7 (10 %) pacientů. Ze skupiny ESBL-pozitivních enterobakterií nejčastější species byly *Klebsiella pneumoniae* (75 %), *Escherichia coli* (13 %) a *Enterobacter aerogenes* (13 %). AmpC-pozitivní species byly *Citrobacter freundii* (43 %), *Enterobacter cloacae* (29 %), *Escherichia coli* (14 %) a *Klebsiella pneumoniae* (14 %).

Z 15 pacientů, kteří měli GIT kolonizovaný producentem širokospektrých beta-laktamáz, pouze jeden byl hospitalizován poprvé. 13 pacientů (87 %) bylo hospitalizováno na hemato-onkologické klinice v předchozích 6 měsících (rozmezí předchozích hospitalizací 3-58 dní, průměrná délka 21 dnů).

Průměrná délka hospitalizace byla 25 dní (rozmezí 3–70 dní). Pouze jeden pacient byl v době hospitalizace bez významné antibiotické léčby (profylakticky rifaximin per os), ostatní pacienti užívali v průběhu hospitalizace nebo v období 60 dní před záchytem bakterie s produkcí širokospektrých beta-laktamáz ze stolice následující antibiotika nebo jejich kombinaci: amoxicilin s kyselinou klavulanovou, cefuroxim, piperacilin s tazobaktamem, meropenem, imipenem, gentamicin, amikacin, ciprofloxacín, klaritromycin, klindamycin, teikoplanin a vankomycin.

Ze skupiny 15 pacientů s nosičstvím ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií v GIT prodělalo 9 pacientů (60 %) febrilní neutropenii. V kontrolní skupině (bez záchytu ESBL- a AmpC-pozitivního kmene v GIT) se rovněž objevila febrilní neutropenie, a to v 66 %. Nebylo tedy prokázáno, že by nosičství enterobakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy v GIT bylo rizikovým faktorem vzniku febrilní neutropenie.

PCR odhalila přítomnost genu pro beta-laktamázy ze skupiny CTX-M-1-like u sedmi ESBL-pozitivních izolátů (88 %), gen *bla<sub>SHV</sub>* byl detekován v šesti případech (75 %) a gen *bla<sub>TEM</sub>* byl prokázán u všech ESBL-pozitivních izolátů. U izolátů produkujících AmpC byly nalezeny geny ze skupiny CIT, DHA a EBC. Distribuce jednotlivých genů kódujících širokospektré beta-laktamázy ukazují tabulky 13 a 14.

Srovnání celogenomové DNA pomocí PFGE u species *Klebsiella pneumoniae* odhalilo pouze jeden identický pár izolátů od dvou různých pacientů a jeden pár s velmi podobným restričním profilem odpovídající pravděpodobně pouze jediné genetické změně.

Ve studovaném období měli dva pacienti s kolonizací ESBL- nebo AmpC-pozitivní enterobakterií v GIT prokázanou bakteriální infekci, způsobenou producentem širokospektrých beta-laktamáz. V jednom případě se jednalo o infekci močového traktu způsobenou ESBL-pozitivním kmenem *Klebsiella pneumoniae*, ve druhém případě byla infekce krevního řečiště způsobena AmpC-pozitivním kmenem *Enterobacter cloacae*. V obou případech byla prokázána identita těchto patogenů s kolonizujícím kmenem v GIT.

**Tabulka 13.** ESBL-pozitivní enterobakterie izolované z GIT 71 hemato-onkologických pacientů a detekované geny kódující širokospektré beta-laktamázy.

Species	Počet izolátů	Typ beta-laktamázy
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	CTX-M-1-like, TEM
<i>Escherichia coli</i>	1	CTX-M-1-like, TEM
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	SHV, TEM
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	CTX-M-1-like, SHV, TEM

**Tabulka 14.** AmpC-pozitivní enterobakterie izolované z GIT 71 hemato-onkologických pacientů a detekované geny kódující širokospektré beta-laktamázy.

Species	Počet izolátů	Typ beta-laktamázy
<i>Citrobacter freundii</i>	2	CIT
<i>Citrobacter freundii</i>	1	CIT, DHA
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	EBC
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	EBC, DHA
<i>Escherichia coli</i>	1	CIT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	DHA

#### 4.2.3. Etiologická agens nozokomiálních pneumonií a jejich rezistence k antibiotikům se zaměřením na enterobakterie produkující širokospektré beta-laktamázy

Ve sledovaném období bylo zařazeno celkem 155 pacientů, od 140 pacientů bylo získáno 264 bakteriálních izolátů, u 15 pacientů bylo kultivační vyšetření negativní.

Přehled všech získaných patogenů zobrazuje tabulka 15. Lze pozorovat převahu gramnegativních bakterií (81 %), především kmenů *Pseudomonas aeruginosa* (17 %), *Klebsiella pneumoniae* (17 %) a *Escherichia coli* (12 %). Enterobakterie tvoří téměř polovinu (48 %) etiologických agens nozokomiálních pneumonií (HAP). Z grampozitivních patogenů byl nejčastější *Staphylococcus aureus*, ale v rámci celého souboru představuje pouze 9 %.

Rezistenci k antibiotikům u tří nejčastějších patogenů ukazují grafy 1-3. Z uvedených údajů je zřejmé, že rezistence kmenů *Klebsiella pneumoniae* k cefalosporinům III. a IV. generace, fluorochinolonům, gentamicinu, kotrimoxazolu a piperacilin/tazobaktamu přesahuje 50% hranici. Dobrou citlivost si toto species zachovává k meropenemu, kolistinu a relativně i amikacinu a tigecyklinu. V případě *Pseudomonas aeruginosa* byla zaznamenána vysoká rezistence k ciprofloxacinu (50 %), meropenemu (50 %), piperacilin/tazobaktamu (42 %), ceftazidimu (40 %) a cefepimu (38 %). Relativně dobrou účinnost na toto species vykazují aminoglykosidy. Na kolistin, stejně jako v případě *Klebsiella pneumoniae*, bylo citlivých 100 % kmenů. Co se týče *Escherichia coli*, vysokou rezistenci vykazují kmeny k aminopenicilinům, včetně kombinací s inhibitory bakteriálních beta-laktamáz, (79 %, resp. 39 %), piperacilinu (68 %) a kotrimoxazolu (42 %). Méně než pětina kmenů je odolných k cefalosporinům III. i IV. generace, aminoglykosidům a fluorochinolonům. K meropenemu, tigecyklinu a kolistinu byly citlivé všechny kmeny *Escherichia coli*.

Fenotypové testy prokázaly produkci širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC u 37 % enterobakterií (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Morganella morganii* a *Hafnia alvei*), které byly potvrzeny detekcí genů

pro CTX-M, SHV, TEM beta-laktamázy nebo CIT, EBC, ACC a DHA enzymy. Nebyly detekovány žádné bakterie produkující karbapenamázy.

Nemocniční mortalita byla stanovena na 30 %, přičemž u 25 pacientů nebylo možné dohledat data po přeložení na jiný doléčovací ústav a tito byli z hodnocení vyřazeni. Nejčastěji byly s úmrtím pacienta asociovány enterobakterie (26 případů) a gramnegativní nefermentující tyčky (15). Grampozitivní bakterie byly izolovány jen u dvou případů úmrtí (*Staphylococcus aureus*).

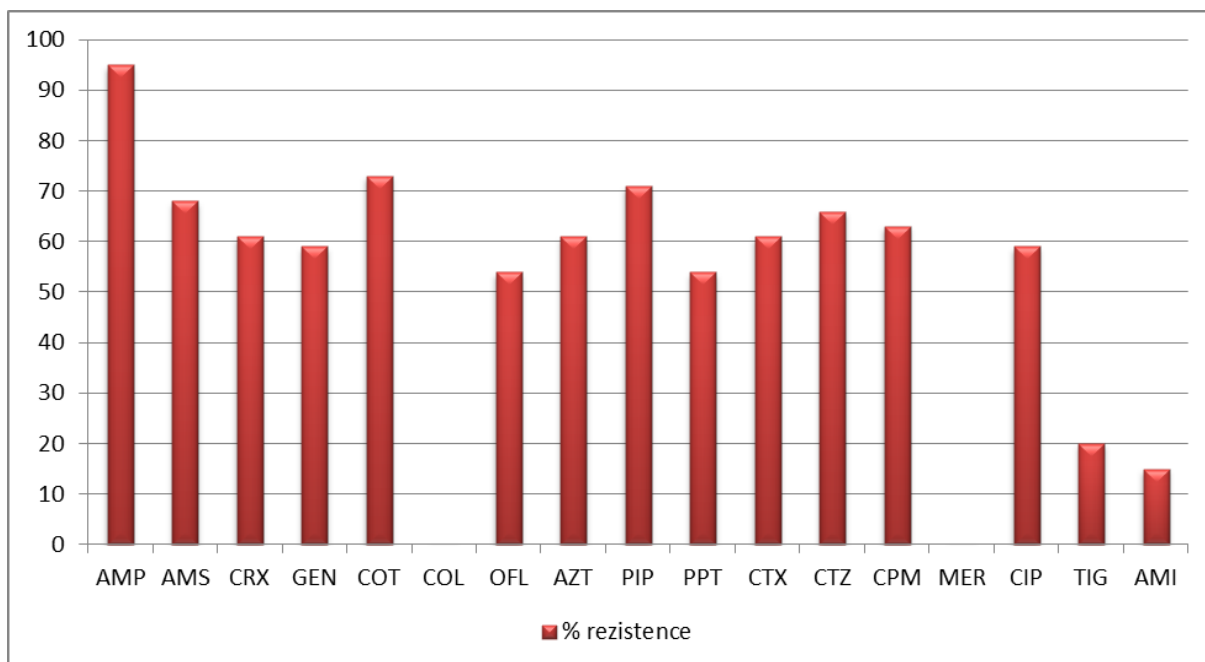
Adekvátnost iniciální antibiotické terapie byla hodnocena na základě určení bakteriální rezistence k antimikrobním přípravkům a aplikace antibiotik v den odběru vzorku. Z tohoto hodnocení vyplývá, že adekvátní léčbu (byla potvrzena citlivost bakteriálních patogenů) obdrželo 51 % pacientů.

**Tabulka 15.** Zastoupení jednotlivých bakteriálních druhů jako etiologických agens HAP (počty v absolutní hodnotě)

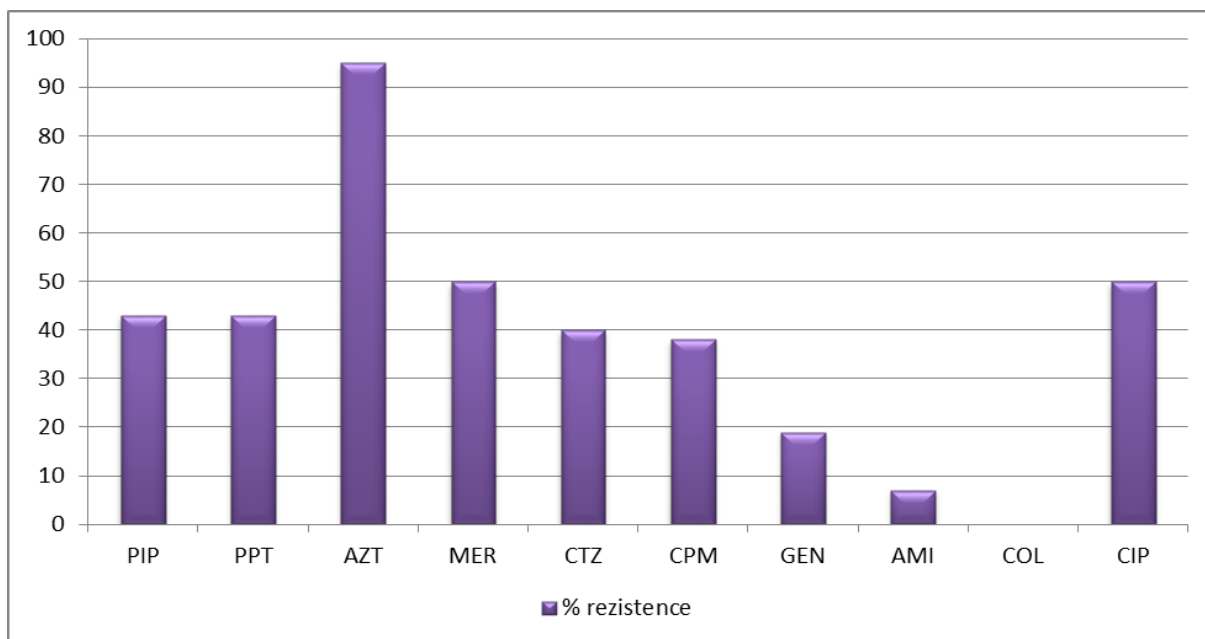
	TN	FN Brno	FN HK	FNOL	Celkem
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	8	14	14	44
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	8	12	9	44
<i>Escherichia coli</i>	8	7	12	4	31
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	14	6	2	25
<i>Enterococcus sp.</i>	9	0	1	9	19
<i>Enterobacter sp.</i>	5	7	5	2	19
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	1	12	0	13
<i>Burkholderia cepacia</i> komplex	3	0	7	3	13
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	8	0	4	12
<i>Serratia marcescens</i>	4	1	3	3	11
<i>Haemophilus influenzae</i>	0	9	0	0	9
<i>Proteus mirabilis</i>	2	2	0	2	6
<i>Acinetobacter sp.</i>	3	1	1	1	6
<i>Citrobacter koseri</i>	2	1	0	0	3
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	1	0	1	3
<i>Morganella morgannii</i>	1	1	0	1	3
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0	2	0	0	2
<i>Hafnia alvei</i>	0	1	0	0	1

Legenda: TN – Thomayerova nemocnice v Praze, FN Brno – Fakultní nemocnice Brno, FN HK – Fakultní nemocnice Hradec Králové, FNOL – Fakultní nemocnice Olomouc

**Graf 1.** Rezistence *Klebsiella pneumoniae* k vybraným antibiotikům u pacientů s nozokomiální pneumonií v ČR

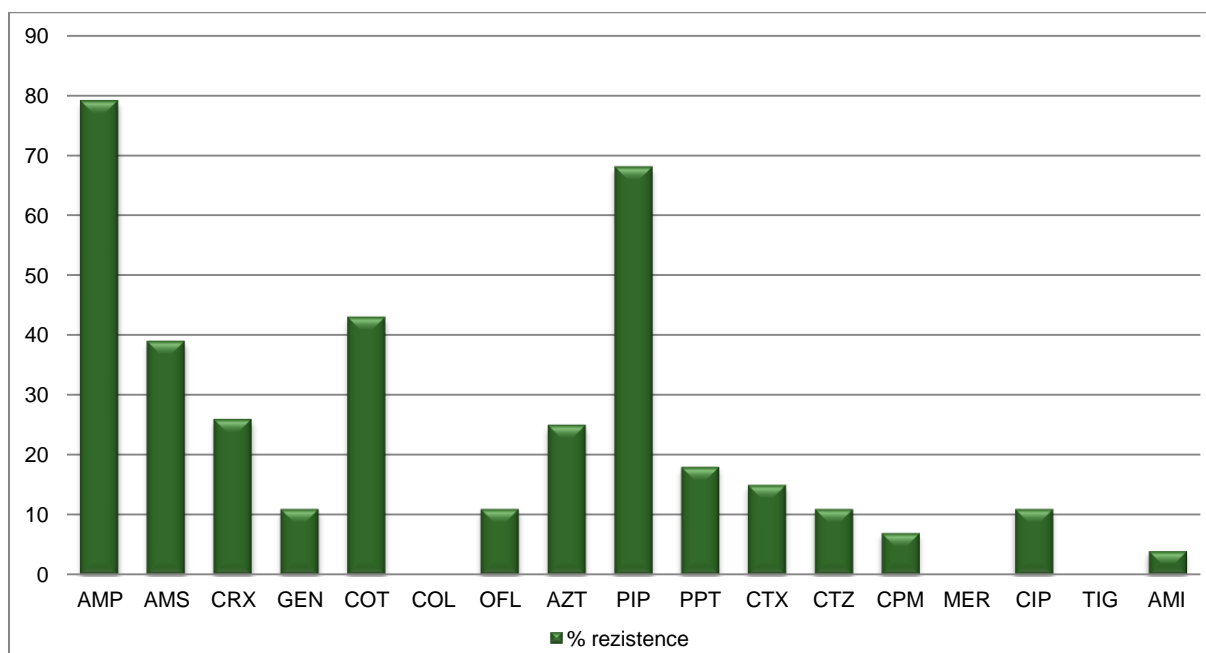


**Graf 2.** Rezistence *Pseudomonas aeruginosa* k vybraným antibiotikům u pacientů s nozokomiální pneumonií v ČR





**Graf 3.** Rezistence *Escherichia coli* k vybraným antibiotikům u pacientů s nozokomiální pneumonií v ČR



#### 4.2.4. Výskyt enterobakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy v prostředí jednotek intenzivní péče

V průběhu trvání studie bylo shromážděno 20 vzorků z ovzduší, 60 vzorků z povrchů a 60 vzorků od zdravotnických pracovníků. Z celkového počtu 140 vzorků obsahovalo 18 vzorků 21 bakteriálních izolátů čeledi *Enterobacteriaceae*. Identifikace jednotlivých izolátů je uvedena v tabulce 16.

Fenotypová analýza odhalila v souboru 21 kmenů z prostředí KARIM a IPCHO čtyři s produkcí ESBL a sedm s produkcí AmpC. Během studie bylo rovněž izolováno 16 kmenů s produkcí širokospektrých beta-laktamáz od pacientů hospitalizovaných na výše uvedených odděleních. Charakteristika jedenácti izolátů z prostředí a šestnácti klinických izolátů je uvedena v tabulkách 17 a 18.

ESBL- a AmpC-pozitivní izoláty stejného species byly podrobeny restriční analýze genomové DNA s následnou PFGE pro určení klonality. Z jedenácti izolátů *Klebsiella pneumoniae* jedna čtveřice a z pěti izolátů *Enterobacter cloacae* jedna trojice byly identické. Je nutno zdůraznit, že všechny tyto klony pocházely pouze z povrchů prostředí, nikoli z klinického materiálu pacientů či stěrů personálu.

**Tabulka 16.** Počet enterobakterií izolovaných z prostředí a personálu KARIM a IPCHO ve FNOL

	Stěry z povrchů		Stěry od personálu	
	KARIM	IPCHO	KARIM	IPCHO
<i>Escherichia coli</i>	0	1	0	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	3	0	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1	0	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	0	0	0
<i>Citrobacter koseri</i>	0	0	0	2
<i>Proteus vulgaris</i>	0	1	0	0
Celkem	10	6	0	5

**Tabulka 17.** Charakteristika ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií izolovaných z prostředí a personálu KARIM a IPCHO ve FNOL

Označení	Species	Lokalita	Oddělení	Fenotyp	Genotyp
M1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Okenní parapet	IPCHO	ESBL	CTX-M SHV TEM
M2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Výpust' dřezu	IPCHO	ESBL	CTX-M TEM
M3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Výpust' umyvadla, pokoj 6	KARIM	AmpC	EBC
M4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Výpust' umyvadla, pokoj 7	KARIM	AmpC	EBC
M5	<i>Enterobacter cloacae</i>	Proplachovací roztok, pokoj 6	KARIM	AmpC	EBC
M6	<i>Enterobacter cloacae</i>	Proplachovací roztok, postel 8	KARIM	AmpC	EBC
M8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Postel 8	KARIM	ESBL	CTX-M SHV
M10	<i>Enterobacter cloacae</i>	Stojan na infúze, postel 8	KARIM	AmpC	EBC
M11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Proplachovací roztok, postel 9	KARIM	AmpC	EBC
M12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Dávkovač pumpy, postel 9	KARIM	AmpC	EBC
M13	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Výpust' dřezu, pokoj 5	KARIM	ESBL	CTX-M TEM

**Tabulka 18.** Charakteristika ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií izolovaných od pacientů hospitalizovaných na KARIM a IPCHO ve FNOL (ve stejné době, kdy probíhala studie jejich výskytu z prostředí)

Označení	Species	Typ vzorku	Oddělení	Fenotyp	Genotyp
M14	<i>Escherichia coli</i>	Výtěr z dutiny ústní	KARIM	ESBL	SHV
M16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hemokultura	IPCHO	ESBL	CTX-M, SHV
M17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Výtěr z rány	IPCHO	ESBL	CTX-M, SHV
M18	<i>Escherichia coli</i>	Moč	KARIM	ESBL	CTX-M, TEM
M19	<i>Serratia marcescens</i>	Sekret z drénu	KARIM	ESBL	SHV
M20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kanyla	KARIM	ESBL	SHV
M21	<i>Escherichia coli</i>	Moč	KARIM	ESBL	CTX-M
M22	<i>Enterobacter cloacae</i>	Výtěr z dutiny ústní	KARIM	AmpC	EBC
M23	<i>Enterobacter cloacae</i>	Bronchoalveolární laváž	IPCHO	AmpC	EBC
M24	<i>Enterobacter cloacae</i>	Sekret z drénu	KARIM	AmpC	EBC
M25	<i>Enterobacter cloacae</i>	Sekret z drénu	KARIM	AmpC	EBC
M26	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Moč	KARIM	AmpC	DHA
M29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Výtěr z rány	KARIM	ESBL	CTX-M, SHV, TEM
M30	<i>Escherichia coli</i>	Výtěr z rány	IPCHO	ESBL	CTX-M, SHV, TEM
M32	<i>Escherichia coli</i>	Sekret z drénu	KARIM	ESBL	CTX-M, SHV, TEM
M34	<i>Enterobacter cloacae</i>	Sekret z drénu	KARIM	AmpC	EBC

### 4.3. Analýza rezistence ke karbapenemům

Následující kapitoly poskytují informace o výskytu enterobakterií a kmenů *Pseudomonas aeruginosa* rezistentních ke karbapenemům a mechanismu této rezistence.

#### 4.3.1. Četnost enterobakterií rezistentních ke karbapenemům ve Fakultní nemocnici Olomouc

Během 17 měsíců bylo vyšetřeno celkem 12605 enterobakterií a získáno 9 kmenů s MIC meropenemu  $\geq 2$  mg/l, což činilo pouhých 0,07 %. Tabulka 19 uvádí druhové určení izolátů a výsledky MIC pro meropenem.

Všechny izoláty vykazovaly při testování modifikovaným Hodgeovým testem negativní výsledky. Stejně tak i kombinovaný test s 3-APB a EDTA, CD-test a mDDST pro MBL neprokázaly produkci serinových karbapenemáz či MBL u žádného z nich. Systém Phoenix rovněž nedetekoval produkci karbapenemáz, avšak u 80 % izolátů upozornil na možnou produkci ESBL. Tabulka 20 shrnuje výsledky fenotypových testů k průkazu karbapenemáz a širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC.

Testované izoláty byly podrobeny PCR analýzám, které nepotvrdily přítomnost genů pro serinové karbapenemázy třídy A, MBL, OXA-23 a OXA-48 enzymy. Prokázaly však přítomnost *bla*<sub>CTX-M</sub> genu u 5 kmenů *Klebsiella pneumoniae* a 1 kmene *Enterobacter cloacae* s potvrzeným ESBL fenotypem. Zbývající ESBL-pozitivní kmen *Klebsiella pneumoniae* byl určen jako producent širokospektré beta-laktamázy SHV-typu. TEM typ ESBL nebyl zaznamenán. Multiplex PCR odhalila u 2 kmenů s fenotypově prokázanou produkcí AmpC beta-laktamáz geny pro enzymy typu DHA a EBC. Výsledky genetického stanovení ukazuje tabulka 21. Z výsledků je zřejmé, že rezistence ke karbapenemům byla u těchto izolátů podmíněna produkcí širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC spolu s jiným přidruženým mechanismem, především sníženou propustností buněčné stěny.

V dalším období 1. 1. 2014 – 31. 1. 2015 bylo vyšetřeno 1229 rektálních výtěrů od 266 pacientů hospitalizovaných na HOK FNOL. U pěti pacientů (2 %) byly detekovány enterobakterie (čtyři kmeny *Klebsiella pneumoniae* a jeden kmen *Serratia marcescens*) rezistentní k meropenemu. Fenotypovými testy byla potvrzena produkce ESBL u všech pěti kmenů. PCR nepotvrdila ani v jednom případě přítomnost genu pro produkci karbapenemáz. Pomocí pulzní gelové elektroforézy byla zjištěna jedinečnost zkoumaných izolátů; potenciální klonální šíření na oddělení tedy nebylo potvrzeno. Rezistence ke karbapenemům byla opět způsobena produkcí širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL spolu s dalším mechanismem (snížená propustnost buněčné stěny nebo eflux).

**Tabulka 19.** Minimální inhibiční koncentrace testovaných enterobakterií k meropenemu

	Species	MIC (E-test)	MIC (Phoenix)	MIC (diluční mikrometoda)
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	8	2
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	8	8
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	8	4
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	4	16
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	2	8
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	2	8
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	4	16
8	<i>Enterobacter cloacae</i>	2	8	2
9	<i>Enterobacter cloacae</i>	4	2	8

**Tabulka 20.** Výsledky fenotypových testů k detekci karbapenemáz a širokospektrých beta-laktamáz

	Species <sup>a</sup>	mHodge test	CD test s rozdílem IZ ≥ 5mm		MBL test	Combi test	mDDST pro ESBL	AmpC test
			pro MER /MER+APB	pro IMI /IMI+APB				
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní	ESBL	negativní
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní	ESBL	negativní
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní	AmpC
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní	ESBL	negativní
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní	ESBL	negativní
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní	ESBL	negativní
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní	ESBL	negativní
8	<i>Enterobacter cloacae</i>	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní	ESBL	negativní
9	<i>Enterobacter cloacae</i>	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní	AmpC

**Tabulka 21.** Výsledky genetické detekce karbapenemáz, ESBL a AmpC

	Species	Genetické stanovení karbapenemáz				Genetické stanovení širokospektrých beta-laktamáz	
		Serinové tř. A	MBL	OXA-23	OXA-48	ESBL	AmpC
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativní	negativní	negativní	negativní	CTX-M	-
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativní	negativní	negativní	negativní	CTX-M	-
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativní	negativní	negativní	negativní	-	EBC
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativní	negativní	negativní	negativní	CTX-M	-
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativní	negativní	negativní	negativní	CTX-M	-
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativní	negativní	negativní	negativní	CTX-M	-
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativní	negativní	negativní	negativní	CTX-M	-
8	<i>Enterobacter cloacae</i>	negativní	negativní	negativní	negativní	SHV	-
9	<i>Enterobacter cloacae</i>	negativní	negativní	negativní	negativní	-	DHA

#### 4.3.2. Výskyt kmenů *Pseudomonas aeruginosa* s rezistencí ke karbapenemům ve Fakultní nemocnici Olomouc a Vojenské nemocnici Olomouc

Během 66 měsíců bylo hodnoceno celkem 11 342 kmenů *Pseudomonas aeruginosa* z klinického materiálu pacientů hospitalizovaných ve FNOL a 1 341 kmenů v případě pacientů VNOL. Jak ukazuje tabulka 22, ve FNOL se prevalence pseudomonád rezistentních k meropenemu zvýšila z 30 % v roce 2008 na 43 % v roce 2013, ve VNOL ze 46 na 56 %. Izolováno a dále zkoumáno bylo celkem 57 meropenem-rezistentních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* od pacientů hospitalizovaných ve FNOL a VNOL během tří měsíců (od 1. 11. 2012 do 31. 1. 2013). Meropenem-rezistentní kmeny byly nejčastěji izolovány z endosekretu (30 %) a moči (20 %). V 32 případech (56 %) se jednalo o pacienty s pneumoniemi, u 8 pacientů (14 %) byla diagnostikována uroinfekce, u 3 (5 %) infekce v místě operačního výkonu, jiná diagnóza byla stanovena u 14 (25 %) nemocných. Produkce metalo-beta-laktamáz a serinových karbapenemáz nebyla prokázána a rezistence k meropenemu byla podmíněna především produkcí AmpC a ztrátou stěnových porinů.

**Tabulka 22.** Rezistence *Pseudomonas aeruginosa* k meropenemu ve FNOL a VNOL (v procentech)

	2008	2009	2010	2011	2012	2013
FNOL	30	30	30	40	37	43
VNOL	46	55	47	59	61	56

Legenda: FNOL – Fakultní nemocnice Olomouc, VNOL – Vojenská nemocnice Olomouc

#### 4.4. Vliv spotřeby antibiotik na rezistenci

Následující kapitoly uvádějí výsledky hodnocení vztahu mezi spotřebou beta-laktamových antibiotik a bakteriální rezistencí.

##### 4.4.1. Vliv selekčního tlaku beta-laktamových antibiotik na rezistenci u vybraných enterobakterií

Za studované období bylo hodnoceno celkem 113027 kmenů čeledi *Enterobacteriaceae*, konkrétně *Escherichia coli* (60262), *Klebsiella pneumoniae* (34417), *Proteus mirabilis* (14724) a *Enterobacter cloacae* (3624). Vývoj bakteriální rezistence k vybraným antibiotikům je dokumentován v tabulce 23. Rezistence k cefalosporinům III. a IV. generace a piperacilinu s tazobaktamem vzrostla u všech studovaných bakteriálních druhů, s výjimkou *Proteus mirabilis*. Například rezistence *Klebsiella pneumoniae* k ceftazidimu se zvýšila z 5 %

v roce 2000 na 40 % v roce 2011. V případě piperacilinu s tazobaktamem byl nárůst ještě větší, z 12 % na 42 %.

Vysoká citlivost k meropenemu (97-100 %) zůstala nezměněna u všech species po celé sledované období.

Relativní roční spotřeba celkového množství antibiotik ve FNOL vzrostla o 21 % mezi lety 2000 a 2011. Absolutní a relativní spotřeba konkrétních antibiotických skupin je zobrazena v tabulce 24. Síla korelace včetně statistické významnosti je ukázána v tabulce 25. Statisticky signifikantní korelace byly nalezeny mezi spotřebou piperacilinu s tazobaktamem a rezistencí *Klebsiella pneumoniae* ( $r=0,85$ ;  $p=0,01$ ) k tomuto antibiotiku, a dále mezi spotřebou piperacilinu s tazobaktamem a rezistencí *Klebsiella pneumoniae* ( $r=0,84$ ;  $p=0,01$ ) a *Escherichia coli* ( $r=0,89$ ;  $p=0,01$ ) k ceftazidimu. U ostatních vztahů mezi spotřebou antibiotik a rezistencí k nim byly nalezeny pouze statisticky nevýznamné korelace. Vývoj spotřeby antibiotik a bakteriální rezistence jsou dokumentovány v grafech 4 a 5.

**Tabulka 23.** Rezistence jednotlivých species k daným antibiotikům v jednotlivých letech studie v procentech

		2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
CPR	KLPN	18	22	19	14	14	16	11	20	42	39	41	41
	ESCO	4	4	2	2	2	3	4	10	11	12	12	11
	ENCL	15	18	22	21	24	15	15	22	30	23	35	32
	PRMI	4	6	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
CTX	KLPN	5	7	6	5	11	12	8	14	38	37	39	40
	ESCO	1	1	1	1	1	1	2	7	9	11	11	10
	ENCL	10	18	23	23	24	18	17	24	29	23	35	32
	PRMI	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
CTZ	KLPN	5	7	6	7	12	17	24	24	42	37	40	40
	ESCO	1	1	1	1	2	2	3	8	10	11	11	10
	ENCL	6	18	23	26	24	19	17	26	30	23	35	32
	PRMI	2	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1
CPM	KLPN	NT	5	4	3	4	3	2	11	34	30	36	36
	ESCO	NT	1	0	0	1	0	1	6	8	10	10	9
	ENCL	NT	8	5	1	4	1	2	2	6	8	5	13
	PRMI	NT	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
MER	KLPN	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
	ESCO	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	ENCL	0	3	0	2	0	2	1	1	1	1	0	0
	PRMI	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
PPT	KLPN	12	19	13	10	11	12	23	31	41	40	43	42
	ESCO	1	2	2	2	2	2	3	9	9	12	12	11
	ENCL	7	13	27	17	16	10	9	20	29	23	35	33
	PRMI	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Legenda: CPR – cefoperazon, CTX – cefotaxim, CTZ – ceftazidim, CPM – cefepim, MER – meropenem, PPT – piperacilin/tazobaktam, KLPN – *Klebsiella pneumoniae*, ESCO – *Escherichia coli*, ENCL – *Enterobacter cloacae*, PRMI – *Proteus mirabilis*, NT – netestováno



**Tabulka 24.** Spotřeba jednotlivých antibiotických skupin a celková spotřeba antibiotik v FNOL v letech 2000-2011

		2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<b>CEF</b>	DDDatb	3726	4925	4742	6066	6447	5505	6019	5981	5886	4418	4640	4148
	RDDDatb	1.01	1.34	1.32	1.57	1.66	1.52	1.74	1.69	1.65	1.27	1.35	1.31
<b>PPT</b>	DDDatb	1715	1704	968.	1564	1745	2462	1693	2644	2591	3873	4050	3779
	RDDDatb	0.46	0.46	0.27	0.41	0.45	0.68	0.49	0.75	0.73	1.11	1.18	1.20
<b>CELKEM</b>	DDDatb	171316	172463	142822	161919	146848	164857	167993	184238	186943	187945	192398	177030
	RDDDatb	46.39	47.05	39.73	41.97	37.92	45.38	48.45	51.97	52.34	54.1	55.99	56.09

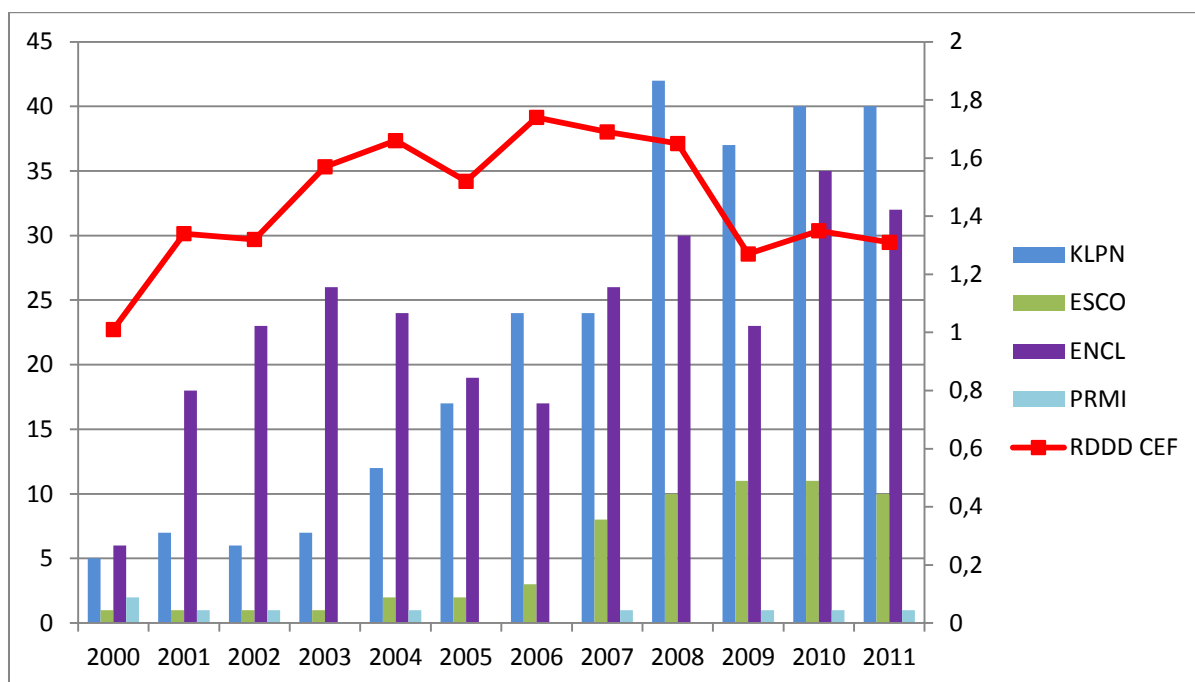
Legenda: RDDDatb – relativní roční spotřeba antibiotik, DDDatb – absolutní roční spotřeba antibiotik, CEF – cefalosporiny III. a IV. generace

**Tabulka 25.** Korelace mezi spotřebou jednotlivých skupin antibiotik a rezistencí sledovaných species k antibiotikům

Korelace 2000-2011			Statistické hodnoty	
Spotřeba antibiotik	Bakteriální rezistence		R	p
Širokospektré cefalosporiny	CTZ	KLPN	0,2285	0,4486
		ESCO	0,068	0,8216
		ENCL	0,1439	0,6333
		PRMI	-0,6139	0,0417
Širokospektré cefalosporiny	PPT	KLPN	-0,1121	0,7101
		ESCO	0,0437	0,8848
		ENCL	-0,1329	0,6594
		PRMI	-0,4804	0,1111
Piperacilin s tazobaktamem	PPT	KLPN	<b>0,8509</b>	<b>0,0048</b>
		ESCO	0,8421	0,052
		ENCL	0,5009	0,0967
		PRMI	-0,175	0,5617
Piperacilin s tazobaktamem	CTZ	KLPN	<b>0,8398</b>	<b>0,0053</b>
		ESCO	<b>0,8855</b>	<b>0,0033</b>
		ENCL	0,4921	0,1027
		PRMI	0,0679	0,8218

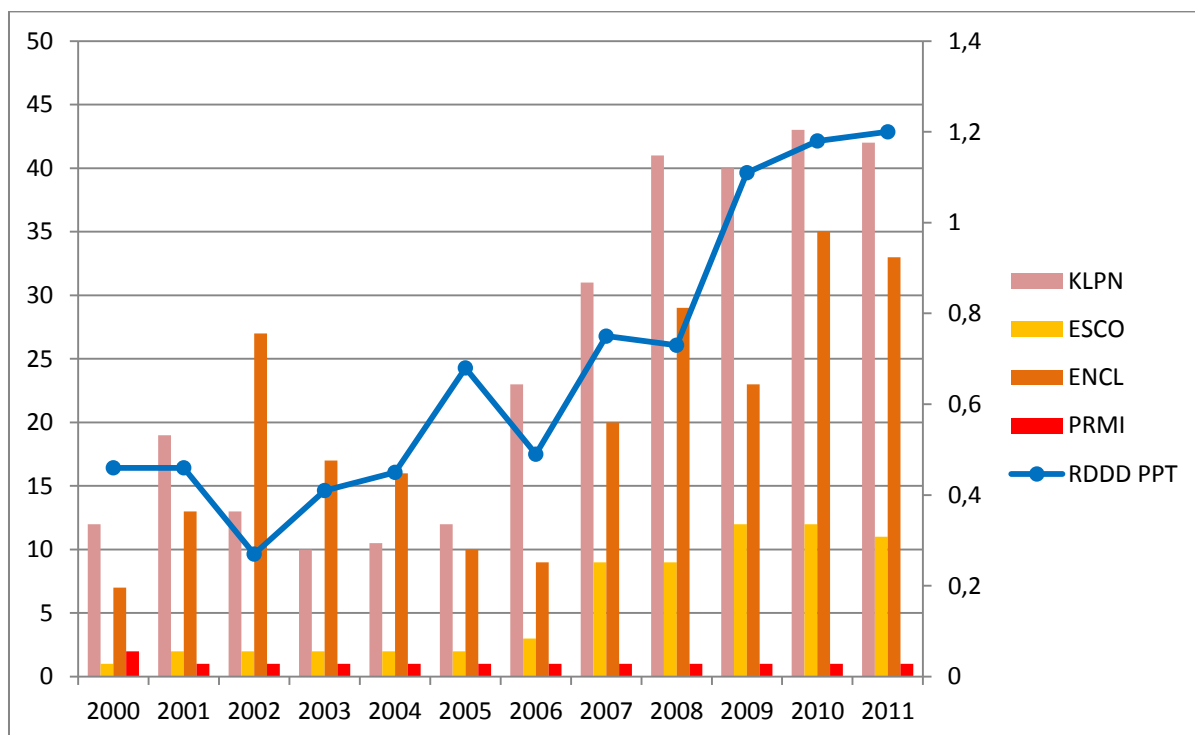
Legenda: R – koeficient spolehlivosti, p – hodnota statistické významnosti

**Graf 4.** Spotřeba cefalosporinů III. a IV. generace a rezistence k ceftazidimu v letech 2000-2011



Legenda: KLPN – *Klebsiella pneumoniae*, ESCO – *Escherichia coli*, ENCL – *Enterobacter cloacae*, PRMI – *Proteus mirabilis*, RDDD CEF – relativní roční spotřeba cefalosporinů III. a IV. generace

**Graf 5.** Vývoj spotřeby piperacilinu s tazobaktamem a rezistence k němu v letech 2000-2011



Legenda: RDDD PPT – relativní roční spotřeba piperacilinu s tazobaktamem

#### 4.4.2. Vliv selekčního tlaku karbapenemů na bakteriální rezistenci

Rezistenci nejčastějších gramnegativních bakterií k meropenemu ve FNOL a na KARIM, včetně počtu testovaných kmenů jednotlivých species, uvádí tabulka 26.

Z údajů je zřejmé, že rezistence sledovaných enterobakterií ke karbapenemům je na úrovni celé FNOL stále velmi nízká. Rovněž v případě klinicky významných enterobakterií, izolovaných od pacientů hospitalizovaných na KARIM, byla celkově prokázána stabilní a dobrá situace spočívající v nízké frekvenci meropenem-rezistentních izolátů (některé vyšší hodnoty rezistence ve sledovaných letech byly způsobeny chybou malých čísel). Naopak významný epidemiologický i klinický problém představuje stoupající odolnost druhu *Pseudomonas aeruginosa*, především u pacientů v intenzivní péči, kde v roce 2011 byla již u 60 % kmenů prokázána rezistence k meropenemu.

Data o spotřebě karbapenemů, imipenemu a meropenemu (další karbapenemy nebyly ve FNOL ve sledovaném období použity), jsou uvedena v tabulce 27.

Z uvedených údajů o spotřebě karbapenemů vyplývá nárůst jejich aplikace ve FNOL i na KARIM. Vzhledem k této skutečnosti byla provedena lineární regresní analýza vztahu mezi spotřebou karbapenemů a rezistencí *Pseudomonas aeruginosa* pomocí Spearmanovy korelace, jejíž výsledky jsou uvedeny v tabulce 28. Na úrovni celé nemocnice byla prokázána statisticky významná závislost, která však nebyla potvrzena na KARIM. Jedním z vysvětlení může být skutečnost, že nárůst používání karbapenemů byl mnohem výraznější v celé FNOL, kde došlo k téměř trojnásobnému zvýšení jejich relativní spotřeby.

**Tabulka 26.** Rezistence vybraných bakteriálních druhů k meropenemu v procentuálním vyjádření (v závorce je uveden počet testovaných kmenů v absolutní hodnotě)

<b>FNOL</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (2983)	0 (3032)	0 (3411)	0 (3573)	0 (3872)	0 (3825)	1 (2791)
<i>Escherichia coli</i>	0 (5548)	1 (5807)	1 (4306)	0 (4597)	0 (5160)	0 (5352)	0 (4535)
<i>Enterobacter cloacae</i>	2 (264)	1 (287)	1 (417)	1 (453)	1 (396)	0 (505)	0 (377)
<i>Citrobacter freundii</i>	0 (592)	2 (481)	2 (269)	0 (288)	0 (306)	1 (278)	0 (213)
<i>Proteus mirabilis</i>	0 (1296)	1 (1158)	0 (1027)	0 (1026)	0 (1218)	0 (1243)	0 (973)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26 (1895)	25 (1681)	27 (2211)	30 (2189)	30 (2143)	30 (1989)	40 (1949)
<b>KARIM</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2 (350)	1 (296)	1 (413)	1 (363)	0 (348)	0 (259)	3 (298)
<i>Escherichia coli</i>	0 (116)	2 (171)	0 (182)	1 (147)	0 (217)	0 (157)	0 (186)
<i>Enterobacter cloacae</i>	0 (12)	0 (18)	0 (33)	0 (48)	17 (12)	0 (40)	0 (45)
<i>Citrobacter freundii</i>	0 (7)	0 (6)	0 (10)	0 (9)	0 (22)	20 (5)	0 (9)
<i>Proteus mirabilis</i>	0 (45)	0 (50)	0 (63)	0 (58)	0 (64)	0 (53)	0 (57)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38 (249)	44 (184)	52 (296)	52 (258)	47 (233)	51 (186)	60 (238)

Legenda: FNOL – Fakultní nemocnice Olomouc, KARIM – Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny FNOL

**Tabulka 27.** Absolutní a relativní spotřeba karbapenemů v letech 2005 – 2011

<b>FNOL</b>		<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>
meropenem	DDDatb	2073	1099	1790	2377	4147	4490	3876
	RDDDatb	0.571	0.317	0.505	0.665	1.194	1.307	1.228
imipenem	DDDatb	0	147	694	1046	690	1150	1341
	RDDDatb	0	0.042	0.196	0.293	0.199	0.335	0.425
karbapenemy celkově	DDDatb	2073	1246	2483	3423	4837	5640	5216
	RDDDatb	0.571	0.359	0.700	0.958	1.392	1.641	1.653
<b>KARIM</b>		<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>
meropenem	DDDatb	430	300	280	228	500	500	560
	RDDDatb	16.606	13.618	9.284	8.228	18.443	19.592	22.490
imipenem	DDDatb	0	0	113	221	65	118	179
	RDDDatb	0	0	3.747	7.993	2.398	4.604	7.169
karbapenemy celkově	DDDatb	430	300	393	449	565	618	739
	RDDDatb	16.606	13.618	13.031	16.221	20.841	24.197	29.659

Legenda: DDDatb – počet definovaných denních dávek (absolutní roční spotřeba), RDDDatb – počet definovaných denních dávek na 100 ošetrovacích dnů (relativní roční spotřeba)

**Tabulka 28.** Spearmanova korelace mezi rezistencí *Pseudomonas aeruginosa* a spotřebou karbapenemů

	R	p
FNOL	<b>0,9636</b>	<b>0,0183</b>
KARIM	0,2000	0,6241

Legenda: R – koeficient spolehlivosti, p – hodnota statistické významnosti

## 5. DISKUSE

### 5.1. Možnosti fenotypových metod pro detekci širokospektrých beta-laktamáz

Následující kapitoly diskutují možnosti jednolitých fenotypových metod pro detekci širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL, AmpC a karbapenemáz.

#### 5.1.1. Senzitivita fenotypových metod pro detekci širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC

Z mikrobiologického i klinického hlediska je správná a včasná detekce ESBL a AmpC beta-laktamáz velmi významná. V rutinní mikrobiologické praxi je identifikace těchto enzymů často komplikována falešně negativními výsledky, zejména pokud jsou používány tradiční metody stanovení bakteriální rezistence k antibiotikům. Pro účely této disertační práce je definována falešná citlivost jako citlivost producentů beta-laktamáz k vybraným cefalosporinům III. a IV. generace. Výsledky naší studie ukazují vysoké procento falešné citlivosti k cefalosporinům III. a IV. generace při použití standardní mikrodiluční metody (21-76 %) a diskové difúzní metody (8–52%), pokud byla aplikována interpretační kritéria CLSI z roku 2009 (85). Pokud se sníží hraniční hodnota pro cefepim, ceftazidim a cefotaxim na 1 mg/l podle doporučení EUCAST, falešná citlivost klesne na 5–43% (86). Použití kritérií EUCAST pro diskovou difúzní metodu vykázalo jasný pokles falešné citlivosti na 10–38% (86). Z těchto důvodů by detekce širokospektrých beta-laktamáz především pro epidemiologické účely měla být založena na specifických fenotypových metodách, zejména modifikovaných difúzních testech, které v naší práci vykazovaly vysokou senzitivitu (100 % v případě mDDST pro ESBL, v případě mAmpC testu 95 %).

Ačkoli velmi dobrý výsledek vykázal i ESBL Etest (senzitivita 95 %), jedná se o dražší metodu ve srovnání s diskovými testy, a proto by tento test nemusel být vhodný pro každodenní mikrobiologickou praxi. Standardní mikrodiluční metoda s modifikovanou sestavou antibiotik se zdá být vhodnou a účinnou metodou (senzitivita 87 % pro ESBL a 95 % pro AmpC) vzhledem k možné současné detekci obou typů enzymů.

V porovnání s dalšími studiemi, které se zabývaly fenotypovou detekcí širokospektrých beta-laktamáz, jsou senzitivity našich diskových difúzních testů minimálně stejně vysoké nebo i vyšší při nižší cenové zátěži a jednodušším provedení. Ve studii Wieganda et al byly testovány 3 semi-automatické a 3 manuální testy: klasický DDST, ESBL Etest a CLSI disková metoda. Senzitivita těchto testů pro detekci ESBL se pohybovala mezi 93 % a 94 % (87). Linscott a Brown srovnávali 4 fenotypové metody pro detekci ESBL a na rozdíl od studie Wieganda et al. prokázali vyšší senzitivitu semi-automatizovaných systémů

(100 % v případě MicroScan ESBL plus ESBL confirmation panel, 99 % v případě VITEK 1) než agarových difúzních testů (97 % pro ESBL Etest, 96 % v případě CLSI ESBL disk method) (88).

### **5.1.2. Senzitivita fenotypových metod pro detekci serinových karbapenemáz a metallo-beta-laktamáz**

Vzhledem k rostoucímu výskytu gramnegativních bakterií produkujících karbapenemázy je jejich detekce z mikrobiologického i klinického hlediska velmi významná. V rutinní mikrobiologické praxi je identifikace těchto bakterií často komplikována z důvodu variability těchto enzymů (serinové karbapenemázy třídy A, MBL, OXA-enzymy třídy D) a jejich specifických inhibitorů (pro serinové karbapenemázy třídy A kyselina 3-aminofenylboritá, pro MBL chelátory zinečnatých iontů, pro OXA-enzymy třídy D není znám žádný specifický inhibitor). Odhalení produkce karbapenemáz je problematické i z toho důvodu, že zde neplatí rovnice– kmen rezistentní ke karbapenemu rovná se producent karbapenemázy. Rezistence ke karbapenemům může být způsobena i jinými mechanismy, stejně tak producent karbapenemáz může vykazovat falešnou citlivost. Analogicky k definici v kapitole 5.1.1. i zde je definována falešná citlivost jako citlivost producentů karbapenemáz k vybraným karbapenemům.

Při hodnocení celého souboru byla prokázána falešná citlivost za použití kritérií EUCAST v případě imipenemu u 13 % enterobakterií, v případě meropenemu u 12 % a v případě ertapenemu u 2 % enterobakterií. V souboru KPC-pozitivních enterobakterií byla falešná citlivost k uvedeným antibiotikům 7 %, 5 %, resp. 0 %. Podobné výsledky vykazuje práce Bratu et al., kteří ve své studii z roku 2005 uvádějí, že klinické laboratoře identifikovaly 15 % z celkového počtu KPC-pozitivních kmenů *Klebsiella pneumoniae* jako citlivé k imipenemu a 12 % k meropenemu (89).

Z výsledků vyplývá, že nejvyšší senzitivitu pro screeningový záchyt karbapenemáz na základě hodnoty MIC a interpretace jako „rezistentní“ vykazuje ertapenem, což se shoduje s řadou dalších autorů (89, 90, 91, 92).

Podle kritérií EUCAST platí, že některé enterobakterie, které produkují karbapenemázy a spadají do kategorie „citlivý“, by měly být takto hlášeny; tj. potenciální nasazení karbapenemu do terapie by se mělo řídit podle hodnoty MIC. V takových případech existuje ale riziko selhání antibiotické terapie, zejména v případě monoterapie karbapenemem, jak dokazují některé práce (63, 93). Nicméně detekce karbapenemáz je důležitá nejen z hlediska adekvátní antibiotické terapie, ale i z epidemiologického hlediska,



kdy je vhodné izolovat pacienta pro snížení rizika horizontálního přenosu těchto nebezpečných bakterií v rámci jednoho oddělení nebo i celé nemocnice. Z těchto důvodů by detekce karbapenemáz měla být založena na specifických fenotypových metodách a výsledek by měl být hlášen na oddělení ošetřujícímu lékaři.

Pro hodnocení senzitivity specifických testů k detekci karbapenemáz byly vybrány metody, které jsou levné, jednoduché na provedení a nenáročné na přístrojové vybavení. Z výsledků vyplývá, že 100% senzitivity nedosáhla žádná z testovaných metod. Nejvyšší senzitivitu vykázal mHodge test (97 %), který je i doporučovanou metodou pro detekci karbapenemáz americkým institutem CLSI. Tento test, i když ve skupině KPC- a OXA-enzymů detekoval 100 % kmenů, selhává v detekci MBL enzymů. Tyto údaje se shodují i s prací Girlicha et al., kteří také pozorovali výbornou senzitivitu tohoto testu v detekci serinových karbapenemáz a výrazně omezené možnosti v detekci MBL (94). Přestože má mHodge test tak vysokou senzitivitu, mnozí autoři jej nedoporučují pro potvrzení produkce karbapenemáz vzhledem k jeho nízké specifitě (vysokému procentu falešné pozitivních výsledků) (95). Bley Ribeiro et al. se pokusili kvantifikovat výsledky mHodge testu na základě poměru změřeného zvětšeného růstu indikátorového kmene u testovaného kmene a u pozitivní kontroly. Zjistili, že při poměru 0,45 se senzitivita i specifita testu blíží 100 % (96). Z uvedeného vyplývá, že interpretace mHodge testu je problematická, ale je naznačena možná cesta, jak interpretaci, a tím i specifitu, tohoto jinak velmi senzitivního testu zlepšit.

Byly rovněž zkoumány diskové difúzní testy se specifickými inhibitory proti KPC- a MBL-enzymům (3-aminofenylboritá kyselina a EDTA), které samostatně vykázali velmi nízkou senzitivitu. V případě, že laboratoř použije všechny tři testy zároveň (CD-test, MBL test a Combi test s meropenemem), zvýší se senzitivita na 92 %, což je dle našich výsledků stejná senzitivita jako v případě Carba NP testu. Řada autorů hlásí až 100% senzitivitu Carba NP testu, včetně výborné detekce enzymů MBL a OXA-48, což je v mírném rozporu s našimi výsledky (97, 98, 99). Vyskytují se ovšem i práce, které uvádějí nižší míru senzitivity. Yusuf et al. hlásí ve své práci senzitivitu Carba NP testu u enterobakterií 91 % a Tijet et al. dokonce pouze 73 % (100, 101). Z jednotlivých studií vyplývá, že správný výsledek Carba NP testu je závislý na mnoha faktorech, např. složení kultivačního média pro předchozí kultivaci testované bakteriální kultury (přídavek zinečnatých iontů zlepšuje výsledek v případě MBL enzymů), růstové fázi bakteriální kultury (mukózní kmeny vykazují nižší senzitivitu) apod.

Carba NP test poskytuje však oproti všem zkoumaným testům nesporně další výhody. Jednou z nejdůležitějších předností je rychlost testu, kdy výsledek je k dispozici ještě tentýž den. Dalšími výhodami jsou snadná interpretace a možnost detekovat všechny třídy karbapenemáz. Zároveň si test uchovává i přednosti, které byly zmíněny výše, tj. nízká cena, jednoduché provedení a žádné nároky na přístrojové vybavení. Vzhledem k tomu, že již existují komerčně dostupné Carba NP testy a není třeba připravovat potřebné roztoky na laboratoři, je tento test velmi vhodným pro rutinní mikrobiologickou praxi.

## **5.2. Výskyt a analýza enterobakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC**

Následující kapitoly diskutují výskyt širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC zjištěný v rámci této disertační práce u různých skupin pacientů a v nemocničním prostředí.

### **5.2.1. Gastrointestinální nosičství ESBL- a AmpC- pozitivních enterobakterií u komunitních a hospitalizovaných pacientů**

Prevalence ESBL-pozitivních izolátů je celosvětovým problémem. Ve srovnání s ostatními kontinenty je prevalence ESBL v Evropě vyšší než v USA, ale nižší než v Asii či Jižní Americe (102). Nosičství těchto kmenů má velký význam. Livermore a Paterson stanovili, že v případě vyšší četnosti infekcí způsobených ESBL-pozitivními kmeny na konkrétním oddělení činila kolonizace gastrointestinálního traktu (GIT) pacientů téměř 70 % (103). Castillo et al. zjišťovali gastrointestinální kolonizaci ESBL-pozitivními kmeny u hospitalizovaných a komunitních pacientů. Jejich výsledky prokázaly nárůst prevalence těchto kmenů u obou skupin o 5 % v průběhu pouhých dvou let (z 3 %, respektive 2 % v roce 2002 na 8 %, respektive 7 % v roce 2004). V obou letech byla nejvíce prevalujícím species *Escherichia coli* (104).

V České republice byla provedena studie kolonizace GIT bakteriemi produkujícími ESBL-enzymy v roce 2007. Výsledky ukázaly 3% prevalenci u hospitalizovaných pacientů a 1% prevalenci u komunitních pacientů. Nejčastěji zachyceným species byla *Escherichia coli* (57 %) (105). Na základě výsledků této disertační práce byl prokázán nárůst prevalence ESBL-pozitivních enterobakterií v GIT hospitalizovaných pacientů (na 8 %). Distribuce jednotlivých species se také změnila, nejvíce prevalujícím druhem byla *Klebsiella pneumoniae* (56 %).

Gastrointestinální nosičství ESBL-pozitivních enterobakterií v komunitním prostředí v České republice v roce 2007 činila 1 % a ve všech případech se jednalo o *Escherichia coli*.

Nejčastějšími typy byly CTX-M-15, CTX-M-1 a CTX-M-9-like enzymy (105). Výsledky v rámci této doktorské práce prokázaly nárůst gastrointestinálního ESBL-nosičství v komunitním prostředí na 3 %. Nicméně je to stále méně než je evropský průměr. V porovnání s rokem 2007 je distribuce jednotlivých species více variabilní, i když *Escherichia coli* zůstává stále nejvíce frekventní (90 %). Genetický základ je velmi podobný s prevalujícími CTX-M-1-like a CTX-M-9-like typy.

Vzrůstající prevalence ESBL-pozitivních enterobakterií v GIT pacientů v komunitním prostředí byla také hlášena v ostatních evropských státech, například ve Španělsku a Velké Británii (106, 107). Nejčastěji byly identifikovány kmeny *Escherichia coli* produkující CTX-M beta-laktamázy (108, 109). Valverde et al. detekovali 4% prevalenci ESBL-pozitivních enterobakterií ve stolici zdravých dobrovolníků ve Španělsku v roce 2003. Všechny tyto kmeny byly identifikovány jako *Escherichia coli* (106). Autoři jiné španělské studie publikované v roce 2007 našli u 7 % zdravých osob ESBL-pozitivní bakterie; nejčastějším typem byl enzym CTX-M (110). Janvier et al. srovnali prevalenci ESBL-pozitivních enterobakterií ve skupině asymptomatických mladých lidí v komunitě během 10leté periody (1999-2009) a zjistili nárůst z 0 % na 2 %. Nejčastěji byly detekovány enzymy ze skupiny CTX-M-1 (111).

Na rozdíl od ESBL-enzymů nosičství AmpC-produkujících bakterií nebylo zatím příliš studováno. Kaneko et al. zjistili přítomnost izolátů *Escherichia coli* produkujících CMY-2 typ AmpC beta-laktamáz u zdravých studentů medicíny. Autorský kolektiv vyslovil v práci domněnku, že konstitutivní i inducibilní AmpC-beta-laktamázy se mohou v komunitě extenzivně šířit (112). V Dánsku bylo detekováno v roce 2008 gastrointestinální nosičství AmpC beta-laktamáz s typy CMY-2 a CMY-34 téměř u 4 % zdravých rekrutů dánské armády (113). V současnosti činí prevalence AmpC-pozitivních bakterií v GIT komunitních pacientů v České republice 1 %. *Escherichia coli* a *Citrobacter freundii* jsou nejčastějšími identifikovanými druhy. Ve srovnání se studií z roku 2007 zůstala tato prevalence na stejné úrovni (105). Zajímavým nálezem v rámci této disertační práce je velmi nízký podíl AmpC-pozitivních izolátů u hospitalizovaných pacientů ve srovnání s komunitními pacienty. Produkce AmpC-enzymu byla detekována pouze u jediného nemocničního izolátu.

Důležitým výsledkem této studie je detekce vysokého počtu ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae*, u kterých PFGE odhalila identický či velmi podobný restriční profil. Tento fakt implikuje klonální šíření kmenů mezi hospitalizovanými pacienty a zaslouží si další pozornosti.

Výsledky této disertační práce přispěly k stanovení prevalence gastrointestinálního nosičství ESBL- a AmpC-produkujících enterobakterií, což je důležité především z důvodu vyššího rizika infekce oportunním patogenem, ale také z důvodu zvýšené pravděpodobnosti diseminace mobilních elementů nesoucích geny rezistence do širší populace. Je zřejmé, že detekce a kontrola rezervoáru těchto genů nejen u hospitalizovaných pacientů, ale i v komunitě je velmi důležitá.

### **5.2.2. Gastrointestinální nosičství u hemato-onkologických pacientů**

U hemato-onkologických pacientů je vyšší riziko infekce vzhledem k povaze jejich vlastního onemocnění i velmi komplexní léčbě. Vzhledem k oslabenému imunitnímu systému těchto pacientů je na místě provádět pravidelný monitoring bakteriální flóry se zaměřením na multirezistentní bakterie, aby adekvátní antibiotická terapie mohla být započata okamžitě při prvních známkách bakteriální infekce. Mezi významné patogenní bakterie nalezené u pacientů s hematologickými malignitami patří enterobakterie produkující širokospektré beta-laktamázy typu ESBL a/nebo AmpC. Tyto multirezistentní bakterie byly nalezeny i v gastrointestinálním traktu hemato-onkologicky nemocných (114, 115). Liss et al. dokumentovali, že 18 % pacientů s hematologickými a onkologickými malignitami bylo kolonizováno ESBL-pozitivními kmeny čeledi *Enterobacteriaceae* (116). Výsledky této disertační práce demonstrují 21% prevalenci nosičství ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií v GIT hemato-onkologických pacientů a zároveň potvrzují vliv předchozí hospitalizace na pozitivní nosičství těchto bakterií v GIT. Celkem 93 % pacientů s prokázanou přítomností ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií v GIT bylo hospitalizováno v předcházejících 6 měsících. Nejčastěji byly detekovány ESBL-pozitivní kmeny *Klebsiella pneumoniae* a AmpC-pozitivní kmeny *Citrobacter freundii*. ESBL enzymy byly identifikovány především jako typ CTX-M. Toto zjištění dobře koreluje s výsledky jiných studií, které potvrzují zvýšenou prevalenci CTX-M typu beta-laktamázy ve srovnání s prevalencí enzymů TEM a SHV (117, 118). Vysoký podíl (81 %) kmenů produkujících CTX-M beta-laktamázy izolovaných z rektálních výtěrů od pacientů s hematologickými malignitami byl referován také v práci Arnana et al. (119). Autoři této španělské studie detekovali především typy CTX-M-9 a CTX-M-1, zatímco v naší studii byly detekovány beta-laktamázy pouze ze skupiny CTX-M-1 (119). Calatayud et al. analyzovali rektální výtěry od onkologických pacientů a identifikovali ESBL-pozitivní bakterie s geny pro typy CTX-M-9 a CTX-M-1 širokospektrých beta-laktamáz (115).

Podle výsledků předložené disertační práce byly nejčastější typy AmpC beta-laktamáz enzymy typu CIT a DHA. Na rozdíl od ESBL-pozitivních enterobakterií nebyla kolonizace

AmpC-producenty u hemato-onkologických pacientů ještě příliš prostudována. Korona-Glowniak et al. studovali kolonizaci horních cest dýchacích u hemato-onkologických pacientů a získali 3 AmpC-pozitivní izoláty z čeledi *Enterobacteriaceae* od pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (120). Gudiol et al. dokumentovali, že infekce krevního řečiště způsobené gramnegativními bakteriemi u neutropenických pacientů byly asociovány s vysokým výskytem multirezistentních kmenů čeledi *Enterobacteriaceae*, včetně AmpC-pozitivních kmenů *Enterobacter cloacae* (121).

Důležitým úkolem současné klinické mikrobiologie je detekovat identické multirezistentní kmeny a determinovat jejich potenciální horizontální klonální šíření. V této práci byly izolovány dva identické kmeny u dvou párů pacientů, což jasně naznačuje šíření identického klonu mezi pacienty. Je však nutné zdůraznit, že většina izolátů měla jedinečný restriční profil. Z toho důvodu nebylo prokázáno žádné klinicky významné horizontální šíření identického kmene. Malý podíl identických izolátů a velká diverzita mezi ESBL-pozitivními kmeny izolovaných z rektálních výtěrů onkologických pacientů byly referovány rovněž v práci Calatayuda et al. (115).

Nebezpečí ESBL- a AmpC-pozitivních kmenů čeledi *Enterobacteriaceae* přítomných v normální mikroflóře spočívá ve dvou aspektech– slouží jako zdroj genů rezistence pro jiné bakterie a dále jsou potenciálním etiologickým agens, jejichž vysoká rezistence k antibiotikům může způsobit selhání antibiotické terapie a kvůli tomu vést ke zvýšené morbiditě a mortalitě. Arnan et al. nenašli žádný klinický význam ESBL-pozitivních kmenů *Escherichia coli* kolonizujících GIT hemato-onkologických pacientů a nepovažují monitoraci těchto kmenů v GIT za přínosné (119). Naproti tomu v této doktorské práci bylo prokázáno, že nosičské kmeny přítomné ve střevní mikroflóře mohou hrát roli jako etiologická agens klinicky významných infekcí. U dvou pacientů byla močová infekce, resp. infekce krevního řečiště, způsobena ESBL-, resp. AmpC-pozitivní enterobakterií, která kolonizovala jejich střevní trakt.

### **5.2.3. Etiologická agens nozokomiálních pneumonií a jejich rezistence k antibiotikům se zaměřením na enterobakterie produkující širokospektré beta-laktamázy**

Z důvodu nepříznivých epidemiologických dat zůstává nozokomiální pneumonie jednou z nejobávanějších nemocničních infekcí. Výsledky z KARIM FNOL prokázaly 30% smrtnost. Kolektiv Werarak et al., podobně jako studie Tejada et al., uvádí 46% nemocniční smrtnost, resp. 44% (122,123). Studie kolektivu Uvízl et al. dokumentuje, že 35 % pacientů s HAP

zemřelo před propuštěním z nemocnice (124). Piskinova práce s letalitou 31 % je rovněž v souladu se závěry této práce (125).

Mnohé studie prokázaly, že vyšší mortalita je asociována s neadekvátní iniciální antibiotickou léčbou a/nebo se zpožděním antibioterapie (126-128). Neadekvátní iniciální terapie je zapříčiněna především rezistencí bakteriálních patogenů vyvolávajících nozokomiální pneumonie (129,130). V této práci bylo zhodnoceno, že 49 % pacientů bylo léčeno neadekvátně. Ačkoli se může zdát toto číslo vysoké, je srovnatelné s dalšími studii, například práce Uvízla et al. uvádí neadekvátní antibioterapii ve 41 %, Luna et al. z roku 2006 až 68 % (124,131).

Selhání antibiotické léčby z důvodu přítomnosti rezistentní bakterie je jednou z nejdůležitějších příčin špatné prognózy u pacientů s HAP. Z výsledků předložené disertační práce vyplývá, že většina HAP je pozdních (72 %) a způsobena gramnegativními bakteriemi, především enterobakteriemi a gramnegativními nefermentujícími tyčkami (78 %). Z literatury vyplývá, že jedním z nejčastějších etiologických agens je *Pseudomonas aeruginosa*, které je izolováno ve 22-24 % případů a je asociováno s vyšší mortalitou ve srovnání s přítomností jiných patogenů (132, 133,134). Tyto závěry potvrdily i výsledky této disertační práce.

Rezistence bakteriálních původců HAP na jednotkách intenzivní péče v České republice je značně vysoká. Pokud je zhodnocena citlivost *Klebsiella pneumoniae*, pak je zřejmé, že pro iniciální antibiotickou léčbu jsou nejvhodnější meropenem, tigecyklin, amikacin a kolistin. Vzhledem k tomu, že stejně častým původcem HAP je i *Pseudomonas aeruginosa*, tak se situace značně komplikuje, protože toto species vykazuje primární rezistenci k tigecyklinu a velmi vysokou sekundární rezistenci k meropenemu. Pro účely včasné a adekvátní antibioterapie byla v řadě zemí vypracována doporučení, která po zhodnocení mnoha faktorů zařazují pacienta do určité rizikové skupiny z hlediska osídlení rezistentními bakteriálními patogeny a doporučují iniciální antibiotickou léčbu (135,136). Ve studii Ioanase et al. byly hodnoceny dvě klasifikace (American Thoracic Society classification a Trouillet classification), které demonstrovaly správnost předpovědi etiologického agens v 91 %, resp. 83 % (137). Pokud byl pacient léčen podle těchto doporučení, byla terapie adekvátní v 79-80 %, což je značně více než 51 % v naší studii. Bylo by praktické, kdyby byla vytvořena podobná doporučení i v českém prostředí, což by mohlo znamenat zvýšení úspěšnosti léčby pacientů s HAP.

#### **5.2.4. Detekce enterobakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy v prostředí jednotek intenzivní péče**

Získané výsledky dokumentují přítomnost ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií na dvou odděleních intenzivní péče (KARIM, IPCHO) ve FNOL. Vzhledem k závažnosti stavů pacientů hospitalizovaných na podobných typech oddělení a vysokému procentu nozokomiálních infekcí dochází ke zvyšování spotřeby antibiotik a tím k výraznému selekčnímu tlaku způsobujícímu vysoký podíl multirezistentních kmenů. Nejen racionální antibiotická politika, ale i hygienicko-epidemiologická opatření hrají na těchto odděleních významnou roli v prevenci rozvoje nozokomiálních infekcí a šíření rezistentních bakterií z prostředí na pacienty a mezi nimi navzájem. V řadě studií bylo prokázáno, že dodržování výše zmíněných opatření je vysoce efektivní. Noy et al. dokázali pomocí restriktivních a bariérových opatření zvýšit citlivost kmenů *Klebsiella pneumoniae* k ceftazidimu na JIP až čtyřikrát (138). Toltzis et al. po redukci spotřeby ceftazidimu na JIP snížili podíl ceftazidim-rezistentních bakterií, v případě AmpC-pozitivních bakterií se prevalence snížila signifikantně z 68 % na 46 % (139). Dancer et al. se pokusili změřit efekt zvýšeného hygienického úklidu na chirurgickém oddělení po přijetí jednoho uklízeče navíc. Zjistili, že pomocí tohoto opatření snížili mikrobiální kontaminaci povrchů o 33 % a nemocnici ušetřili 30 až 70 tisíc liber (140). Naše studie zdokumentovala přítomnost ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií v prostředí intenzivních oddělení, ale neprokázala žádný přenos těchto kmenů na pacienty. Tento fakt nasvědčuje tomu, že hygienická opatření na těchto odděleních jsou adekvátní. Nicméně vysoký záchyt rezistentních enterobakterií ve stěrech z povrchů naznačuje odolnost zmíněných mikroorganismů k dezinfekčním programům a potenciální riziko pro pacienty. Mezinárodní prospektivní studie (Evropa, Asie, Afrika, Severní a Jižní Amerika, Austrálie) poskytla zneklidňující data, 31 % (78 z 253) epizod nozokomiální bakteriémie a 43 % (30 z 69) epizod získaných na JIP byly způsobeny ESBL-producenty. Předchozí podání antibiotik s oxyimino-skupinou (cefuroxim, cefotaxim, ceftriaxon a ceftazidim) bylo asociováno s vyšším rizikem bakteriémie způsobené ESBL-pozitivní bakterií. V sedmi z deseti nemocnic byl detekován také přenos identického klonu mezi pacienty (141). V této práci nebyla detekována žádná ESBL- ani AmpC-pozitivní enterobakterie u zdravotnického personálu. Nicméně studie Patersona et al. nevyklučuje kolonizaci pracovníků jinými multirezistentními bakteriemi. V jejich studii rovněž žádný z pracovníků nebyl kolonizován ESBL-produkujícím kmenem *Escherichia coli*, ale 23 % lékařů a 32 % sester byly nosiči meticilin-rezistentního kmene *Staphylococcus aureus* nebo vankomycin-rezistentního enterokoka (142). Je zřejmé, že kromě účinných opatření pro kontrolu šíření

multirezistentních kmenů čeledi *Enterobacteriaceae* ve zdravotnických zařízeních, jako jsou racionální antibiotická terapie, striktní dodržování hygienicko-epidemiologických opatření a edukace zdravotnické i laické populace, je třeba rovněž monitorovat výskyt rezistentních bakterií v nemocničním prostředí, včetně genetické analýzy izolovaných kmenů.

### **5.3. Analýza rezistence ke karbapenemům**

Následující kapitoly diskutují výsledky analýzy rezistence ke karbapenemům vzešlé na podkladě této disertační práce.

#### **5.3.1. Četnost a analýza enterobakterií rezistentních ke karbapenemům ve Fakultní nemocnici Olomouc**

Karbapenemy patří mezi velmi účinná antibiotika a v současné době představují léky volby v případě závažných infekcí způsobených ESBL a AmpC-pozitivními enterobakteriemi. Bohužel, vývoj bakteriální rezistence se nezastavil ani před touto skupinou antimikrobních přípravků. Rezistence enterobakterií ke karbapenemům může být podmíněna produkcí karbapenemáz, nebo produkcí ESBL a/nebo AmpC  $\beta$ -laktamáz se současným poklesem exprese membránových porinů. Nebezpečí karbapenemáz spočívá v tom, že takto podmíněná rezistence je stálá (po vysazení antibiotika nedojde k opětovnému pomnožení citlivé subpopulace) a jejich geny jsou umístěny na mobilních elementech, které se mohou přenášet horizontálně v rámci jednoho bakteriálního druhu či rodu.

Ve Fakultní nemocnici Olomouc bylo v průběhu 17 měsíců identifikováno 9 kmenů čeledi *Enterobacteriaceae* rezistentních ke karbapenemům (při použití „breakpointu“ 1 mg/l), což činilo pouhých 0,07 % z celkového množství enterobakterií zachycených v uvedeném období. Ve srovnání s průměrnou prevalencí karbapenem-rezistentních enterobakterií v různých regionech je tato hodnota hluboce pod průměrem (3 % v Evropě, 4 % v USA a 6 % v Jižní Americe) (143). O 4 roky později (2014) byla pozorována prevalence enterobakterií rezistentních k meropenemu ve FNOL 0,3 % (nepublikovaný údaj). I když je znázorněn rostoucí trend, stále je hodnota rezistence ke karbapenemům u enterobakterií velmi nízká.

U žádné z testovaných enterobakterií nebyla prokázána produkce serinových karbapenemáz třídy A, D a MBL. Rezistence těchto kmenů ke karbapenemům byla s největší pravděpodobností podmíněna produkcí širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC s jiným přidruženým mechanismem rezistence, především zvýšenou nepropustností buněčné stěny.



Studie, předložená v rámci této disertační práce, z období 1. 1. 2014 – 31. 1. 2015 nezjistila v gastrointestinálním traktu hemato-onkologických pacientů žádnou enterobakterii s produkcí karbapenemáz. Rezistence ke karbapenemům u pěti izolovaných enterobakterií (2 %) byla způsobena produkcí ESBL v kombinaci s jiným mechanismem (snížená propustnost bakteriální stěny, popř. eflux z buňky). Podle současných znalostí nebyla publikována žádná studie zabývající se nosičstvím producentů karbapenemáz u hemato-onkologických pacientů. Nicméně byla provedena řada studií zabývajících se gastrointestinálním nosičstvím u různých skupin pacientů. Indická studie hlásí 10% prevalenci enterobakterií produkujících karbapenemázy v rektálních výtěrech hospitalizovaných pacientů (144). V Maroku byla provedena studie, která prokázala 13% nosičství OXA-48 enzymů v gastrointestinálním traktu hospitalizovaných osob ve fakultní nemocnici, přičemž se jednalo o majoritní rozšíření dvou klonů *Klebsiella pneumoniae* a *Enterobacter cloacae* (145). Korejská studie prokázala 0,3% prevalenci gastrointestinálního nosičství enterobakterií rezistentních ke karbapenemům u pacientů na JIP, ale žádný z izolátů nebyl producentem karbapenemáz (146). Ve Švýcarsku bylo zkoumáno nosičství enterobakterií produkujících karbapenemázy v komunitní populaci a bylo zjištěno, že tyto nebezpečné kmeny se v komunitě zatím nevyskytují (147). Studie čtyř chicagských nemocnic zkoumala gastrointestinální kolonizaci KPC-produkujících kmenů čeledi *Enterobacteriaceae* u hospitalizovaných pacientů přijatých z komunitního prostředí a ze zařízení s ošetrovatelskou péčí. Zatímco u komunitních pacientů nebyl nalezen žádný takový kmen, u pacientů ze zařízení s ošetrovatelskou péčí činila prevalence těchto kmenů 8 % (148). A konečně, co se týče hemato-onkologických pacientů, v istanbulské studii bylo prokázáno, že 9 % epizod bakteriemií u pacientů s febrilní neutropenií bylo způsobeno gramnegativními bakteriemi rezistentními ke karbapenemům (149).

Papadimitriou-Olivgeris et al. definovali rizikové faktory pro intestinální kolonizaci KPC-pozitivními kmeny *Klebsiella pneumoniae*, které jsou následující – předchozí pobyt na JIP, chronická obstrukční plicní nemoc, delší trvání předchozí hospitalizace, předchozí terapie karbapenemy a beta-laktamy s inhibitory beta-laktamáz (150).

Schechner et al. zkoumali, jaké rizikové faktory vedou u pacientů kolonizovaných karbapenem-rezistentními kmeny v GIT k manifestní infekci způsobené těmito kmeny. Zjistili, že pacienti přijatí na lůžka intenzivní péče, s centrálním žilním katetrem, na antibiotické terapii a s diagnózou diabetes mellitus mají zvýšené riziko vzniku infekce kmenem produkujícím karbapenemázy po předchozí kolonizaci (151).

Z uvedeného vyplývá, že surveillance bakteriálních kmenů produkujících karbapenemázy je významná a měla by být prováděna pravidelně u vybraných skupin pacientů. Výsledky předložené v rámci této doktorské práce dokumentovaly nízkou celonemocniční rezistenci enterobakterií ke karbapenemům (0,07– 0,3 %). Nebyl prokázán výskyt enterobakterií s produkcí karbapenemáz, a to ani u hemato-onkologických pacientů.

### **5.3.2. Četnost kmenů *Pseudomonas aeruginosa* s rezistencí ke karbapenemům ve Fakultní nemocnici Olomouc a Vojenské nemocnici Olomouc**

Ve srovnání s rezistencí enterobakterií ke karbapenemům je prevalence pseudomonád rezistentních k meropenemu nebezpečně vysoká. Získané výsledky prokázaly 43% prevalenci těchto kmenů ve FNOL a dokonce 56% prevalenci ve VNOL v roce 2013. Je to značně více, než byl celorepublikový průměr ve sledovaném roce (30 %). Pokud se podíváme na situaci v sousedních zemích, roste četnost karbapenem-rezistentních pseudomonád směrem od západu na východ (Rakousko 15 %, Německo 19 %, Polsko 38 % a Slovensko 63 %) (12).

Od roku 2012 je ve FNOL monitorována rezistence ke karbapenemům a zjišťován mechanismus této rezistence. Prozatím nebyly ve FNOL zachyceny žádné kmeny *Pseudomonas aeruginosa* s produkcí karbapenemáz. V České republice byla první karbapenemáza u druhu *Pseudomonas aeruginosa* zachycena v polovině roku 2008 a jednalo se o metalo-beta-laktamázu typu IMP-7 (26). Předtím byly MBL tohoto typu zachyceny v Kanadě, Japonsku, Malajsii a na Slovensku (26). Do současnosti bylo více než 50 kmenů *Pseudomonas aeruginosa* produkujících metalo-beta-laktamázy (VIM-2, IMP-7) hlášeno v sedmi nemocnicích, kde způsobily lokální „outbreaky“; ve dvou nemocnicích (Praha a Jihomoravský kraj) se situace označovala dokonce za endemickou (50).

## **5.4. Analýza vlivu spotřeby antibiotik na rezistenci**

Následující kapitoly diskutují výsledky analýzy selekčního tlaku beta-laktamových antibiotik a jeho vliv na bakteriální rezistenci.

### **5.4.1. Vliv selekčního tlaku beta-laktamových antibiotik na rezistenci u vybraných enterobakterií**

Rezistence gramnegativních bakterií k širokospektrým penicilinům a cefalosporinům je v současnosti tak vysoká, že ztráta účinnosti této významné skupiny léčiv je reálnou a aktuální hrozbou. Kolářova studie z roku 2006 dokumentuje 39 % prevalenci ESBL-pozitivních kmenů *Klebsiella pneumoniae* na jednotkách intenzivní péče (JIP) v České republice (152).

V roce 2011 na Klinice anesteziologie a resuscitace FNOL dosáhl podíl rezistence k cefalosporinům III. generace u tohoto druhu již 60 % (nepublikované údaje). Z tohoto důvodu je potřeba analyzovat vývoj rezistence na regionální úrovni a přizpůsobovat danému trendu i aplikaci antibiotik. Lékem první volby u infekcí způsobených enterobakteriemi rezistentními k širokospektrým cefalosporinům jsou karbapenemy, ke kterým v České republice stále zůstává zachována téměř 100% citlivost. V letech 2009–2010 činila prevalence meropenem-rezistentních enterobakterií ve FNOL pouhých 0,07 % (153). Nicméně v důsledku zvýšené aplikace karbapenemů při léčbě infekcí vyvolaných ESBL- a AmpC-pozitivními původci můžeme očekávat, že odolnost se i k této skupině léčiv bude zvyšovat. V newyorské studii bylo prokázáno, že restrikcí podávání cefalosporinů došlo sice k 71% snížení výskytu ceftazidim-rezistentních kmenů *Klebsiella pneumoniae* na JIP, ale nežádoucím důsledkem zvýšeného užívání karbapenemů byl 69% nárůst imipenem-rezistentních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* (25). V minulých dvou desetiletích bylo provedeno více prací, zkoumající vztah mezi spotřebou antimikrobních přípravků a vývojem antibiotické rezistence. Studie Koláře et al., která se zabývala vývojem rezistence u gramnegativních bakterií v letech 1994–1998 a hodnotila její vztah ke spotřebě různých antibiotických skupin, prokázala statisticky významnou korelaci mezi vývojem bakteriální rezistence a spotřebou cefalosporinů (154). Studie autorského kolektivu Urbánek et al., která byla prováděna mezi lety 1997–2005, potvrzuje pozitivní korelaci mezi výskytem ESBL-pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* a spotřebou cefalosporinů III. generace (155). V těchto i jiných případech lze spatřovat potvrzení široce přijímané hypotézy selekčního tlaku a jeho vlivu na vzrůstající odolnost k antimikrobním přípravkům. Nicméně pozdější studie již nepotvrzují přímý vztah mezi spotřebou daného antibiotika a bakteriální rezistencí. Dvouletá Hallerova studie, probíhající v letech 2003–2004, prokázala signifikantní korelaci mezi použitím cefalosporinů II. generace a zvyšující se prevalencí kmenů *Enterobacter* sp. rezistentních k cefalosporinům III. generace (156). Avšak v případě přímého vztahu, tj. vztahu mezi rezistencí k cefalosporinům III. generace a/nebo piperacilinu s tazobaktamem a jejich vlastní spotřebou, nebyla nalezena pozitivní korelace. Práce španělského kolektivu autorů, zabývajících se prevalencí enterobakterií rezistentních k širokospektrým cefalosporinům a fluorochinolonům v letech 1999–2010 a spotřebou antibiotik ve španělských nemocnicích, popsala vliv aplikace fluorochinolonů na zvyšující se rezistenci k nim i cefalosporinům III. generace (157). A opět co se týče přímého vztahu v případě širokospektrých cefalosporinů, nebyla nalezena žádná korelace mezi jejich spotřebou a trendem rezistence. Bosso et al. se také zabývali asociací mezi antibiotickou spotřebou a rezistencí u

enterobakterií a zjistili, že stoupající či klesající trend rezistence nebyl v korelaci se spotřebou antibiotika ani v jednom ze sledovaných případů (158). Významnou pozitivní korelaci vykazovala *Escherichia coli* rezistentní k ciprofloxacinu se spotřebou ceftriaxonu a *Enterobacter cloacae* rezistentní k cefepimu se spotřebou piperacilinu/tazobaktamu. Tato asociace trendu rezistence se spotřebou může být zapříčiněna především snahou redukovat používání konkrétní antibiotické látky v případech, kdy je rezistence vysoká, a nahrazením jiným antibiotikem s podobným účinkem. Spotřeba sledovaného antibiotika tedy klesne, ale rezistence k němu i nadále roste pod vlivem zkříženého selekčního tlaku způsobeného alternativním terapeutickým přípravkem.

Získané výsledky prokázaly statisticky významnou závislost rezistence vůči piperacilin/tazobaktamu na jeho spotřebě u *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli*. U ostatních enterobakterií a antibiotik není tato závislost prokazatelná. Ačkoli celková spotřeba antibiotik během studovaného období vzrostla, používání antibiotik s vysokým selekčním potenciálem, jako jsou cefalosporiny III. a IV. generace, kleslo. Zvyšující se spotřeba antibiotik může být vysvětlena rostoucím počtem závažných bakteriálních infekcí ve Fakultní nemocnici Olomouc, která přijímá do své péče těžce nemocné pacienty. Na druhou stranu snížení spotřeby širokospektrých cefalosporinů je výsledkem striktní antibiotické politiky aplikované nemocničním antibiotickým centrem.

Na základě výsledků této disertační práce je patrné pomyslné rozevírání nůžek mezi klesající spotřebou širokospektrých cefalosporinů a rostoucí bakteriální rezistencí. Je otázkou, čím jsou tyto závěry podmíněny. Je pravděpodobné, že hypotéza přímé závislosti mezi celkovým objemem používaných antibiotik a odolností k nim je příliš zjednodušena u tak složitého ekologického vztahu bakterie – antibiotikum. Definované denní dávky ani absolutní roční spotřeba antibiotik nebere v potaz důležité faktory podílející se na vzniku a šíření rezistence, jako jsou adekvátnost léčby, kombinace antibiotik, správné dávkování léčiv, dodržování délky léčby a intervalu mezi jednotlivými dávkami. Na druhou stranu tyto parametry nebyly brány v potaz ani v předchozích studiích, kdy se jako jednotící parametr uváděly vždy definované denní dávky pro možnost srovnávání jednotlivých prací mezi sebou. Z toho vyplývá jistý posun, kdy při stejné metodice jsou získány naprosto odlišné výsledky než před 10 lety (154, 155). Tyto úvahy vedou oprávněně k názoru, že v současné době byl překročen pomyslný práh a odolnost enterobakterií k širokospektrým cefalosporinům je natolik výrazná, že ani omezení jejich spotřeby nevede k poklesu rezistence, zatímco ještě před 10 lety bylo možné zmírněním selekčního tlaku snížit procento rezistentních kmenů. Tím pomyslným prahem je míněna určitá hladina genů rezistence kolující v bakteriální populaci,

keré se horizontálně přenáší rekombinačními procesy a způsobují nezadržitelné šíření odolnosti k antibiotikům nezávislé na jejich spotřebě.

To v sobě nese kacířskou myšlenku, že racionální antibiotická politika nezvrátí ani nezastaví růst rezistence a že se ocitáme skutečně na konci antibiotické éry. Nicméně ani tyto pesimistické vyhlídky by nás neměly odradit od dodržování, popř. zlepšování zásad racionální antibiotické léčby, protože jen tak můžeme zpomalit tempo tohoto negativního vývoje.

Dále stojí za zmínku spotřeba piperacilinu s tazobaktamem, která na rozdíl od ostatních sledovaných antibiotických skupin stále stoupá, což je dáno jeho preferováním v léčbě nozokomiálních infekcí před použitím širokospektrých cefalosporinů. Důvodem je snaha o restrikcii cefalosporinů III. generace s cílem zabránit zvyšování četnosti kmenů produkujících širokospektré beta-laktamázy. V literatuře se popisuje, že kombinace piperacilinu s tazobaktamem je rovnocennou alternativou k ceftazidimu, navíc disponující výhodou, že ani při jeho zvýšené spotřebě nedochází k nárůstu rezistence (159–161). Piroth et al. ve své studii dokonce tvrdí, že použití beta-laktamu s inhibítorem beta-laktamáz je protektivním faktorem a snižuje incidenci rekolonizace ESBL-pozitivním izolátem (162). Podle předložené práce je patrné, že nahrazení terapie širokospektrými cefalosporiny za léčbu piperacilinem s tazobaktamem nevedlo ke snížení odolnosti enterobakterií k cefalosporinům vyšších generací. To je pravděpodobně výsledkem šíření rezistence rekombinačními procesy. Nelze však vyloučit ani možnost, že působení selekčního tlaku kombinace piperacilin/tazobaktam má vliv na zvyšování prevalence producentů širokospektrých beta-laktamáz, což by odporovalo výše uvedeným studiím. Podobné výsledky publikoval i Meyer et al. ve své pětileté intervenční studii, kdy po změně standardní terapie intraabdominálních infekcí z cefalosporinů III. generace na kombinovaný piperacilin/ tazobaktam nedošlo oproti očekávání k poklesu rezistence k cefalosporinům III. generace (163). I Meyer připouští, mezi jinými, hypotézu, že kombinovaný piperacilin s tazobaktamem může svým selekčním tlakem zvyšovat prevalenci ESBL-pozitivních enterobakterií. Bude potřeba dalších studií na tomto poli, aby se zjistily příčiny stoupajícího vývoje rezistence k některým skupinám antibiotik bez závislosti na jejich spotřebě a případně se mohla zavést opatření, která by efektivně zabraňovala růstu bakteriální rezistence.

Je vhodné zdůraznit, že bakteriální rezistence je významným limitujícím faktorem úspěšnosti antibiotické léčby. Bohužel lze očekávat, že u těch antimikrobiálních skupin, ke kterým byla překročena únosná mez rezistence, se nepodaří odvrátit její zvyšující se trend. Je pravděpodobné, že selekční tlak antibiotik, jakožto faktor šíření bakteriální rezistence, se dostává do pozadí a hlavní roli přebírají rekombinační procesy, popř. klonální šíření

rezistentních bakteriálních kmenů. Aby byla udržena citlivost bakterií aspoň k těm skupinám antibiotik, které jsou dosud účinné, a zpomalen vývoj stoupající antibiotické rezistence, je nadále nutné dodržovat zásady racionální antibiotické politiky a zabraňovat klonálnímu šíření hygienicko-epidemiologickými postupy.

#### **5.4.2. Vliv selekčního tlaku karbapenemů na bakteriální rezistenci**

Karbapenemy jsou první volbou v případě infekcí způsobené ESBL- a AmpC-pozitivními enterobakteriemi. Protože prevalence těchto agens neustále narůstá, zvyšuje se i spotřeba karbapenemů. To s sebou nese negativní důsledek v podobě zvýšeného selekčního tlaku těchto antibiotik v případě enterobakterií, ale i gramnegativních nefermentujících tyček jako je *Pseudomonas aeruginosa*. Na základě výsledků této disertační práce byl prokázán velmi rapidní nárůst rezistence kmenů *Pseudomonas aeruginosa* během šestiletého období z 26 % na 40 % ve FNOL a z 38 % na 60 % na KARIM. Podobně strmý nárůst referují i jiní autoři. Lipový et al. poukazují na vzrůstající trend nejen prevalence tohoto species, ale i rezistence u vážně popálených pacientů. Během desetileté studie vzrostl počet kmenů *Pseudomonas aeruginosa* ze 146 kmenů v roce 2000 na 521 v roce 2009. Meropenem vykázal největší nárůst rezistence ze všech sledovaných antibiotik, a to z 18 % na 58 % (164). Croughs et al. referovali během 13leté studie nárůst rezistence kmenů *Pseudomonas aeruginosa* k imipenemu z 5 % na 19 % a k meropenemu z 8 % na 17 % na jednotkách intenzivní péče 14 nizozemských nemocnic (165).

Z uvedeného vyplývá, že léčba infekcí způsobených gramnegativními tyčkami představuje značně problematický přístup. Zdánlivě jednoduché řešení infekcí způsobených ESBL- a AmpC-pozitivními enterobakteriemi – aplikace karbapenemů – vede k nárůstu četnosti meropenem-rezistentních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* a způsobuje vznik a šíření producentů karbapenemáz. Enterobakterie produkující karbapenemázy byly již v České republice zaznamenány (26,49,51,52).

Současná závažná situace bakteriální rezistence k antimikrobním přípravkům nemá v tuto chvíli jednoznačné řešení. Je zřejmé, že karbapenemy jsou pro své široké spektrum, výhodnou farmakokinetiku a nízkou toxicitu velmi oblíbená antibiotika a je nutné udělat vše pro to, aby jejich účinnost zůstala co nejdéle zachována. Z toho důvodu je vhodné okamžitě po určení původce infekce a jeho citlivosti k antibiotikům deescalovat léčbu a v případě, že je to možné, nahradit karbapenem antibiotikem s užším spektrem účinku a efektem na dané etiologické agens.

## 6. ZÁVĚRY

Na základě výsledků postgraduálního studia zaměřeného na výskyt, fenotypovou detekci a klinický význam širokospektrých beta-laktamáz u kmenů čeledi *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonas aeruginosa* je možné formulovat následující závěry:

1. Byla prokázána možnost falešné citlivosti enterobakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy typu ESBL a AmpC k širokospektrým cefalosporinům v rozmezí 2-13 % a rovněž enterobakterií produkujících karbapenemázy ke karbapenemům v rozmezí 5-43 % (hodnoceno mikrodiluční metodou podle kritérií EUCAST). Je vhodné provádět detekci těchto enzymů pomocí specifických metod, jako jsou modifikovaný DDST, AmpC-test či Carba NP test, které vykazují nejvyšší senzitivitu.

2. Byl potvrzen výskyt ESBL a AmpC beta-laktamáz u enterobakterií izolovaných z klinického materiálu vybraných souborů pacientů. Výsledky jsou shrnuty v následujících bodech:

a) Prevalence ESBL-pozitivních enterobakterií v gastrointestinálním traktu pacientů hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Olomouc v roce 2010 byla 8 % a v komunitním prostředí olomouckého regionu 3 %. Ve srovnání s rokem 2007 došlo k signifikantnímu nárůstu gastrointestinálního nosičství ze 3 % u hospitalizovaných pacientů a 1 % u komunitních pacientů. Naproti tomu u hemato-onkologických pacientů činila na přelomu roku 2012 a 2013 prevalence gastrointestinálního nosičství ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií 21 %. Bylo prokázáno, že kmeny kolonizující trávicí trakt mohou způsobit manifestní infekci.

b) Nejčastějšími etiologickými agens bakteriálních nozokomiálních pneumonií u pacientů v intenzivní péči v České republice jsou *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. Enterobakterie způsobující nozokomiální pneumonie produkovaly širokospektré beta-laktamázy typu ESBL a AmpC v 37 %. U těchto species byla zjištěna velmi vysoká rezistence k antibiotikům. Padesátiprocentní hranici přesahuje rezistence kmenů *Klebsiella pneumoniae* k cefalosporinům III. a IV. generace, fluorochinolonům, gentamicinu, kotrimoxazolu a piperacilin/tazobaktamu a rezistence kmenů *Pseudomonas aeruginosa* k meropenemu a ciprofloxacinu. Nemocniční mortalita pacientů činila 30 %, adekvátní iniciální léčbu obdrželo 51 % pacientů.

c) Byla potvrzena přítomnost ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií v nemocničním prostředí jednotek intenzivní péče a bylo prokázáno minoritní klonální šíření těchto kmenů. Všechny tyto klony pocházely pouze z povrchů prostředí, nikoli z klinického materiálu pacientů či stěrů od personálu.

3. Byl potvrzen výskyt karbapenem-rezistentních enterobakterií a kmenů *Pseudomonas aeruginosa* izolovaných z klinického materiálu vybraných souborů pacientů. Výsledky jsou shrnuty v následujících bodech:

a) Rezistence enterobakterií ke karbapenemům ve Fakultní nemocnici Olomouc je nízká, ale byl zjištěn stoupající trend rezistence mezi lety 2009 – 2014 (0,07 – 0,3 %). Prevalence gastrointestinálního nosičství karbapenem-rezistentních enterobakterií na hemato-onkologické klinice činila 2 %. Rezistence ke karbapenemům ve FNOL byla způsobena produkcí ESBL-beta-laktamáz spolu s jiným mechanismem jako je snížená propustnost buněčné stěny a bakteriální eflux.

b) Rezistence pseudomonád ke karbapenemům ve Fakultní nemocnici Olomouc a Vojenské nemocnici Olomouc je velmi vysoká. Byl prokázán rostoucí trend rezistence mezi lety 2008 – 2013 (30 % – 43 %, resp. 46 % – 56 %). Rezistence pseudomonád ke karbapenemům ve FNOL byla způsobena produkcí AmpC-beta-laktamáz spolu s jiným mechanismem jako je snížená propustnost buněčné stěny a bakteriální eflux.

4. Byl prokázán pozitivní selekční tlak beta-laktamových antibiotik na rezistenci enterobakterií a *Pseudomonas aeruginosa*. Výsledky jsou shrnuty v následujících bodech:

a) Byl prokázán vliv selekčního tlaku piperacilinu s tazobaktamem na vývoj rezistence *Klebsiella pneumoniae* k tomuto antibiotiku, a rovněž na vývoj rezistence *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli* k ceftazidimu. Zároveň se neprokázal vliv selekčního tlaku širokospektrých cefalosporinů na vývoj rezistence k těmto antibiotikům. Růst rezistence k této skupině antibiotik je patrně způsoben nezadržitelným horizontálním šířením genů rezistence pomocí rekombinačních procesů.

b) Spotřeba karbapenemů vykazuje pozitivní selekční tlak na vývoj rezistence *Pseudomonas aeruginosa* k těmto antibiotikům.



## 7. SOUHRN

Beta-laktamová antibiotika jsou širokou a různorodou skupinou přípravků, které jsou velmi oblíbené pro svůj rychlý baktericidní účinek, nízkou toxicitu, široké terapeutické rozmezí, malé množství lékových interakcí, výhodné farmakokinetické vlastnosti a relativně nízkou cenu. Z důvodu velkého množství jejich pozitivních vlastností jsou velmi často aplikována v ambulantní praxi, na standardních odděleních i jednotkách intenzivní péče. To s sebou nese nežádoucí účinek v podobě narůstající odolnosti bakterií k těmto antibiotikům. V současnosti je problém zvyšující se rezistence natolik závažný, že je považován za jedno z největších globálních rizik přímo ohrožující stabilitu světového zdravotnického systému.

Nejčastějším mechanismem rezistence k beta-laktamovým antibiotikům u gramnegativních bakterií je produkce beta-laktamázy. Závažný klinický význam mají především širokospektré beta-laktamázy typu ESBL a AmpC a v současnosti i karbapenamázy. Pro adekvátní antibiotickou terapii infekcí způsobených producenty těchto enzymů je nutné rychle a správně identifikovat nejen etiologické agens a jejich citlivost k antibiotikům, ale i detekovat přítomnost těchto nebezpečných fenotypů rezistence. Jedním z cílů této práce bylo stanovení senzitivity fenotypových metod pro detekci širokospektrých beta-laktamáz a karbapenemáz a vybrat nejvhodnější pro rutinní mikrobiologickou praxi. Z výsledků vyplývá, že detekce širokospektrých beta-laktamáz by měla být založena na specifických fenotypových metodách, zejména diskových difúzních testech, které vykazovaly vysokou senzitivitu (100 % v případě mDDST pro ESBL, v případě mAmpC testu 95 %). Pro detekci karbapenemáz se jeví jako optimální Carba NP test, který na základě našich výsledků vykazoval 92% senzitivitu. Navíc je tento test velmi rychlý a výsledek je k dispozici ještě tentýž den, je snadno interpretovatelný a schopný detekovat všechny třídy karbapenemáz. Všechny výše zmíněné fenotypové testy disponují výhodnými vlastnostmi jako je nízká cena, jednoduché provedení a žádné nároky na přístrojové vybavení, což jsou přednosti, které ocení i malé mikrobiologické laboratoře.

Dalším cílem této doktorské práce bylo zjistit výskyt enterobakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC u vybraných skupin pacientů a v nemocničním prostředí. Z výsledků vyplývá, že v roce 2010 prevalence ESBL-pozitivních enterobakterií v gastrointestinálním traktu hospitalizovaných pacientů FNOL byla 8 % a v komunitním prostředí olomouckého regionu činila 3 %. U hemato-onkologických pacientů činila prevalence gastrointestinálního nosičství ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií 21 %. Bylo rovněž prokázáno, že kmeny kolonizující trávicí trakt mohou způsobit klinicky zřejmou infekci.

V současné době jednou z nejzávažnějších a nejčastějších komplikací u pacientů hospitalizovaných na jednotkách intenzivní péče je nozokomiální pneumonie. Je také jednou z nejvýznamnějších příčin morbidit a mortality. Včasné nasazení správného antibiotika hned napoprvé je pro úspěšnost léčby a přežití pacienta klíčové. Z toho důvodu se tato práce zabývala rovněž stanovením nejčastějších etiologických agens nozokomiálních pneumonií v České republice a jejich rezistencí k antibiotikům. Z výsledků je patrné, že u pacientů v intenzivní péči byly nejčastějšími etiologickými agens bakteriálních nozokomiálních pneumonií identifikovány *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. U těchto species byla zjištěna velmi vysoká rezistence k antibiotikům. Enterobakterie způsobující nozokomiální pneumonie produkovaly širokospektré beta-laktamázy typu ESBL a AmpC v 37 %. Vysoká rezistence patogenních bakterií vyústila ve vysoké procento pacientů, kteří neobdrželi adekvátní iniciální léčbu (49 %), a ve vysokou nemocniční mortalitu (30 %). Na základě výsledků je doporučena kombinační iniciální antibiotická léčba obsahující beta-laktamové antibiotikum s účinkem na *Pseudomonas aeruginosa* a aminoglykosid pro rozšíření spektra a zvýšení pravděpodobnosti efektivnosti terapie.

V nemocničním prostředí jednotek intenzivní péče byly nalezeny enterobakterie produkující ESBL- a AmpC širokospektré beta-laktamázy ve stěrech z prostředí i stěrech od personálu. Bylo zjištěno klonální šíření některých izolátů, ale jednalo se o menší podíl a všechny tyto klony pocházely pouze z povrchů prostředí, nikoli z klinického materiálu pacientů či stěrů personálu. Práce prokázala dobrou úroveň hygienicko-epidemiologických opatření na sledovaných odděleních.

Dalším a velmi významným cílem, který si tato práce stanovila, bylo stanovení četnosti enterobakterií a kmenů *Pseudomonas aeruginosa* rezistentních ke karbapenemům a zjistit mechanismy této rezistence. Z výsledků je zřejmá nízká prevalence enterobakterií rezistentních ke karbapenemům ve Fakultní nemocnici Olomouc. Problémem je ale stoupající trend rezistence, a to z 0,07 % v roce 2009 na 0,3 % v roce 2014. Ve sledovaném období roku 2014 činila prevalence gastrointestinálního nosičství karbapenem-rezistentních enterobakterií u hemato-onkologických pacientů 2 %. Rezistence ke karbapenemům byla způsobena produkcí širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL a AmpC spolu s jiným přidruženým mechanismem, především sníženou propustností buněčné stěny a bakteriálním efluxem. Rezistence kmenů *Pseudomonas aeruginosa* ke karbapenemům je velmi vysoká. Byl prokázán rostoucí trend rezistence mezi lety 2008 – 2013 (30 % – 43 % ve Fakultní nemocnici Olomouc, resp. 46 % – 56 % ve Vojenské nemocnici Olomouc). Ve Fakultní nemocnici Olomouc zatím nebyly kmeny *Pseudomonas aeruginosa* produkující

karbapenemázy detekovány. Je zřejmé, že rezistence pseudomonád ke karbapenemům je ve Fakultní nemocnici Olomouc způsobena hyperprodukcí AmpC enzymů spolu s jiným přidruženým mechanismem.

Stoupající trend rezistence k antibiotikům je pozorován celosvětově v dlouhodobém měřítku. Prevalence nebezpečných fenotypů rezistence (produkce širokospektrých beta-laktamáz u gramnegativních bakterií, meticilin-rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus*, enterobakterie rezistentní k fluorochinolonům aj.) je v současnosti natolik výrazná, že se v odborné společnosti hovoří o konci antibiotické éry medicíny. Šíření bakteriální rezistence je dáno třemi mechanismy: selekčním tlakem antibiotik, rekombinačními procesy bakterií a horizontálním šířením epidemicky úspěšných bakteriálních klonů. V této doktorské práci, která se zabývala beta-laktamovými antibiotiky a rezistencí k nim, se podařilo prokázat vliv selekčního tlaku piperacilinu s tazobaktamem na vývoj rezistence *Klebsiella pneumoniae* k tomuto antibiotiku a rovněž na vývoj rezistence *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli* k ceftazidimu a vliv selekčního tlaku karbapenemů na vývoj rezistence *Pseudomonas aeruginosa* k těmto antibiotikům. Naproti tomu přímý vliv selekčního tlaku širokospektrých cefalosporinů nebyl prokázán pro jejich stále se snižující spotřebu a zároveň rostoucí bakteriální rezistenci k nim. Je zřejmé, že odolnost enterobakterií k širokospektrým cefalosporinům je natolik výrazná, že ani omezení jejich spotřeby nevede k poklesu rezistence. Vysvětlení může spočívat v tzv. „prahové teorii“, podle níž při překročení určité hladiny genů rezistence kolujících v bakteriální populaci, které se horizontálně přenášejí rekombinačními procesy, dochází k nezadržitelnému šíření odolnosti k antibiotikům nezávislému na jejich spotřebě. To v sobě nese kacířskou myšlenku, že ani racionální antibiotická politika nezvrátí ani nezastaví růst rezistence a že se ocitáme skutečně na konci antibiotické éry. Nicméně ani tyto pesimistické vyhlídky by nás neměly odradit od dodržování, popř. zlepšování zásad racionální antibiotické léčby, protože jen tak můžeme zpomalit tempo tohoto negativního vývoje.

## 8. SUMMARY

Beta-lactam antibiotics are a large and varied group of drugs that are very popular for their rapid bactericidal effect, low toxicity, broad therapeutic range, few drug interactions, favorable pharmacokinetic properties and relatively low price. Because of their numerous positive properties, they are very often used in outpatient practice, general wards and intensive care units. This brings about adverse effects in the form of increasing resistance of bacteria to these antibiotics. At the present time, the problem of increasing resistance is so serious that it is considered as one of the greatest global risks directly threatening the stability of the world's health care system.

The most frequent mechanism of resistance to beta-lactam antibiotics in Gram-negative bacteria is production of beta-lactamases. Those having serious clinical significance are mainly ESBL and AmpC broad-spectrum beta-lactamases and, recently, carbapenemases. For adequate antibiotic therapy of infections caused by producers of these enzymes, it is necessary to not only rapidly and correctly identify the etiological agents and their susceptibility to antibiotics but also detect the presence of these dangerous phenotypes of resistance. One of the objectives of this dissertation was to determine the sensitivity of phenotypic methods for detecting broad-spectrum beta-lactamases and carbapenemases and to select the most suitable ones for routine microbiology practice. The results suggest that the detection of beta-lactamases should be based on specific phenotypic methods, in particular the disk diffusion test, showing high sensitivity (100% in case of the mDDST for ESBL; 95% in case of the mAmpC test). For detection of carbapenemases, the Carba NP test seems to be optimal, showing 92% sensitivity based on our results. Moreover, the test is very rapid, with the results being available on the same day, easy to interpret and able to detect all carbapenemase classes. All the above phenotypic tests have favorable properties such as low price, easy use and no need of equipment, advantages appreciated by small microbiology laboratories as well.

Another objective of the dissertation was to determine the prevalence of *Enterobacteriaceae* producing ESBL and AmpC broad-spectrum beta-lactamases in selected groups of patients and in the hospital environment. The results showed that in 2010, the prevalence rates of ESBL-positive *Enterobacteriaceae* were 8% in the gastrointestinal tract of patients staying in the University Hospital Olomouc and 3% in the community of the Olomouc region. In hemato-oncology patients, the prevalence of gastrointestinal carriage of ESBL- and AmpC-positive *Enterobacteriaceae* was 21%. It was also proved that strains colonizing the digestive tract may cause manifest infection.

At the present time, one of the most serious and frequent complications in patients staying in intensive care units is hospital-acquired pneumonia. It is also one of the most important causes of morbidity and mortality. Early administration of the correct antibiotic on the first attempt is key to the success of treatment and survival of the patient. Therefore, this dissertation was also concerned with determination of the most frequent etiological agents of hospital-acquired pneumonia in the Czech Republic and their resistance to antibiotics. The results clearly show that in intensive care patients, the most common pathogens causing bacterial hospital-acquired pneumonia were *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. These species were found to be highly resistant to antibiotics. Enterobacteriaceae causing hospital acquired pneumonia produced ESBL and AmpC broad-spectrum beta-lactamases in 37%. High resistance of bacterial pathogens resulted in a high percentage of patients not receiving adequate initial therapy (49%) and in high in-hospital mortality (30%). Based on the results, combined initial antibiotic therapy is recommended, containing a beta-lactam antibiotic effective against *Pseudomonas aeruginosa* and an aminoglycoside to extend the spectrum and increasing the likelihood of effectiveness of the therapy.

In the hospital environment of intensive care units, *Enterobacteriaceae* producing ESBL and AmpC broad-spectrum beta-lactamases were found in swabs taken from both the environment and staff. Some isolates were found to spread clonally. However, this was only a small proportion and all these clones were only from environmental surfaces and not from patients' clinical samples or staff swabs. A good level of hygienic and epidemiological measures taken at the investigated departments was demonstrated.

Another and very important objective of the dissertation was to determine the frequency of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to carbapenems and the mechanisms of this resistance. The results revealed low prevalence rates of *Enterobacteriaceae* resistant to carbapenems in the University Hospital Olomouc. However, there is a problem with increasing resistance, from 0.07% in 2009 to 0.3% in 2014. As of the year 2014, no strain producing carbapenemases was detected. In 2014, the prevalence of gastrointestinal carriage of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in hemato-oncology patients was 2%. Resistance to carbapenems was caused by production of ESBL and AmpC broad-spectrum beta-lactamases with other associated mechanisms, in particular decreased permeability of the cell wall or bacterial efflux pump. The resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains to carbapenems is very high. Once again, an increasing trend was

demonstrated between 2008 and 2013 (30% – 43% in the University Hospital Olomouc; 46% – 56% in the Military Hospital Olomouc). In the University Hospital Olomouc, *Pseudomonas aeruginosa* strains producing carbapenemases have not been detected as yet. It is apparent that resistance of *Pseudomonas* spp. to carbapenems in the University Hospital Olomouc is caused by hyperproduction of AmpC enzymes with other associated mechanisms.

In the long-term perspective, there has been a global trend of increasing resistance to antibiotics. The prevalence of dangerous phenotypes of resistance (production of broad-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria, methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*, Enterobacteriaceae resistant to fluoroquinolones, etc.) is currently so considerable that the experts speak about the end of the antibiotic era of medicine. The spread of bacterial resistance is due to three mechanisms: selection pressure of antibiotics, bacterial recombination processes and horizontal spread of epidemically successful bacterial clones. This dissertation, concerned with beta-lactam antibiotics and resistance to them, showed the effect of selection pressure of piperacillin with tazobactam on the development of resistance of *Klebsiella pneumoniae* to this antibiotic, as well as the development of resistance of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* to ceftazidime, and the effect of selection pressure of carbapenems on the development of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to these antibiotics. By contrast, the direct effect of selection pressure of broad-spectrum cephalosporins was not confirmed due to both their decreasing consumption and increasing bacterial resistance to them. It is apparent that resistance of Enterobacteriaceae to broad-spectrum cephalosporins is so significant that it could not even be decreased by reduction of their consumption. This may be explained by the so-called threshold theory stating that crossing a certain level of resistance genes circulating in the bacterial population that are horizontally transmitted by recombination processes causes the unstoppable spread of antibiotic resistance independent of their consumption. This leads to a heretical notion that rational antibiotic policy will neither reverse nor inhibit the increase of resistance and this may actually be the end of the antibiotic era. Nevertheless, even this gloomy outlook should not discourage us from adhering to or improving the principles of rational antibiotic therapy as this is the only way of slowing this negative trend.

## 9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1) Havlík J. Jaké mohou být důvody pro změny v dávkování antibiotik? *Pediatr. praxi* 2004;4:185-188.
- 2) McKenzie C. Antibiotic dosing in critical illness. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66 Suppl 2: ii25 –ii31.
- 3) Bolus J, Turner RB. Prolonged-Infusion Dosing of Beta-Lactam Antibiotics. *US Pharm* 2015;40:HS19-23.
- 4) Roberts JA, Paratz J, Paratz E, Krueger WA, Lipman J. Continuous infusion of beta-lactam antibiotics in severe infections: a review of its role. *Int J Antimicrob Agents* 2007;30:11–18.
- 5) Corey G, Wilcox M, Talbot G, et al. Integrated analysis of CANVAS 1 and 2: Phase 3, multicenter, randomized, double-blind studies to evaluate the safety and efficacy of ceftaroline versus vancomycin plus aztreonam in complicated skin and skin-structure infection. *Clin Infect Dis* 2010;51:641-650.
- 6) Zhong NS, Sun T, Zhuo C, et al. Ceftaroline fosamil versus ceftriaxone for the treatment of Asian patients with community-acquired pneumonia: a randomised, controlled, double-blind, phase 3, non-inferiority with nested superiority trial. *Lancet Infect Dis* 2015;15:161 – 171.
- 7) Lucasti C, Popescu I, Ramesh MK, Lipka J, Sable C. Comparative study of the efficacy and safety of ceftazidime/avibactam plus metronidazole versus meropenem in the treatment of complicated intra-abdominal infections in hospitalized adults: results of a randomized, double-blind, phase II trial. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:1183–1192.
- 8) Vazquez JA, González Patzán LD, Stricklin D, et al. Efficacy and safety of ceftazidime-avibactam versus imipenem-cilastatin in the treatment of complicated urinary tract infections, including acute pyelonephritis, in hospitalized adults: results of a prospective, investigator-blinded, randomized study. *Curr Med Res Opin* 2012;28:1921–1931.
- 9) Abraham AP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 1940;146:837.
- 10) Sir Alexander Fleming - Nobel Lecture: Penicillin" [online]. 2014 [citováno 10. 6. 2015]. Dostupné z: <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.html)>
- 11) WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance [online]. 2014 [citováno 15. 6. 2015]. Dostupné z: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1)

- 12) The European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) [online]. 2015 [citováno 10. 6. 2015]. Dostupné z: <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/database/Pages/database.aspx>
- 13) Schwaber MJ, Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:913-920.
- 14) Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-  $\beta$  -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1987-1994.
- 15) Zavascki AP, Barth AL, Goldani LZ. Nosocomial bloodstream infections due to metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:1183-1185.
- 16) Jacoby GA, Bush K. Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant  $\beta$ -lactamases [online]. 2014 [citováno 15. 6. 2015]. Dostupné z: <http://www.lahey.org/Studies/>
- 17) Bush K, Jacoby GA. An updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:969-976.
- 18) Bradford PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933–951.
- 19) Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$  -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-1233.
- 20) Ambler RP, Meadway RJ. Chemical structure of bacterial penicillinases. *Nature* 1969;222:24-26.
- 21) Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D, Carmeli Y. High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chem* 2005;49:2137–2139.
- 22) Canton R, Novais A, Valverde A, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Inf* 2008;Suppl 1:144–153.
- 23) Bush K. Bench-to-bedside review: The role of  $\beta$ -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Critical Care* 2010;14:224.



- 24) Paterson DL. Resistance in Gram-Negative Bacteria: *Enterobacteriaceae*. Am J Med 2006;119:S20-S28.
- 25) Rahal JJ, Urban C, Horn D. Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. JAMA 1998;280:1233-1237.
- 26) Hrabák J, Fridrichová M, Štolbová M, et al. First identification of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. Euro Surveill 2009;14:2-3.
- 27) Kuwabara S, Abraham EP. Some properties of two extracellular  $\beta$ -lactamases from *Bacillus cereus* 569/H. Biochem J 1967;103:27C-30C.
- 28) Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, et al. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:3026–3029.
- 29) Villegas MV, Lolans K, Correa A, et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:2880–2882.
- 30) Cai JC, Zhou HW, Zhang R, et al. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:2014–2018.
- 31) Cuzon G, Naas T, Demachy MC, et al. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:796–797.
- 32) Petrella S, Ziental-Gelus N, Mayer C, et al. Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely broad-spectrum class A beta-lactamase KPC-2 identified in an *Escherichia coli* strain and an *Enterobacter cloacae* strain isolated from the same patient in France. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:3725–3736.
- 33) Villegas MV, Lolans K, Correa A, et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:1553–1555.
- 34) Bratu S, Mooty M, Nichani S, et al. Emergence of KPC-Possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: Epidemiology and Recommendations for Detection. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:3018–3020.
- 35) Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:147–151.

- 36) Hanson ND, Hossain A, Buck L, Moland Ellen S, Thomson Kenneth S. First occurrence of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in the United States producing an IMP metallo- $\beta$ -lactamase, IMP-18. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2272–2273.
- 37) Peleg AY, Franklin C, Bell J, Spelman DW. Emergence of IMP-4 metallo- $\beta$ -lactamase in a clinical isolate from Australia. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:699–700.
- 38) Giske CG, Libisch B, Colinon C, et al. Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2006;44:4309-4315.
- 39) Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, et al. Cloning and characterization of *bla*VIM, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1584–1590.
- 40) Toleman MA, Simm AM, Murény TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:673–679.
- 41) Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, *bla*GIM-1, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4654–4661.
- 42) Lee K, Yum JH, Yong D. Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*SIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4485–4491.
- 43) Castanheira M, Woosley LN, Mendes RE, Sader HS, Jones RN. Carbapenemase occurrences among *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. from Europe and the Americas (2007 – 2009). Poster presented at: 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; September 2010; Boston, USA. [online]. [Citováno 16. 6. 2012]. Dostupné z: [www.jmilabs.com/data/posters/ICAAC2010/D-743.pdf](http://www.jmilabs.com/data/posters/ICAAC2010/D-743.pdf)
- 44) Turner PJ. Trends in antimicrobial susceptibilities among bacterial pathogens isolated from patients hospitalized in European medical centers: 6-year report of the MYSTIC Surveillance Study (1997–2002). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;51:281–289.
- 45) European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Report Antimicrobial resistance surveillance in Europe. [online]. 2010 [Citováno 16. 6. 2012]. Dostupné z: [http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111\\_SUR\\_AMR\\_data.pdf.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111_SUR_AMR_data.pdf.pdf).

- 46) Mavroidi A, Neonakis I, Liakopoulos A, et al. Detection of *Citrobacter koseri* carrying beta-lactamase KPC-2 in a hospitalised patient, Greece, July 2011. Euro Surveill 2011;16(41):pii=19990.
- 47) Zagorianou A, Sianou E, Iosifidis E, et al. Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004–2010. Euro Surveill 2012;17:pii=20088.
- 48) Lübbert Ch, Lippmann N, Rodloff AC. Systematisches screening ist notwendig. Dtsch Arzteblatt 2015;46:A2206-A2207.
- 49) Hrabák J, Bébřová E, Nyč O, et al. Záchyt kmene *Serratia marcescens* současně produkujícího metalo- $\beta$ -laktamázu (MBL), širokospektrou  $\beta$ -laktamázu (ESBL) a dvě  $\beta$ -laktamázy typu AmpC ve FN Motol. Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2009;18:139-141.
- 50) Hrabák J, Žemličková H. Výskyt multirezistentních gramnegativních bakterií v českých nemocnicích – upozornění na problém šíření bakterií produkujících transferabilní karbapenamázy. [online]. 2011 [Citováno 16. 6. 2012]. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/doporucene\\_postupy/surveillance\\_g/aktivni\\_surveillance\\_multirezistentnich\\_gramnegativnich\\_bakterii.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/doporucene_postupy/surveillance_g/aktivni_surveillance_multirezistentnich_gramnegativnich_bakterii.pdf)
- 51) Žemličková H, Hrabák J, Hedlová D, et al. Výskyt importovaných CPE (Carbapenemase Producing *Enterobacteriaceae*) nálezů v České republice v období září – prosinec 2011. Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2012;21:15–18.
- 52) Studentova V, Dobiasova H, Hedlova D, Dolejska M, Papagiannitsisa CC, Hrabak J. Complete Nucleotide Sequences of Two NDM-1-Encoding Plasmids from the Same Sequence Type 11 *Klebsiella pneumoniae* Strain. Antimicrob Agents Chemother 2015 59:1325-1328.
- 53) Medeiros AA, Crellin J. Comparative susceptibility of clinical isolates producing extended-spectrum beta-lactamases to ceftibuten: effect of a large inoculum. Pediatr Infect Dis J 1997;16:S49–S55.
- 54) Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. Jour Clin Microbiol 2001;39:2206–2212.
- 55) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. [online] Version 4.0, 2014. [Citováno 16. 5. 2015]. Dostupné z: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints)

- 56) Kotapati S, Kuti JL, Nightingale CH, Nicolau DP. Clinical implications of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Klebsiella* species and *Escherichia coli* on cefepime effectiveness. *J Inf* 2005;51:211–217.
- 57) Zanetti G, Bally F, Greub G, et al. Cefepime versus imipenem-cilastatin for treatment of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients: a multicenter, evaluator-blind, prospective, randomized study. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3442–3447.
- 58) Htoutou-Sedlakova M, Hanulik V, Chroma M, et al. Phenotypic detection of broad-spectrum beta-lactamases in microbiological practice. *Med Sci Monit* 2011;17:BR147-152.
- 59) Gavin PJ, Suseno MT, Thomson RB Jr, et al. Clinical correlation of the CLSI susceptibility breakpoint for piperacillin- tazobactam against extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2244-2247.
- 60) Wiskirchen DE, Nordmann P, Crandon JL, Nicolau DP. Efficacy of humanized carbapenem and ceftazidime regimens against *Enterobacteriaceae* producing the OXA-48 carbapenemase in a murine infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:1678–1683.
- 61) Mimos O, Grégoire N, Poirel L, Marliat M, Couet W, Nordmann P. Broad-spectrum  $\beta$ -lactam antibiotics for treating experimental peritonitis in mice due to *Klebsiella pneumoniae* producing the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2759–2760.
- 62) Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Piperaki E, Souli M, Daikos GL. Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:862–872.
- 63) Lee CS, Doi Y. Therapy of Infections due to Carbapenem-Resistant Gram-Negative Pathogens. *Infect Chemother* 2014;46:149-164.
- 64) Dellinger RP, Carlet JM, Masur H et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2004;30:536-555.
- 65) Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive Screening Tests for Suspected Class A Carbapenemase Production in Species of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2009;47:1631–1639.
- 66) Hrabák J, Vaniš V, Bergerová T, Jindrák V, Chudáčková E, Urbášková P. Průkaz metalo- $\beta$ -laktamáz (MBL) u gramnegativních bakterií. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2007;16:417-422.

- 67) Pournaras S, Poulou A, Tsakris A. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* in clinical practice by using boronic acid compounds. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1319–1321.
- 68) Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo--lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:88–91.
- 69) Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid Detection of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases* 2012;9:1503-1507.
- 70) Arlet G, Brami G, Decre D et al: Molecular characterisation by PCR restriction fragment length polymorphism of TEM beta-lactamases. *FEMS Microbiol Lett* 1995;134:203–208.
- 71) Chanawong A, M’Zali FH, Heritage J, et al. Characterisation of extended-spectrum beta-lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *FEMS Microbiol Lett* 2000;184:85–89.
- 72) Pagani L, Dell’Amico E, Migliavacca R et al: Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in Northern Italy. *J Clin Microbiol* 2003;41:4264–4269.
- 73) Pérez-Pérez FJ, Hanson ND: Detection of plasmid-mediated AmpC b-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:2153–2162.
- 74) Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS, et al. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob. Agents Chemother* 2000;44:3035–3039.
- 75) Radice M, Power P, Gutkind G, et al. First class A carbapenemase isolated from *Enterobacteriaceae* in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1068–1069.
- 76) Aubron C, Poirel L, Ash Ronald J, Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis* 2005;11:260–264.
- 77) Bradford PA, Bratu S, Urban C, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenemhydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis* 2004;39:55–60.
- 78) Weldhagen GF, Prinsloo A. Molecular detection of GES-2 extended spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Pretoria, South Africa. *Int J Antimicrob Agents* 2004;24:35–38.

- 79) Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ. Metallo- $\beta$ -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2224–2228.
- 80) Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *blaGIM-1*, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4654–4661.
- 81) Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:196–199.
- 82) Poirel L, Heritier C, Toluen V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:15–22.
- 83) Anatomical therapeutic chemical (ATC) index (including defined daily doses (DDDs) for plain substances) Oslo: WHO collaboration centre for drug statistics methodology, 1996.
- 84) Bergman U, Christerson I, Jansson B, Wiholm BE. Auditing drug utilization by means of defined daily dose per bed-day. A methodological study. *Eur J Clin Pharmacol* 1980;17:183–187.
- 85) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, nineteenth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA. 2009; 29:M100-S19.
- 86) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. [online] 2009. [Citováno 15. 4. 2010]. Dostupné z: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints).
- 87) Wiegand I, Geiss HK, Mack D, Sturenburg E, Seifert H. Detection of extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. *J Clin Microbiol* 2007;45:1167–1174.
- 88) Linscott AJ, Brown WJ. Evaluation of four commercially available extended-spectrum beta-lactamase phenotypic confirmation tests. *J Clin Microbiol* 2005;43:1081–1085.
- 89) Bratu S, Mooty M, Nichani S et al. Emergence of KPC-Possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: Epidemiology and Recommendations for Detection. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3018–3020.
- 90) Marschall J, Tibbetts RJ, Dunnel WM, Frye JG, Fraser VJ, Warren DK. Presence of the KPC Carbapenemase Gene in *Enterobacteriaceae* Causing Bacteremia and Its Correlation with In Vitro Carbapenem Susceptibility. *J Clin Microbiol* 2009;47:239–241.

- 91) Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:563-569.
- 92) Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2007;45:2723–2725.
- 93) Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1119-1125.
- 94) Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2012;50:477–479.
- 95) Carvalhaes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:249–251.
- 96) Ribeiro VB, Linhares AR, Zavascki AP, Barth AL. Performance of Quantification of Modified Hodge Test: An Evaluation with *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolates. *Biomed Res Int* 2014;2014:pii=139305.
- 97) Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:6437–6440.
- 98) Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, Simner PJ, Mandrekar JN, Lolans K, Hayden MK, Patel R. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase producing gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 2013;51:3097–3101.
- 99) Valverde A, Gijon D, Morosini MI, et al. Supercarba medium and Carba NP test: the perfect couple for the assessment of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Poster presented at: 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID); April 2013; Berlin, Germany. [online]. [Citováno 12. 6. 2015]. Dostupné z: <https://molecularhub.org/resources/209/download/eP684-1.pdf>
- 100) Yusuf E, Van Der Meeren S, Schallier A, Piérard D. Evaluation of Carbapenemase Screening and Confirmation Tests with *Enterobacteriaceae* and Development of a Practical Diagnostic Algorithm. *J Clin Microbiol* 2015;53:95-104.

- 101) Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:4578–4580.
- 102) Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008;Suppl.1:144-153.
- 103) Livermore DM, Paterson DL. Pocket guide to extended spektrum  $\beta$ -lactamases in resistance. Current Medicine Group Ltd, Spain, 2006.
- 104) Castillo García FJ, Seral García C, Pardos De la Gandara M, Millán Lou MI, Pitart Ferré C. Prevalence of fecal carriage of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in hospitalized and ambulatory patients during two non-outbreak periods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26:77-78.
- 105) Cekanova L, Kolar M, Chroma M, Sauer P, Sedláčková M, Koukalová D. Prevalence of ESBL-positive bacteria in the community in the Czech Republic. *Med Sci Monit* 2009;15:BR202-206.
- 106) Valverde A, Coque TM, Sanchez-Moreno MP, Rollán A, Baquero F, Cantón R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended- spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol* 2004;42:4769-4775.
- 107) Munday CJ, Whitehead GM, Todd NJ, Campbell M, Hawkey PM. Predominance and genetic diversity of community and hospital acquired CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in York, UK. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:628-633.
- 108) Rodríguez-Bano J, López-Cerero L, Navarro MD, Díaz de Alba P, Pascual A. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:1142-1149.
- 109) Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, et al. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:735-743.
- 110) Vinue L, Saenz Y, Martinez S, Somalo S, Moreno MA, Torres C, Zarazaga M. Prevalence and diversity of extended-spectrum betalactamases in faecal *Escherichia coli* isolates from healthy humus in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:954-957.
- 111) Janvier F, Mérens A, Delaune D, Soler C, Cavallo JD. Portage digestif d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisieme génération dans une population d'adultes jeunes asymptomatiques: évolution entre 1999 et 2009. *Pathol Biol (Paris)* 2011;59:97-101.



- 112) Kaneko K, Sato Y, Tokunaga S, Tamaki SK, Okamoto R, Inoue M. AmpC beta-lactamase-mediated cefpodoxime-resistant *Escherichia coli* isolated from faecal samples of healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:369-371.
- 113) Hammerum AM, Lester CH, Jakobsen L, Porsbo LJ. Faecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and AmpC  $\beta$ -lactamase-producing bacteria among Danish army recruits. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:566-568.
- 114) Arlet G, Bami G, Decre D, Flippo A, Gaillot O, Lagrange PH, Philippon A. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM  $\beta$ -lactamases. *FEMS Microbiol Lett* 1995;134:203-208.
- 115) Calatayud L, Arnan M, Linares J, et al. Prospective study of fecal colonization by extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in neutropenic patients with cancer. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:4187-4190.
- 116) Liss BJ, Vehreschild JJ, Cornely OA, et al. Intestinal colonisation and blood stream infections due to vancomycin-resistant enterococci (VRE) and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* (ESBLE) in patients with haematological and oncological malignancies. *Infection* 2012;40:613-619.
- 117) Canton R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:466-475.
- 118) Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:165-174.
- 119) Arnan M, Gudiol C, Calatayud L, et al. Risk factors for, and clinical relevance of, faecal extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) carriage in neutropenic patients with haematological malignancies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30:335-360.
- 120) Korona-Główniak I, Grywalska E, Chudzik B, Bojarska-Junak A, Malm A, Rolinski J. Upper respiratory tract colonization by gramnegative rods in patients with chronic lymphocytic leukemia: Analysis of risk factors. *Sci World J* 2012:617218.
- 121) Gudiol C, Bodro M, Simonetti A, et al. Changing aetiology, clinical features, antimicrobial resistance, and outcomes of bloodstream infection in neutropenic cancer patients. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:474-479.
- 122) Werarak P, Kiratisin P, Thamlikitkul V. Hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia in adults at Siriraj Hospital: etiology, clinical outcomes, and impact of antimicrobial resistance. *J Med Assoc Thai* 2010;93(Suppl 1):S126-138.

- 123) Tejada Artigas A, Bello Dronda S, Chacon Valles E, et al. Risk factors for nosocomial pneumonia in critically ill trauma patients. *Crit Care Med* 2001;29:304–309.
- 124) Uvizl R, Hanulik V, Husickova V, et al. Hospital-acquired pneumonia in ICU patients. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2011;155:373-378.
- 125) Piskin N, Aydemir H, Oztoprak N, et al. Inadequate treatment of ventilator-associated and hospital-acquired pneumonia: Risk factors and impact on outcomes. *BMC Infect Dis* 2012;12:268.
- 126) Luna CM, Vujacich P, Niederman MS, et al. Impact of BAL data on the therapy and outcome of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1997;111:685.
- 127) Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections. A risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest* 1999; 115:462–474.
- 128) Iregui M, Ward S, Sherman G, Fraser V, Kollef M. Clinical importance of delays in the initiation of appropriate antibiotic treatment for ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2002;122:262–268.
- 129) Grusson D, Hilbert G, Vargas F, et al. Rotation and restricted use of antibiotics in a medical intensive care unit. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 837–843.
- 130) Kollef MH, Ward S, Sherman G. Inadequate treatment of nosocomial infections is associated with certain empiric antibiotic choices. *Crit Care Med* 2000;28:3456–3464.
- 131) Luna CM, Aruj P, Niederman MS, et al. Appropriateness and delay to initiate therapy in ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J* 2006;27:158-164.
- 132) Ronald N. Jones. Microbial Etiologies of Hospital-Acquired Bacterial Pneumonia and Ventilator-Associated Bacterial Pneumonia. *Clin Infect Dis* 2010;51:S81–S87.
- 133) Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:867–902.
- 134) Crouch Brewer S, Jones CB, Leeper KV, Wunderink RG. Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 1996;109:1029.
- 135) American Thoracic Society and the Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the Management of Adults with Hospital-acquired, Ventilator-associated, and Healthcare-associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:388–416.
- 136) Trouillet JL, Chastre J, Vuagnat A, et al. Ventilator-associated pneumonia caused by potentially drug-resistant bacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:531–539.
- 137) Ioanas M, Cavalcanti M, Ferrer M, et al. Hospital-acquired pneumonia: coverage and treatment adequacy of current guidelines. *Eur Respir J* 2003;22:876–882.

- 138) Noy A, Orni-Wasserlauf R, Sorkine P, Siegman-Igra Y. Epidemiology of Ceftazidime-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in a Large University Hospital in Tel Aviv. The Israel Medical Association Journal 2000;2:908-911.
- 139) Toltzis P, Yamashita T, Vilt L, Green M, Morrissey A, Spinner-Block S, Blumer J. Antibiotic Restriction Does Not Alter Endemic Colonization with Resistant Gram-Negative Rods in a Pediatric Intensive Care Unit. Crit Care Med 1998;26:1893- 1899.
- 140) Dancer SJ, White LF, Lamb J, Girvan EK, Robertson C. Measuring the Effect of Enhanced Cleaning in a UK Hospital: A Prospective Cross-Over Study. BMC Medicine 2009;7:28.
- 141) Paterson DL, Ko WC, von Gottberg A, et al. International Prospective Study of *Klebsiella pneumoniae* Bacteraemia; Implications of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Production in Nosocomial Infections. Ann Int Med 2004;140:26-32.
- 142) Paterson DL, Singh N, Rihs JD, Squier C, Rihs BL, Muder RR. Control of an Outbreak of Infection Due to Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in a Liver Transplantation Unit. Clin Infect Dis 2001;33:126-128.
- 143) Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, et al. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. Euro Surveill 2010;15:pii=19711. Available online:  
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19711>
- 144) Rai S, Das D, Niranjana DK, Singh NP, Kaur IR. Carriage prevalence of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in stool samples: A surveillance study. AMJ 2014;7:64-67.
- 145) Girlich D, Bouihat N, Poirel L, Benouda A, Nordmann P. High rate of faecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* at a university hospital in Morocco. Clin Microbiol Infect 2014;20:350-354.
- 146) Kim J, Lee JY, Kim SI, et al. Rates of fecal transmission of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* among patients in intensive care units in Korea. Ann Lab Med 2014;34:20-25.
- 147) Nüesch-Inderbinen M, Zurfluh K, Hächler H, Stephan R. No evidence so far for the dissemination of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in the community in Switzerland. Antimicrob Resist Infect Control 2013;4:23.
- 148) Prabaker K, Lin MY, McNally M, et al; Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Prevention Epicenters Program. Transfer from high-acuity long-term care facilities is associated with carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing

- Enterobacteriaceae*: a multihospital study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012;33:1193-1199.
- 149) Gedik H, Şimşek F, Kantürk A, et al. Bloodstream infections in patients with hematological malignancies: which is more fatal – cancer or resistant pathogens? *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2014;10:743-752.
- 150) Papadimitriou-Olivgeris M, Marangos M, Fligou F, Christofidou M, Bartzavali C, Anastassiou ED, Filos KS. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization upon ICU admission. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2976-2981.
- 151) Schechner V, Kotlovsky T, Kazma M, et al. Asymptomatic rectal carriage of *bla*KPC producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: who is prone to become clinically infected? *Clin Microbiol Infect* 2013;19:451-456.
- 152) Kolař M, Latal T, Čermak P, et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates in the Czech Republic. *Intern J Antimicrob Agents* 2006;28:49–53.
- 153) Htoutou Sedlakova M, Hanulik V, Chroma M, et al. Rezistence enterobakterii ke karbapenemům. *Klin Mikrobiol Inf Lek* 2011;17:12–18.
- 154) Kolar M, Urbanek K, Latal T. Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2001; 17: 357–363.
- 155) Urbanek K, Kolař M, Lovečková Y, Strojil J, Šantava L. Influence of third-generation cephalosporin utilization on the occurrence of ESBL-positive *Klebsiella pneumoniae* strains. *J Clin Pharm Ther* 2007;32:403–408.
- 156) Haller P, Tschudin S, Dangel M. Increase of resistant *Enterobacter* isolates and correlation with antibiotic consumption at the ward level. Poster presented at: 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID); April 2006; Nice, France. [online]. [Citováno 12. 4. 2012]. Dostupné z: [http://www.spitalpharmazie-basel.ch/pdf/ECCMID\\_Haller.pdf](http://www.spitalpharmazie-basel.ch/pdf/ECCMID_Haller.pdf)
- 157) Asensio A, Alvarez-Espejo T, Fernandes-Crehuet J, et al. Trends in yearly prevalence of third-generation cephalosporin and fluoroquinolone resistant *Enterobacteriaceae* infections and antimicrobial use in Spanish hospitals, Spain, 1999 to 2010. *Euro Surveill* 2011;16:pii=19983.
- 158) Bosso JA, Mauldin PD, Salgado CD. The association between antibiotic use and resistance: the role of secondary antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:1125–1129.

- 159) Patterson JE, Hardin TC, Kelly CA, et al. Association of antibiotic utilization measures and control of multiple-drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;21:455–458.
- 160) Rice LB, Eckstein EC, DeVente J, et al. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates recovered at the Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center. *Clin Infect Dis* 1996;23:118–124.
- 161) Pettrikos G, Markogiannakis A, Papapareskevas J, et al. Differences in the changes in resistance patterns to third and fourth-generation cephalosporins and piperacillin/tazobactam among *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates following a restriction policy in a Greek tertiary care hospital. *Int J Antimicrob Agents* 2007;29:34–38.
- 162) Piroth L, Aube H, Doise JM, et al. Spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: are beta-lactamase inhibitors of therapeutic value? *Clin Infect Dis* 1998;27:76–80.
- 163) Meyer E, Lapatschek M, Bechtold A, Schwarzkopf G, Gastmeier P, Schwab F. Impact of restriction of third generation cephalosporins on the burden of third generation cephalosporin resistant *K. pneumoniae* and *E. coli* in an ICU. *Int Care Med* 2009;35:862–870.
- 164) Lipový B, Rihová H, Hanslíánová M, et al. Prevalence and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in severely burned patients: a 10-year retrospective study. *Acta Chir Plast* 2010;52:39-43.
- 165) Croughs PD, Li B, Hoogkamp-Korstanje JAA, Stobberingh E. Thirteen years of antibiotic susceptibility surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care units and urology services in the Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32:283-288.

## 10. PUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY SOUVISEJÍCÍ S TÉMATEM DISERTAČNÍ PRÁCE

### 10.1. Publikace v časopisech s impakt faktorem

1. Htoutou Sedlakova M, Hanulik V, Chroma M, Hricova K, Kolar M, Schaumann R, Rodloff AC: Phenotypic detection of broad-spectrum beta-lactamases in microbiological practice. *Med Sci Monit* 2011;17:BR147-152. IF 1,699.
2. Uvízl R, Hanulík V, Husickova V, Htoutou Sedlakova M, Adamus M, Kolar M. Hospital-acquired pneumonia in ICU patients. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2011;155:373-378. IF 0,702.
3. Husičková V, Čekanová L, Chromá M, Sedláková M, Htoutou, Hricová K, Kolář M. Carriage of ESBL- and AmpC-positive *Enterobacteriaceae* in the gastrointestinal tract of community subjects and hospitalized patients in the Czech Republic *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2012;156:348-353. IF 0,702.
4. Kolar M, Htoutou Sedláková M, Pudova V, Roderova M, Novosad J, Senkyrikova M, Sztokowska R, Indrak K. Incidence of fecal *Enterobacteriaceae* producing broad-spectrum beta-lactamases in patients with hematological malignancies. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2014;159:100-103. IF 1,661.

### 10.2. Publikace v recenzovaných časopisech bez impakt faktoru

1. Htoutou Sedláková M, Hanulík V, Chromá M, Hricová K, Šenkyříková M, Kolář M: Rezistence enterobakterií ke karbapenemům. *Klin Mikrobiol Inf Lek* 2011;17:12-18.
2. Htoutou Sedláková M, Hanulík V. Rezistence gramnegativních bakterií k antimikrobním přípravkům. *Farmakoterapie* 2011;Sup1:12-17.
3. Hanulík V, Uvízl R, Husičková V, Htoutou Sedláková M, Kolář M. Bakteriální původci pneumonií u pacientů v intenzivní péči. *Klin Mikrobiol Inf Lek* 2011;17:135 – 140.
4. Uvízl R, Hanulík V, Kolář M, Husičková V, Htoutou Sedláková M. Analýza bakteriální rezistence a klonálního šíření původců komunitních a nozokomiálních pneumonií u pacientů na JIP. *Anest Intenziv Med* 2011;22:369.
5. Husičková V, Htoutou Sedláková M, Matoušková I, Chromá M, Kolář M. Analýza enterobakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v prostředí jednotek intenzivní péče. *Nozokomiálne nákazy* 2011;10:6-8.

6. Htoutou Sedláková M, Vojtová V, Hanulík V, Suchánková H, Kolář M. Rezistence enterobakterií k vybraným antibiotikům v souvislosti s jejich spotřebou. *Klin Farmakol Farm* 2012;26:61-66.
7. Kolář M, Htoutou Sedláková M, Hanulík V, a pracovní skupina. Multirezistentní gramnegativní bakterie u hematologických nemocných. *Postgrad Med* 2012;14,suppl. Bakteriální a mykotické infekce u hematologických nemocných: 6–10.
8. Kolář M, Htoutou Sedláková M, Čekanová L. Rezistence dětských bakteriálních patogenů a možnosti antibiotické léčby. *Pediatric pro praxi* 2013;14:43-46.
9. Kolář M, Htoutou Sedláková M, Suchánková H, Hanulík V. Vliv selekčního tlaku karbapenemů na bakteriální rezistenci. *Klin Mikrobiol Inf Lek* 2013;19:4-7.
10. Husičková V, Htoutou Sedláková M, Matoušková I, Chromá M, Kolář M. Analysis of *Enterobacteriaceae* producing broad-spectrum beta-lactamases in the intensive care unit setting. *Open Journal of Medical Microbiology* 2013;3:56-61.
11. Kolář M, Htoutou Sedláková M, Šenkyříková M, Hanulík V, Honig P. Vliv rezistence *Pseudomonas aeruginosa* na antibioterapii. *Klin Farmakol Farm* 2013;27:101-105.
12. Htoutou Sedláková M, Urbánek K, Vojtová V, Suchánková H, Imwensi P, Kolář M. Antibiotic consumption and its influence on the resistance in *Enterobacteriaceae*. *BMC Research Notes* 2014;7:454
13. Htoutou Sedláková M, Pudová V, Kolář M, a pracovní skupina. Bakteriální původci nozokomiálních pneumonií – multicentrická studie v České republice. *Klin Mikrobiol Inf Lek* 2015;21:10-14.

### **10.3. Přednášky a postery s abstraktem**

1. Htoutou-Sedlakova M, Hanulík V, Chroma M, Hricova K, Kolar M, Schaumann R, Rodloff AC. The potential of phenotypic methods for detecting ESBL- and AmpC-type broad-spectrum beta-lactamases. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienna, Austria, 10th – 13th April 2010.
2. Htoutou-Sedláková M, Hanulík V, Chromá M, Hricová K, Šenkyříková M, Kolář M: Resistance of *Enterobacteriaceae* to carbapenems in Faculty hospital Olomouc. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Milan, Italy, 7th – 10th May 2011.
3. Husičková V, Chromá M, Htoutou Sedláková M, Kantor L, Kolář M. Epidemiologie širokospektrých beta-laktamáz. 15. pracovní setkání „Antibiotická politika“: Epidemiologie nozokomiálních infekcí. Soláň, 26. – 28. 5. 2011.

4. Hanulík V, Uvízl R, Kolář M, Husičková V, Htoutou Sedláková M. Epidemiologie pneumonií u pacientů v intenzivní péči. 15. pracovní setkání „Antibiotická politika“: Epidemiologie nozokomiálních infekcí. Soláň, 26. – 28. 5. 2011.
5. Husičková V, Čekanová L, Chroma M, Htoutou Sedláková M, Hricova K, Kolar M. Nosičství ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií v gastrointestinálním traktu osob v komunitě a hospitalizovaných pacientů. Kongres klinické mikrobiologie a infekčních nemocí. Plzeň 21. – 23. 9. 2011.
6. Novák Z, Htoutou Sedláková M, Pospíšilová D. Léčba infekce u hematoonkologicky léčených pacientů. Zkušenosti z jednoho centra. 16. pracovní setkání „Antibiotická politika“: Infekce v dětském věku. Soláň, 31. 5. – 2. 6. 2012.
7. Kolář M, Husičková V, Htoutou Sedláková M, Chromá M. Bakteriální patogeny v dětském věku a možnosti antibiotické léčby. 16. pracovní setkání „Antibiotická politika“: Infekce v dětském věku. Soláň, 31. 5. – 2. 6. 2012.
8. Htoutou Sedláková M, Vojtová V, Urbánek K, Kolář M: Vliv selekčního tlaku antibiotik na vývoj bakteriální rezistence ve Fakultní nemocnici Olomouc ve 21. století. XX. Moravsko-slovenské mikrobiologické dny. Mikulov, 5. – 7. 9. 2012.
9. Htoutou Sedláková M, Urbánek K, Vojtová V, Suchánková H, Kolář M. Selekční tlak antibiotik a jeho vliv na bakteriální rezistenci. 17. pracovní setkání „Antibiotická politika“: Infekce v ortopedii a traumatologii. Soláň, 30. 5. – 1. 6. 2013.
10. Kolář M, Htoutou Sedláková M, Novosad J, Szotkowská R, Szotkowski T, Raida L, Indrák K. Výskyt enterobakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v GIT pacientů s hemato-onkologickým onemocněním. XXVII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. Olomouc, 12. – 14. 5. 2013.
11. Htoutou Sedláková M, Hanulík V, Kolář M a pracovní skupina. Bakteriální původci nozokomiálních pneumonií – multicentrická studie v České republice. Kongres klinické mikrobiologie a infekčních nemocí a epidemiologie. Olomouc, 17. – 19. 10. 2013.
12. Kolář M, Htoutou Sedláková M. Karbapenemy z pohledu mikrobiologa. Kongres klinické mikrobiologie a infekčních nemocí a epidemiologie. Olomouc, 17. – 19. 10. 2013.
13. Htoutou Sedláková M, Pudová V, Procházková P, Kolář M. Carba NP test jako alternativa fenotypové detekce karbapenemáz – naše zkušenosti. XXII. Moravsko-slovenské mikrobiologické dny. Luhačovice, 2. – 4. 10. 2014.
14. Htoutou Sedláková M, Kolář M, Uvízl R a pracovní skupina. Nozokomiální pneumonie v ČR – bakteriální původci a jejich epidemiologie. 18. pracovní setkání „Antibiotická politika“: Antibiotická profylaxe. Soláň, 29. – 31. 5. 2014.



15. Htoutou Sedláková M et al. Možnosti beta-laktamových antibiotik v léčbě nozokomiálních pneumonií. 17. ročník Colours of sepsis, Ostrava, 27. – 30. 1. 2015.
16. Htoutou Sedláková M, Pudová V, Kolář M, and the Working Group. Bacteria causing nosocomial pneumonia: a multicenter study in the Czech Republic . 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, Denmark, 25th – 28th April 2015.

## **11. SEZNAM TABULEK, GRAFŮ, OBRÁZKŮ A ZKRATEK**

### **11.1. Seznam tabulek**

#### **Tabulka 1.**

Hlavní skupiny beta-laktamáz u gramnegativních bakterií podle funkční klasifikace Bushové, Jacobyho a Medeirosa a Amblerovy molekulární klasifikace.

#### **Tabulka 2.**

Hlavní skupiny karbapenemáz podle funkční klasifikace Bushové, Jacobyho a Medeirosa a Amblerovy molekulární klasifikace

#### **Tabulka 3.**

Kritéria positivity fenotypových testů používaných k detekci ESBL a AmpC enzymů.

#### **Tabulka 4.**

Kritéria pozitivních testů pro detekci enterobakterií a gramnegativních nefermentujících tyček produkujících karbapenemázy.

#### **Tabulka 5.**

Soubor ESBL- a AmpC-pozitivních izolátů k určení senzitivit fenotypových metod.

#### **Tabulka 6.**

Procento falešné citlivosti k cefalosporinům III. a IV. generace ve skupině ESBL a AmpC producentů za použití mikrodiluční metody.

#### **Tabulka 7.**

Procento falešné citlivosti k cefalosporinům III. a IV. generace ve skupině ESBL a AmpC producentů za použití diskové difúzní metody.

#### **Tabulka 8.**

Senzitivita testovaných fenotypových metod ve skupině ESBL a AmpC producentů.

#### **Tabulka 9.**

Soubor enterobakterií produkujících karbapenemázy k určení senzitivit fenotypových metod.

#### **Tabulka 10.**

Procento falešné citlivosti ke karbapenemům za použití diluční difúzní metody (Etest) podle kritérií EUCAST.

#### **Tabulka 11.**

Senzitivita testovaných fenotypových metod v jednotlivých skupinách producentů karbapenemáz.

#### **Tabulka 12.**

Distribuce ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií v gastrointestinálním traktu hospitalizovaných pacientů FNOL a pacientů z komunitního prostředí olomouckého regionu.

**Tabulka 13.**

ESBL-pozitivní enterobakterie izolované z GIT 71 pacientů a detekované geny kódující širokospektré beta-laktamázy.

**Tabulka 14.**

AmpC-pozitivní enterobakterie izolované z GIT 71 pacientů a detekované geny kódující širokospektré beta-laktamázy.

**Tabulka 15.**

Počet enterobakterií izolovaných z prostředí a personálu KARIM a IPCHO.

**Tabulka 16.**

Charakteristika ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií izolovaných z prostředí a personálu KARIM a IPCHO.

**Tabulka 17.**

Charakteristika ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií izolovaných od pacientů hospitalizovaných na KARIM a IPCHO.

**Tabulka 18.**

Zastoupení jednotlivých bakteriálních druhů jako etiologických agens HAP (počty v absolutní hodnotě).

**Tabulka 19.**

Minimální inhibiční koncentrace testovaných enterobakterií k meropenemu.

**Tabulka 20.**

Výsledky fenotypových testů k detekci karbapenemáz a širokospektrých beta-laktamáz.

**Tabulka 21.**

Výsledky genetické detekce karbapenemáz, ESBL a AmpC.

**Tabulka 22.**

Rezistence *Pseudomonas aeruginosa* k meropenemu ve FNOL a VNOL (v procentech).

**Tabulka 23.**

Rezistence jednotlivých species k daným antibiotikům v jednotlivých letech studie v procentech.

**Tabulka 24.**

Spotřeba jednotlivých antibiotických skupin a celková spotřeba antibiotik v FNOL v letech 2000-2011.

**Tabulka 25.**

Korelace mezi spotřebou jednotlivých skupin antibiotik a rezistencí sledovaných species k antibiotikům.

### **Tabulka 26.**

Rezistence vybraných bakteriálních druhů k meropenemu ve FNOL a na KARIM v procentuálním vyjádření (v závorce je uveden počet testovaných kmenů v absolutní hodnotě).

### **Tabulka 27.**

Absolutní a relativní spotřeba karbapenemů v celé FNOL a na KARIM v letech 2005 – 2011.

### **Tabulka 28.**

Spearmanova korelace mezi rezistencí *Pseudomonas aeruginosa* a spotřebou karbapenemů.

## **11.2. Seznam grafů**

### **Graf 1.**

Rezistence *Klebsiella pneumoniae* k vybraným antibiotikům u pacientů s nozokomiální pneumonií v ČR (v procentech).

### **Graf 2.**

Rezistence *Pseudomonas aeruginosa* k vybraným antibiotikům u pacientů s nozokomiální pneumonií v ČR (v procentech).

### **Graf 3.**

Rezistence *Escherichia coli* k vybraným antibiotikům u pacientů s nozokomiální pneumonií v ČR (v procentech).

### **Graf 4.**

Vývoj spotřeby cefalosporinů III. a IV. generace a rezistence k ceftazidimu v letech 2000-2011.

### **Graf 5.**

Vývoj spotřeby piperacilinu s tazobaktamem a rezistence k němu v letech 2000-2011.

## **11.3. Seznam obrázků**

### **Obrázek 1.**

Beta-laktamová antibiotika.

### **Obrázek 2.**

Rezistence invazivních izolátů *Klebsiella pneumoniae* k cefalosporinům III. generace v Evropě v roce 2013 (2).

### **Obrázek 3.**

Rezistence invazivních izolátů *Pseudomonas aeruginosa* ke karbapenemům v Evropě v roce 2013 (2).

**Obrázek 4.**

Modifikovaná sestava antibiotik pro současnou detekci produkce ESBL/AmpC enzymů (koncentrace v mg/L).

**Obrázek 5.**

Modifikovaný DDST pro detekci ESBL.

**Obrázek 6.**

AmpC test k průkazu AmpC.

**Obrázek 7.**

Pozitivní výsledek mDDST u kmene *Klebsiella pneumonia* produkujícího ESBL.

**Obrázek 8.**

Pozitivní výsledek mAmpC testu u kmene *Klebsiella pneumonia* produkujícího AmpC.

**Obrázek 9.**

Pozitivní výsledek ESBL Etestu u kmene *Klebsiella pneumonia* produkujícího ESBL

**Obrázek 10.**

CD-test pro detekci serinových karbapenemáz třídy A.

**Obrázek 11.**

MBL-test pro detekci metalo-beta-laktamáz.

**Obrázek 12.**

Combi-test pro detekci serinových karbapenemáz třídy A a metalo-beta-laktamáz.

**Obrázek 13.**

Zvětšení inhibiční zóny kolem disku s meropenemem a 3-APB o 5 mm ve srovnání s diskem se samotným meropenemem u pozitivního CD-testu.

**Obrázek 14.**

Zvětšení inhibiční zóny kolem disku s meropenem (imipenemem) a EDTA o 5 mm ve srovnání s diskem se samotným meropenemem (imipenemem) u pozitivního MBL testu a viditelná deformace inhibičních zón směrem k centrálnímu disku s EDTA.

**Obrázek 15**

Zvětšení inhibiční zóny kolem disku s meropenemem a EDTA o 5 mm ve srovnání s diskem se samotným meropenemem u pozitivního Combi testu v případě produkce MBL.

**Obrázek 16.**

Pozitivní Etest pro průkaz MBL.

**Obrázek 17.**

Pozitivní mHodge test.

## Obrázek 18.

Pozitivní Carba NP test (žlutý) oproti negativní kontrole (červená).

### 11.4. Seznam zkratk

3-APB	kyselina triaminofenylboritá
ACC	skupina AmpC beta-laktamáz
AmpC	typ širokospektrých beta-laktamáz (třída C podle Amblera)
AMS	ampicilin/sulbaktam
ATCC	americká společnost pro biologický výzkum poskytující přesně definované sbírkové referenční kmeny
AZT	aztreonam
bla	gen kódující produkci beta-laktamáz
CFU	jednotka tvořící kolonie (angl. colony-forming unit)
CIT	skupina AmpC beta-laktamáz
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CMY	skupina AmpC beta-laktamáz
CPM	cefepim
CPR	cefoperazon
CPS	cefoperazon/sulbaktam
CPR	cefoperazon,
CTX	cefotaxim
CTX-M	typ AmpA beta-laktamáz (třída A podle Amblera)
CTZ	ceftazidim
CXT	cefoxitin
DDDatb	absolutní celková spotřeba antibiotik
DDST	Double Disc Synergy Test
DHA	skupina AmpC beta-laktamáz
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EARS-Net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (Evropská databáze surveillance antimikrobiální rezistence))
EBC	skupina AmpC beta-laktamáz
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ESBL	širokospektré beta-laktamázy (angl. extended-spectrum beta-lactamase)

EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Evropská komise pro testování citlivosti k antibiotikům)
FN	Fakultní nemocnice
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
GES	skupina serinových karbapenemáz třídy A podle Amblera
GIM	skupina metalo-beta-laktamáz (angl. German imipenemase)
GIT	gastrointestinální trakt
HAP	nozokomiální pneumonie (angl. hospital-acquired pneumonia)
HOK	Hemato-onkologická klinika
IMI	skupina serinových karbapenemáz třídy A podle Amblera
IMP	skupina metalo-beta-laktamáz
IPCHO	oddělení Intenzivní péče chirurgických oborů
IZ	inhibiční zóna
JIP	jednotka/y intenzivní péče
KARIM	Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny
KPC	skupina serinových karbapenemáz třídy A podle Amblera (angl. <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase)
MALDI-TOF	ionizace laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s detektorem doby letu (angl. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, Time of Flight)
MBL	metalo-beta-laktamáza/y
mecA	gen kódující produkci pozměněných PBP2a
MER	meropenem
MIC	minimální inhibiční koncentrace (angl. minimum inhibition concentration)
MRSA	meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (angl. methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> )
NDM-1	skupina metalo-beta-laktamáz (angl. New-Delhi metalo-beta-lactamase)
NMC	skupina serinových karbapenemáz třídy A podle Amblera
OXA	typ karbapenemáz (třída D podle Amblera)
PBP	protein vázající penicilin (angl. penicillin-binding protein)
PBP2a	protein vázající penicilin 2a (angl. penicillin-binding protein 2a)
PBP2x	protein vázající penicilin 2x (angl. penicillin-binding protein 2x)
PCR	polymerázová řetězová reakce (angl. polymerase chain reaction)
PFGE	pulzní gelová elektroforéza (angl. pulsed-field gel electrophoresis)
PIP	piperacilin

PPT	piperacilin/tazobaktam
RDDDatb	relativní roční spotřeba antibiotik
RFLP	polymorfismus délky restričních fragmentů (angl. restriction fragment length polymorphism)
SHV	typ AmpA beta-laktamáz (třída A podle Amblera)
SIM	skupina metalo-beta-laktamáz (angl. Seoul imipenemase)
SME	skupina serinových karbapenemáz třídy A podle Amblera
SPM	skupina metalo-beta-laktamáz (angl. Sao Paolo metallo-beta-lactamase)
TEM	typ AmpA beta-laktamáz (třída A podle Amblera)
TN	Thomayerova nemocnice v Praze
VIM	skupina metalo-beta-laktamáz (angl. Verona integrone-encoded metalo-beta-lactamase)
VNOL	Vojenská nemocnice Olomouc