



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

**ESBL kmeny ve vzorcích moči zpracovaných v oddělení
klinické mikrobiologie Nemocnice Písek, a.s.**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

Specializace ve zdravotnictví/zdravotní laborant

Autor práce: Linda Šustrová

Vedoucí práce: MUDr. Věra Kůrková

České Budějovice 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „ESBL kmeny ve vzorcích moči v Nemocnici Písek, a.s.“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 31. 7. 2018

.....

podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat paní primářce MUDr. Kůrkové za odborný dohled, ochotu a trpělivost při výkonu praktické části na pracovišti klinické mikrobiologie Nemocnice Písek. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Barboře Malčíkové za pomoc s grafickou podobou bakalářské práce.

ESBL kmeny ve vzorcích moči zpracovaných v oddělení klinické mikrobiologie Nemocnice Písek, a.s.

Abstrakt

Beta-laktamázy (ESBL) jsou enzymy, které produkují některé bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Mezi nejčastější původce těchto enzymů patří zejména rody *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* a *Escherichia* způsobující nejčastěji infekce močových a dýchacích cest. Další méně časté jsou bakterie rodu *Morganella*, *Providencia* a *Serratia*). Sledování těchto bakterií je důležité hlavně kvůli možnému vzniku rezistence na některá ATB. Po vzniku rezistence by další léčba ATB již nemusela být účinná.

Cílem mé bakalářské práce bylo popsat a charakterizovat vlastnosti a působení ESBL kmenů, což je popsáno v teoretické části, stanovit množství výskytu těchto kmenů v Nemocnici Písek, a.s. a v okrese Písek. Jsou tedy vyhodnocovány vzorky z nemocnice i mimo ni. Hlavním cílem bylo celkově shrnout pozorování výskytu zachycených ESBL kmenů na oddělení klinické mikrobiologie. Data byla získána z databáze laboratorního informačního systému Open Lims mikrobiologického oddělení za rok 2016. Výsledky jsou dány do grafů a tabulek pro lepší orientaci.

Pro detekci ESBL se v této laboratoři používají metody MAST test, MIC a chromogenní půdy. Průkaz je poměrně rychlý, během 24 hodin lze prokázat pozitivitu či negativitu.

Klíčová slova

ESBL, Beta-laktamázy, beta-laktamy, rezistence, citlivost, ATB

ESBL tribes in urine specimens processed in the Department of Clinical Microbiology of Písek's hospital

Abstract

Beta-lactamases (ESBLs) are enzymes that produce some bacteria of the Enterobacteriaceae family. The most common of these enzymes include family of *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* and *Escherichia*, which most often cause urinary and respiratory infections. Other less common bacteria are the bacteria of *tribe Morganella*, *Providencia* and *Serratia*. Monitoring of these bacteria is important mainly because of the possible resistance to some ATBs. After the emergence of resistance by additional treatment with antibiotics has not be effective.

The aim of my bachelor thesis was to describe and characterize the properties and effects of ESBL tribes, as described in the theoretical part of my thesis, to determine the occurrence of these strains at Písek's Hospital, a.s. and in the Písek district. Therefore, samples from and outside the hospital are evaluated. Therefore, samples from and outside the hospital are evaluated. The main purpose was to summarize data from the observation of the occurrence of ESBL tribes detected in clinical microbiology. The data were obtained from the database of the laboratory information system. (as called Open lims) of the microbiological department for 2016 year. The results are shown in graphs and tables for better orientation. The results are shown in graphs and tables for better orientation.

For detection of ESBL tribes in this laboratory are used methods as MAST, MIC and chromogenic soil. The detection is relatively fast, and positivity or negativity can be demonstrated within 24 hours.

Key words

ESBL, beta-lactamases, beta-lactams, resistance, sensitivity, ATB

OBSAH

OBSAH	6
ÚVOD	9
1 TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1 BETA – LAKTAMÁZY	10
1.1.1 Rozdělení	10
1.1.1.1 Podle Amblerovy klasifikace	10
1.1.1.2 Podle Bushové, Jackobyho a Medeirosa	11
1.1.2 Širokospektré beta-laktamázy	11
1.2 ESBL	12
1.2.1 Klasifikace	12
1.2.1.1 TEM beta-laktamázy	12
1.2.1.2 SHV beta-laktamázy	12
1.2.1.3 CTX-M beta-laktamázy	12
1.2.1.4 OXA beta-laktamázy	13
1.3 ANTIBIOTIKA	13
1.3.1 Beta-laktamová ATB	14
1.3.2 Mechanismus účinku beta-laktamových ATB	14
1.3.3 Rozdělení beta-laktamových ATB	15
1.3.3.1 Peniciliny	15
1.3.3.2 Cefalosporiny	16
1.3.3.2.1 Cefalosporiny 1. generace	16
1.3.3.2.2 Cefalosporiny 2. generace	16
1.3.3.2.3 Cefalosporiny 3. generace	17
1.3.3.2.4 Cefalosporiny 4. Generace	17
1.3.3.3 Monobaktamy	17
1.3.3.4 Karbapenemy	18
1.3.4 Inhibitory beta-laktamáz	18
1.3.4.1 Kyselina klavulanová	19
1.3.4.2 Sulbaktam	19
1.3.4.3 Tazobaktam	20
1.4 NEJČASTĚJŠÍ PRODUCENTI BETA-LAKTAMÁZ	20
1.4.1 Rod <i>Klebsiella</i>	20
1.4.2 Rod <i>Enterobacter</i>	21
1.4.3 Rod <i>Escherichia</i>	21
1.4.4 Rod <i>Proteus</i>	22
1.4.5 Ostatní producenti	22
1.5 REZISTENCE	23
1.5.1 Rezistence beta-laktamových ATB	24
1.5.2 Rezistence zprostředkovaná beta-laktamázi	24

1.6	LABORATORNÍ PRŮKAZ	25
1.6.1	Konfirmační metoda CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute)	25
1.6.2	Metoda DDST (Double Disk Synergy Test)	25
2	CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY	27
2.1	CÍLE	27
2.2	HYPOTÉZY.....	27
3	METODIKA	28
3.1	CHARAKTERISTIKA SOUBORU.....	28
3.2	TECHNIKA SBĚRU DAT	28
3.3	KULTIVACE VZORKŮ	28
3.3.1	Chromogenní půdy.....	28
3.3.1.1	Brilliance ESBL agar	29
3.3.1.2	Brilliance UTI agar	30
3.3.2	MAST test.....	32
3.3.3	Mikrotitrační destičky	34
3.3.3.1	MIC G-I	34
3.3.3.2	MIC G-II.....	37
3.3.4	Chi kvadrát (Test dobré shody).....	38
4	VÝSLEDKY.....	40
4.1	CELKOVÝ ROZDÍL MEZI POZITIVNÍMI A VŠEMI VZORKY Z NEMOCNICE A Z KOMUNITY	40
4.2	PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ RODU <i>ESCHERICHIA</i>	41
4.3	PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ RODU <i>KLEBSIELLA</i>	42
4.4	PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ RODU <i>ENTEROBACTER</i>	42
4.5	PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ RODU <i>PROTEUS</i>	43
4.6	SROVNÁNÍ ESBL VZORKŮ NA JEDNOTLIVÝCH ODDĚLENÍCH V NEMOCNICI	43
4.7	PROCENTUÁLNÍ ROZDĚLENÍ PODLE ODDĚLENÍ.....	44
4.8	SROVNÁNÍ PODLE DRUHU MATERIÁLU	45
4.9	PŘEHLED VŠECH VZORKŮ A POUZE POZITIVNÍCH V NEMOCNICI.....	46
4.10	PŘEHLED VŠECH VZORKŮ A POUZE POZITIVNÍCH V KOMUNITĚ OKRESU PÍSEK.....	47
4.11	POROVNÁNÍ POZITIVITY MEZI KOMUNITOU A NEMOCNICÍ.....	47
4.12	PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ POZITIVITY RODU <i>ESCHERICHIA</i> V POROVNÁNÍ MEZI NEMOCNICÍ A KOMUNITOU.....	48
4.13	PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ POZITIVITY RODU <i>KLEBSIELLA</i> MEZI NEMOCNICÍ A KOMUNITOU	48
4.14	PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ POZITIVITY RODU <i>ENTEROBACTER</i> MEZI NEMOCNICÍ A KOMUNITOU	49
4.15	PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ POZITIVITY RODU <i>PROTEUS</i> MEZI NEMOCNICÍ A KOMUNITOU	49
4.16	PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ POZITIVITY ESBL MEZI NEMOCNICÍ A KOMUNITOU	50
5	DISKUZE.....	52

6	ZÁVĚR.....	54
7	SEZNAM LITERATURY	55
8	SEZNAM TABULEK	60
9	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	61
10	PŘÍLOHY	63
11	SEZNAM ZKRATEK.....	69

ÚVOD

Širokospektré beta-laktamázy jsou enzymy, které se nacházejí hlavně v gramnegativních bakteriích, jako jsou např. *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter* a *Escherichia*, a jsou schopné hydrolyzovat beta-laktamový kruh některých antimikrobiálních látek. ESBL (extended spectrum beta lactamases) jsou objevovány od 60. let 20. století a za tuto dobu je popsáno celkem přes 400 druhů.

Širokospektré beta-laktamázy mohou být rozděleny podle citlivosti na antibiotika, podle hydrolytického spektra nebo citlivosti na inhibitory. Dále také podle toho, zda jsou kódovány plazmidem nebo chromozómem. Mohou se rozdělovat buď podle Amblerovy klasifikace, nebo do klasifikace podle Bushové, Jackobyho a Medeirosé. Tyto enzymy mohou hydrolyzovat antibiotika, jako jsou cefalosporiny, peniciliny, karbapenemy a monobaktamy. Hlavními druhy beta-laktamáz jsou TEM, SHV, CTX a OXA, a každý druh má svá další dělení.

Nejčastěji ESBL kmeny způsobují komplikace jako infekce močového ústrojí a infekce dýchacích cest.

Nejčastější léčbou proti těmto infekcím jsou antibiotika. V případech, kdy je infekce způsobena ESBL bakteriemi, používají se beta-laktamová antibiotika, která blokují syntézu buněčné stěny. To je však problém vzhledem ke stále se zvyšující rezistenci.

Inhibitory beta-laktamáz jsou látky podobného složení jako beta-laktamová antibiotika a podávají se společně s antibiotiky. Způsobují to, že beta-laktamázy ztratí hydrolytický účinek a chrání peniciliny před jejich inaktivací. Jsou to látky jako kyselina klavulanová, tazobaktam a sulbaktam.

Nejčastějšími producenty ESBL jsou bakterie rodů *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* a *Enterobacter*. Mezi ty méně časté patří rody *Morganella*, *Providencia* a *Serratia*. Mohou způsobovat nejčastěji infekce dýchacích a močových cest.

Hlavním problémem těchto nákaz je rezistence proti antibiotikům. Ta může být primární (vrozená), nebo získaná.

V bakalářské práci se zabývám výskytem těchto ESBL kmenů v moči v Nemocnici Písek, a.s. a v celém okrese Písek za rok 2016. Zpracované výsledky jsou porovnány a z výsledných tabulek a grafů vyhodnoceny výsledky konečné.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Beta – laktamázy

Beta–laktamázy jsou enzymy hydrolyzující beta–laktamový kruh, který se nachází v penicilínech, cefalosporínech a dalších příbuzných antibakteriálních látkách. První beta-laktamáza přenosná plazmidy gramnegativních bakterií byla popsána v 60. letech 20. století. Tento enzym byl poprvé objeven v Řecku u bakterie *Escherichia.coli* (Jurčíčková, 2010, s. 29).

1.1.1 Rozdělení

Beta-laktamázy mohou být rozděleny podle různých kritérií jako např. podle citlivosti na antibiotika, hydrolytického spektra, citlivosti na inhibitory beta-laktamáz nebo podle toho, zda jsou kódovány chromozómem nebo plasmidem.

1.1.1.1 Podle Amblerovy klasifikace

Toto rozdělení je podle sekvencí aminokyselin v buňkách.

Třída A: Enzymy z této třídy bývají většinou kódovány plasmidem a velmi rychle hydrolyzují beta-laktamová antibiotika. Jsou produkovány grampozitivními a gramnegativními bakteriemi. Nejčastějšími beta-laktamázami u třídy A v čeledi *Enterobacteriaceae* jsou enzymy TEM-1 a SHV-1. Mutací těchto enzymů vznikají nové, a to zejména TEM, SHV a CTX-M.

Třída B: Tato třída enzymů má schopnost rozkládat karbapenemy. Do této skupiny patří enzymy IMI, VIM a další.

Třída C: Do této skupiny patří beta-laktamázy typu AmpC. Vykazují je rody *Enterobacter sp.*, *Morganella morganii*, *Serratia sp.*, *Citrobacter sp.* U rodu *Klebsiella* a *Escherichia coli* jsou popisovány beta-laktamázy typu AmpC, které jsou kódované plasmidem.

Třída D: V této třídě jsou OXA enzymy kódovány plasmidy některých enterobakterií. Některé OXA beta-laktamázy patří mezi ESBL (Kolář, 2007, s. 198). Většina se vyskytuje u pseudomonád a acinetobakterů (Livermore a Woodford, 2006).

1.1.1.2 *Podle Bushové, Jackobyho a Medeiros*

V těchto skupinách jsou ESBL tříděny podle citlivosti k antibiotikům a podle preferovaného substrátu.

Skupina 1: Obsahuje cefalosporinázy, které nejsou inhibovány inhibitory beta-laktamáz. Enzymy jsou většinou kódovány chromozomálně. Některé odpovídají AmpC (třída C Amblerova rozdělení).

Skupina 2: Tato skupina je zastoupena nejpočetněji. Obsahuje penicilinázy a cefalosporinázy dobře inhibovatelné kyselinou klavulanovou. Enzymy jsou kódované plasmidem. Skupina se shoduje s třídami A a D z Amblerova rozdělení a má 8 podskupin podle substrátové specifity 2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e a 2f.

Skupina 3: Tato skupina obsahuje metalo-beta-laktamázy, které mají ve své struktuře iont zinku, a které hydrolyzují široké spektrum substrátů včetně karbapenemů. Odpovídá třídě B v Amblerově rozdělení.

Skupina 4: Do této skupiny spadají penicilinázy neinhibovány kyselinou klavulanovou a nemají zařazení do molekulární třídy (Brhelová, 2010, s. 22).

Důležitou skupinou jsou beta-laktamázy typu AmpC. Jsou to enzymy, které spadají do třídy C Amblerova rozdělení a do 1. třídy Bushova rozdělení. Hydrolyzují peniciliny, cefamyciny, monobaktamy, většinu cefalosporinů a nejsou inhibovány inhibitory beta-laktamáz. Jako ATB může být použit cefoxitin. Většina beta-laktamáz ho dobře hydrolytuje. Existují druhy bakterií, které jsou schopné produkovat jak ESBL, tak AmpC. Pro toto zjištění je určen MAST test. (Hrabák et al., 2009).

1.1.2 *Širokospektré beta-laktamázy*

Širokospektré beta-laktamázy (dále jen „ESBL“) z anglického překladu extended spectrum beta lactamases) jsou enzymy produkovány některými bakteriemi zejména gramnegativními tyčkami. Tyto enzymy hydrolyzují antibiotika penicilin, cefalosporin a monobaktam. Jsou samy inhibovány inhibitory beta-laktamáz, kyselinou klavulanovou, sulbaktamem a tazobaktamem (Hrabák, 2007a, s. 103 - 111). Většina

ESBL jsou enzymy spadající do třídy A podle Amblerova rozdělení, tudíž obsahují ve svém aktivním místě serin. Molekulární hmotnost ESBL je 29 000 Da (Bradford, 2001).

Širokospektré beta-laktamázy vznikají substitucí nejméně jedné aminokyseliny v základních enzimech TEM-1, TEM-2 a SHV-1. Prvním popsaným enzymem, který byl schopný hydrolyzovat beta-laktamy, byl SHV-2 z kmene *Klebsiella ozaenae* (Kliebe et al., 1985). V současné době se popisuje cca 400 druhů (Smet et al., 2010). Výskyt širokospektrých beta-laktamáz je celosvětový problém. Nová beta-laktamáza může vzniknout pouze jedinou mutací v nukleotidové sekvenci genů kódující již známé enzymy. Je nutné udržovat a aktualizovat databázi (Brhelová, 2010, s. 23).

1.2 ESBL

1.2.1 Klasifikace

1.2.1.1 TEM beta-laktamázy

Všechny širokospektré enzymy skupiny TEM pocházejí z enzymů TEM-1. Vznikají substitucemi v nejméně jedné aminokyselině. Prvním širokospektrým enzymem této skupiny je TEM-12 se substitucí Arg164Ser poprvé popsaný v Londýně v roce 1982 (Du Bois et al., 1995). Dalším enzymem se stal TEM-3, který byl izolovaný v roce 1987 (Sougakoff et al., 1988). Beta-laktamáza TEM-3 se odlišuje od TEM-1 ve třech aminokyselinách: Gln39Lys, Glu104Lys a Gly238Ser. Ve skupině TEM bývají časté substituce na pozicích: Leu21, Gln39, Glu104, Arg164, Asp179, Met182, Ala237, Gly238, Glu240, a Thr265. U derivátů TEM se udává izoelektrický bod v rozmezí 5,2 - 6,5 pI (Bradford, 2001).

1.2.1.2 SHV beta-laktamázy

Jsou druhou nejpočetnější skupinou beta-laktamáz. Tuto skupinu kóduje gen blaSHV. Izoelektrický bod se udává v rozmezí pI 7 - 8,2 (Bradford, 2001). Nejčastější substituce jsou v pozicích: Ala146, Gly156, Leu169, Asp179, Arg205, Gly238 a Glu240 (Gniadkowski, 2008).

1.2.1.3 CTX-M beta-laktamázy

Tato skupina je poměrně nová, patří ke skupinám plazmidem přenášených širokospektrých beta-laktamáz, které hydrolyzují cefotaxim. V osmdesátých letech se vyskytovaly v Japonsku, Argentině a Evropě (Bonnet, 2004). V devadesátých letech bylo masivní rozšíření enzymu CTX-M v Argentině a okolí (Rossolini et al., 2008). V současnosti je zhruba 80 % případů bakteriálních infekcí s produkcí ESBL spojeno s enzymy CTX-M (Ben-Ami a Schwaber, 2006). Enzymy CTX-M se vyskytují zejména u druhu *Salmonella enterica* a *Escherichia coli*, ale možný je výskyt i u dalších bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* (Bradford, 2001).

Ve většině případů byly tyto enzymy vyizolovány z močových infekcí v běžné populaci a nemusí se jednat o infekci spojenou s pobytem ve zdravotnickém zařízení („HAI“ z anglického překladu Healthcare associated infection) (Cantón et al., 2008). Izoelektrický bod této skupiny je v rozmezí pI 7,6 – 8,9 (Bradford, 2001). Enzymy CTX-M se dělí do šesti podskupin: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-25, CTX-M-8, Toho-2 a CTX-M-9 (Rossolini et al., 2008). Skupina CTX-M se vyskytuje zejména v Jižní Americe, východní Evropě a na Blízkém Východě (De Champs et al., 2000). Poslední dobou se ale šíří i do Číny a Indie (Paterson a Bonomo, 2005). Některé typy jsou rozšířeny celosvětově, ale některé lokalizovány pouze na určitých místech (Cantón et al., 2008). Na léčbu infekce způsobenou ESBL typu CTX-M jsou beta-laktamová antibiotika karbapenemy (Paterson a Bonomo, 2005).

1.2.1.4 *OXA beta-laktamázy*

Tato skupina je řazena do třídy D podle Amblera. OXA enzymy mají schopnost hydrolyzovat kloxacilin a oxacilin. Mohou se slabě inhibovat klavulanovou kyselinou (Bush et al., 1995). Izoelektrický bod se pohybuje od pI 5,9 - 8,9. Do této skupiny patří OXA-10, ten hydrolyzuje cefotaxim, ceftriaxon a astreonam, OXA-11, OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-19, OXA-15, OXA-18, OXA-28, OXA-31, OXA-32, OXA-35 a OXA-34. Produkce metalo-beta-laktamáz a aztreonam hydrolyzujících enzymů může vést k tomu, že vznikne rezistence na všechna beta-laktamová antibiotika (Toleman et al., 2003).

1.3 *Antibiotika*

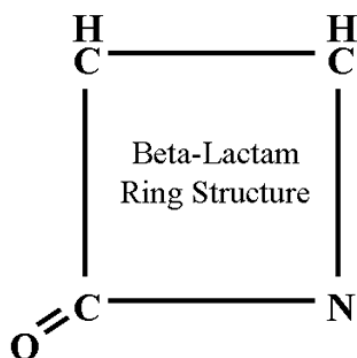
Antibiotika (dále jen „**ATB**“) jsou látky, které jsou produkovány mikroorganismy a jsou schopny zabíjet nebo pozastavovat růst jiných mikroorganismů.

Rozdělují se na baktericidní (zabíjejí patogenní buňky) a bakteriostatická (zastavují růst a rozmnožování mikroorganismů a tím zabraňují šíření infekce). ATB na některé bakterie působí baktericidně a na některé pouze bakteriostaticky nebo vůbec, v závislosti na citlivosti mikroba na určitou látku (Votava 2005, s. 235 - 236).

ATB slouží jako antimikrobiální terapie při infekcích u lidí i zvířat a jako profylaxe při chirurgických zákrocích. U některých zvířat se podávají ATB jako růstový stimulant, v zemích EU je to však zakázáno v důsledku možného vzniku rezistence. Proto se pro léčbu zvířat používají jiné ATB než pro léčbu lidí. Díky tomuto zbytečnému podávání ATB se stále zvyšuje riziko rezistence (Smet et al., 2010).

1.3.1 Beta-laktamová ATB

Beta-laktamová antibiotika jsou jedněmi z nejčastěji používaných antibiotik v současné době. Usmrcují mikroorganismy tím, že blokují syntézu buněčné stěny. V buňce bakterie to probíhá tak, že se beta-laktamy naváží na enzym transpeptidázu a karboxypeptidázu. Ty se účastní na tvorbě peptidoglykanu, což je základní složka buněčné stěny. Beta-laktamová ATB se skládají z beta-laktamového kruhu (viz obr. 1). Je to struktura, která se skládá ze tří atomů uhlíku a jednoho atomu dusíku. Typy těchto ATB se liší ve složení dalšího připojeného beta-laktamového kruhu na tento kruh (Beneš, 2018, s. 96).



Obrázek 1: Beta-laktamový kruh (<http://agscientific.com>)

1.3.2 Mechanismus účinku beta-laktamových ATB

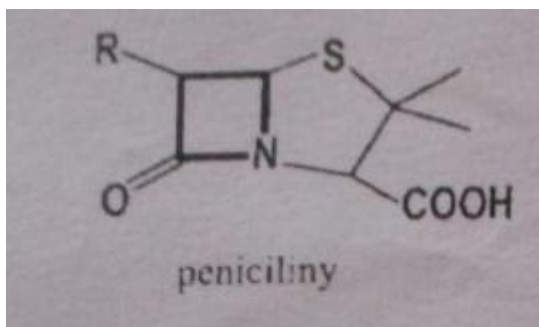
Proteiny, které vážou penicilin (dále jen „PBP“), jsou bílkoviny buněčné stěny bakterií, vážou penicilin a jsou zásahovými místy pro beta-laktamy. Každá buňka bakterie má několik těchto proteinů. Tyto enzymy jsou přítomny u biosyntézy buněčné

stěny, působí při růstu buňky nebo jsou důležité pro její přežití. Bílkoviny vázající penicilin tvoří s ATB komplex a samy přestanou být aktivní. Po přerušení transpeptidace způsobí inhibici syntézy stěny buňky díky odštěpení koncové aminokyseliny z peptidoglykanu. Ta se připojí k jinému řetězci nebo zůstane volná. Tyto enzymy se označují jako serinové peptidázy nebo hydrolázy (Beneš, 2018, s. 97).

1.3.3 Rozdělení beta-laktamových ATB

1.3.3.1 Peniciliny

Peniciliny jsou nejstarší, nejznámější a nejúspěšnější ATB. Jsou přírodní nebo syntetická. Ve svém jádře obsahují kyselinu 6 - aminopenicilanovou. Skládá se z beta-laktamového kruhu, který je připojen ke kruhu thiazolidinovému (viz obr. 2). Skupiny penicilinů se od sebe liší dalšími připojenými řetězci. Ty ovlivňují jejich farmakokinetické a antimikrobiální vlastnosti. Jsou účinné proti většině grampozitivních bakterií, některým druhům gramnegativních bakterií a anaerobům. Rozdělení penicilinů na jednotlivé skupiny závisí na jejich spektru antimikrobiálního účinku.



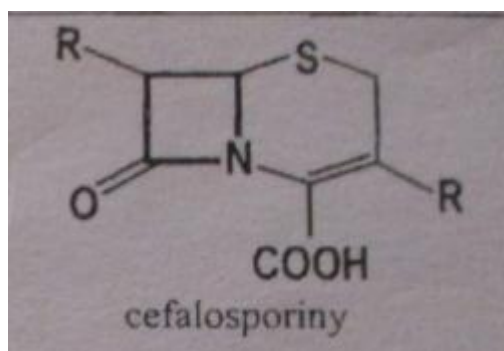
Obrázek 2: Vzorec penicilinu (Votava, 2005, s. 246)

Penicilin G (benzylpenicilin) je úzkospektré ATB, je účinnější než většina jiných ATB. Při orálním podání se v žaludku rozkládá a v trávicím traktu se vstřebává obtížně a do tkání tedy projde pouze omezené množství. Špatně proniká přes membrány a má velmi krátký poločas rozpadu. Během 4 hodin je ATB vyloučeno z organismu tubulární sekrecí nebo glomerulární filtrací. Částečně se metabolizuje v játrech (asi 30 %). Má i nežádoucí účinky jako je alergie, flebitidy, encefalopatie, hemolytická anémie, neutropenie, hyperkalémie, koagulační poruchy a v horším případě i anafylaktický šok. Některé bakterie citlivé na penicilin mohou být rezistentní díky získané schopnosti tvořit beta-laktamázy.

Penicilin V (phenoxymethylpenicilin) je stabilnější na působení beta-laktamáz a oproti penicilinu G je acidorezistentní, vydrží tedy kyselé prostředí žaludku. Proto se může podávat ve formě tablet. Tento penicilin je dobře snášen, nevyvolává dysmikrobie, ale mezi nežádoucí účinky patří alergické reakce, nauzea a průjem. Nevýhodou je nízká bakteriální účinnost a krátký biologický poločas. Nehodí se na léčbu smíšených infekcí a infekcí s nejasnou etiologií.

1.3.3.2 *Cefalosporiny*

Cefalosporiny jsou také velmi používaná ATB. Skládají se z beta-laktamového kruhu spojeného s dihydrothiazinovým cyklem (viz obr. 3). Podle toho jaké substituenty se nachází na pozicích 3 a 7, se mohou měnit antimikrobiální vlastnosti cefalosporinů. Lze je rozdělit do čtyř skupin podle spektra účinku a odolnosti proti beta-laktamázám. V současnosti se na světě používá kolem 20 cefalosporinů.



Obrázek 3: Vzorec cefalosporinu (Votava, 2005, s. 246)

1.3.3.2.1 *Cefalosporiny 1. generace*

Tato skupina se používá pro onemocnění způsobené streptokoky, stafylokoky a některými grampozitivními bakteriemi. Dříve se užívaly i proti bakteriím jako *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* nebo *Proteus mirabilis*. Dnes se však stávají tyto bakterie na cefalosporiny této generace rezistentní, proto nemají klinicky léčebný význam. Tato generace je odolná na penicilinázu, ale ne k beta-laktamázám gramnegativních bakterií.

1.3.3.2.2 *Cefalosporiny 2. generace*

Tyto cefalosporiny působí na grampozitivní bakterie, ale k tomu vykazují účinnost na gramnegativní bakterie, jako jsou *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,

Haemophilus influenzae, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae* a jiné. Na enterobakterie, které mají kódovanou inducibilní rezistenci nepůsobí. Jsou to např. *Enterobacter*, *Morganella* a *Serratia*. Jsou odolné k základním beta-laktamázám třídy A, ale mohou být hydrolyzovány širokospektrými beta-laktamázami.

1.3.3.2.3 Cefalosporiny 3. generace

Tato skupina má velmi silný účinek na gramnegativní bakterie a vysokou odolnost proti beta-laktamázám třídy A, ale mohou být rozloženy širokospektrými beta-laktamázami.

Rozdělují se do několika skupin:

Základní cefalosporiny 3. generace – mají vysokou účinnost proti gramnegativním bakteriím, nepůsobí na pseudomonády, pronikají dobře poriny a hemato-likvorovou bariérou.

Protipseudomonádové cefalosporiny – skupina podobná předešlé, navíc působí na *Pseudomonas aeruginosa*.

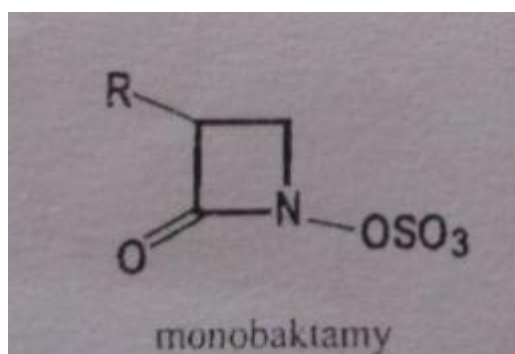
Cefalosporiny kombinované s inhibitory beta-laktamáz – kombinace s některými inhibitory zvyšuje účinnost proti beta-laktamázám třídy A. Není však účinná proti širokospektrým beta-laktamázám a karbapenémům.

1.3.3.2.4 Cefalosporiny 4. Generace

Tato generace cefalosporinů má největší spektrum účinku. Má stejnou účinnost jako 1. generace na gramnegativní bakterie, jako 3. generace a má odolnost proti beta-laktamázy typu AmpC (Beneš, 2018, s. 142 - 144).

1.3.3.3 Monobaktamy

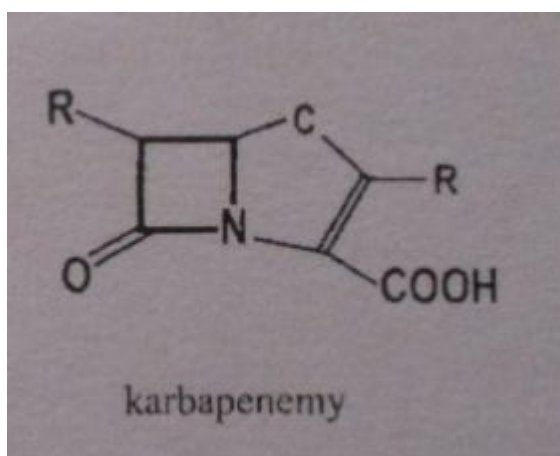
Od ostatních beta-laktamových ATB se monobaktamy odlišují v tom, že beta-laktamový kruh není spojen s žádným jiným (viz obr. 4). Poprvé bylo izolováno ATB z bakterie *Chromobacterium violaceum*. To vedlo ke vzniku aztreonamu. Ten je účinný na *Escherichii*, *Salmonelu*, *Klebsiellu*, *Protea*, *Providencii*, *Morganelu*, *Moraxelu* aj. Částečně rezistentní je na *Enterobactera*, *Serratii*, *Citrobactera* a *Pseudomonas*. Zcela neúčinný je na kmeny tvořící ESBL, AmpC (Beneš, 2018, s. 192 - 194).



Obrázek 4: Vzorec monobaktamu (Votava, 2005, s. 246)

1.3.3.4 *Karbapenemy*

Karbapenemy jsou nejúčinnější skupinou beta-laktamových ATB. Mají velmi široké spektrum účinku a jsou velmi odolné proti různým serinovým beta-laktamázám. Jsou složeny z beta-laktamového kruhu a dihydropyrolového kruhu (viz obr. 5). Jejich odolnost se připisuje hydroxyetylové skupině na 6. uhlíku, která mechanicky brání vstupu molekul karbapenemu do aktivního centra beta-laktamázu. Methyllová skupina na 1. uhlíku brání před účinkem renální dehydropeptidázou. Působí na grampozitivní i gramnegativní bakterie a jsou velmi odolné na inaktivující enzymy širokospektrých beta-laktamázu (Beneš, 2018, s. 194 - 196).



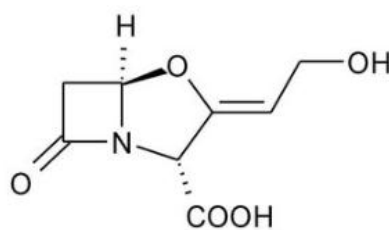
Obrázek 5: Vzorec karbapenemu (Votava, 2005, s. 246)

1.3.4 *Inhibitory beta-laktamázu*

Jsou to látky, které mají podobnou strukturu jako beta-laktamová ATB, ale nemají antibakteriální účinek. Podávají se společně s beta-laktamovými ATB. Nejvíce se používá kyselina klavulanová, dále sulbaktam a tazobaktam. Jsou to efektivní inhibitory bakteriálních beta-laktamáz, na které se navážou za vzniku ireverzibilních komplexů. Tím se inaktivují a zároveň beta-laktamázy ztratí hydrolytický účinek. ATB se tak může navázat do buňky.

1.3.4.1 *Kyselina klavulanová*

Tato kyselina je produkována plísní *Streptomyces clavuligerus* a působí ve spojení s peniciliny a cefalosporiny. Použití je při léčbě infekcí způsobených bakteriemi, které produkují beta-laktamázy jako jsou stafylokoky, klebsiely a jiné enterobakterie.

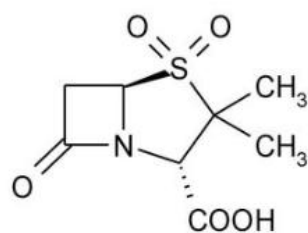


kyselina klavulanová

Obrázek 6: Vzorec kyseliny klavulanové (Hohel I, 2015)

1.3.4.2 *Sulbaktam*

Jedná se o semisyntetický sulfon kyseliny6-deaminopenicilanové se slabou antimikrobiální aktivitou.

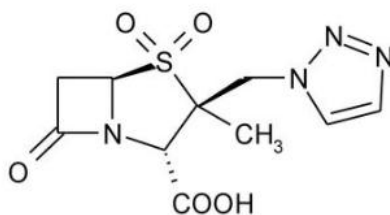


Sulbactam

Obrázek 7: Vzorec sulbaktamu (Hohel I, 2015)

1.3.4.3 *Tazobaktam*

Tazobaktam je příbuzný sulbaktamu, je to sulfonový derivát kyseliny penicilanové. Samostatně má velmi nízkou antimikrobiální aktivitu (Brhelová, 2010, s. 17).



Tazobactam

Obrázek 8: Vzorec tazobaktamu (Hohel I, 2015)

1.4 Nejčastější producenti beta-laktamáz

1.4.1 *Rod Klebsiella*

Klebsiely jsou gramnegativní nepohyblivé tyčky. Patří mezi nemocniční patogeny a mohou produkovat ESBL. Přežívají v zažívacím traktu a dýchacích cestách, ve ventilátorech, zvlhčovacích rezervoárech a inhalátorech (Polenová, 2005, s. 32). Dobře přežívají i mimo střevo. Nejčastěji způsobují infekce močových cest a HAI dýchacích cest. Častý výskyt HAI byl zjištěn na oddělení jednotek intenzivní péče a na novorozeneckých odděleních. Vytváří bílé mukózní kolonie a produkují

polysacharidové pouzdro, obsahují pouzderné antigeny a vyznačují se ureázovou aktivitou. Přenáší se fekálně orální cestou a na krátké vzdálenosti i vzduchem (Votava, 2003, s. 495). Hlavním druhem je *Klebsiella pneumoniae* (jako její poddruhy se označují *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis* a *Klebsiella oxytoca*). Rozlišuje se na 77 sérotypů podle pouzderného polysacharidového antigenu. Kmeny jsou variabilní ve virulenci podle pouzdra a odlišují se specifitou somatického antigenu.

Jsou přirozeně rezistentní k ampicilinu, citlivé na cefalosporiny, chinolony, kotrimoxazol, tetracyklin aj. Přibývá rezistentních kmenů, které nesou plasmidy kódující širokospektré beta-laktamázy. Ty působí v nemocnicích jako HAI. Mohou také způsobit sepse a hnisavé meningitidy. K jejich léčbě účinně působí pouze karbapenemy, aminoglykosidy, nitrofurantoin a kolistin (Bednář et. al., 1996, s. 265).

1.4.2 Rod *Enterobacter*

Rod *Enterobacter* se vyskytuje ve střevě a je to pohyblivá opouzdrěná gramnegativní tyčka. Biochemickou aktivitou se vyznačují podobně jako u klebsiel. Nejznámějšími zástupci jsou *Enterobacter cloacae* a *Enterobacter aerogenes*. Je přirozeně rezistentní na ampicilin, amoxicilin-klavulanát a cefalosporiny 1. generace (Votava, 2003, s. 66). Jeho patogenita je podstatně nižší než u klebsiel, vyskytuje se také v půdě a ve vodě (Bednář et al., 1996, s. 226). Mimo střevo způsobují infekce močových cest a respiračního traktu. Snášejí i půlhodinové zahřátí na 60°C. Ve své stěně mají skupinový antigen D a polysacharid serologické skupiny Q. Kromě močových a dýchacích cest způsobují infekce ve žlučnickových cestách, gynekologických zánětech a v pooperačních jizvách (Klaban, 2005, s. 167).

1.4.3 Rod *Escherichia*

Escherichia je pohyblivá gramnegativní bakterie, štěpí glukózu a laktózu, přitom vytváří plyn, neštěpí močovinu a vytváří indol. Některé kmeny se však jeví jako laktózanegativní díky opožděné sacharolytické aktivitě. Nejvýznamnějším zástupcem rodu je *Escherichia coli*, která je komenzálem střevní mikroflóry. Dalšími známými druhy jsou *Escherichia vulneris*, *Escherichia hermanni* a *Escherichia albertii*. Brání uchycení patogenů a pomáhá syntetizovat vitamín K. Má různé antigenní struktury (O, H, K) a jejich kombinací vznikají různé sérotypy jako O55, O111, O126, O86 aj. (Votava, 2003, s. 64).

U novorozenců a kojenců způsobuje průjmy vyvolané enteropatogenními sérotypy, které produkují enterotoxin. U dětí a dospělých vyvolává enteroinvazivní nebo enterohemorhagický sérotyp kromě průjmů i onemocnění postihující srdce, pankreas, centrální nervovou soustavu a další. Je to častý původce HAI, způsobuje hnisavé záněty kůže, infekce močových a dýchacích cest a při migraci do krve se stává původcem septických stavů. K léčbě extraintestinálních infekcí se používají ATB, na které je *Escherichia coli* primárně citlivá. U intestinálních forem se doporučuje dieta. V poslední době se zvyšuje počet záchytu *Escherichie* produkující ESBL a rezistence k původně citlivým ATB (Polenová, 2005, s. 33). Bakterie se přenáší orálně fekální cestou a častý přenos je z potravin, což vede k průjmům. *Escherichia coli* není přirozeně rezistentní k ampicilinu, ale rezistence i přes to stoupá. K terapii se používají cefalosporiny, peniciliny, chinolony a ko-trimoxazol (Votava, 2003, s. 66).

1.4.4 Rod *Proteus*

Původně pod tento rod spadaly také rody *Providencia* a *Morganella*. Jedná se o bakterie s velkou biochemickou aktivitou (Votava, 2003, s. 69). Jsou to saprofyty, zajišťují přirozený rozklad odumřelých živočišných těl a jejich výměšků. Jedná se o štěpení bílkoviny a jejích produktů bez přístupu vzduchu. (Votava, 2005, s. 53). Nejčastější zástupci jsou *Proteus mirabilis* a *Proteus vulgaris*. Mohou se vyskytovat ve střevě jako běžná flóra, patogenní jsou mimo střevo jako jsou močové cesty, dekubity a rány. Dobře se kultivují na všech běžných půdách. Některé kmeny tvoří na agaru tzv. Raussův fenomén, což znamená, že se z inokula plazí a vytváří příbojové vlny. Tento jev je viditelný na krevním a Endově agaru. Proteové jsou biochemicky velmi aktivní. Mají proteolytickou aktivitu, která také zapříčiňuje zápach. Štěpí močovinu, deaminují fenylalanin, tvoří sirovodík a některé kmeny štěpí indol. Přenos probíhá fekálně orální cestou. Rod *Proteus* je poměrně citlivý na ATB, ale vyskytují se také rezistence. *Proteus mirabilis* je rezistentní na nitrofurantonin a citlivý k colymicin, tetracykliny, tygecyklin. *Proteus vulgaris* je přirozeně rezistentní k amoxicilinu, cefalosporinům 1. a 2. generace a nitrofurantoninu.

1.4.5 Ostatní producenti

Mezi ostatní řadíme gramnegativní bakterie, které se stávají rezistentní na beta-laktamová ATB. Mezi ně patří:

Morganella* a *Providencia – Tyto rody původně patřily pod rod *Proteus*, protože mají velmi podobné vlastnosti. Důležité druhy jsou *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri* a *Morganella morganii*.

Serratia – Tento rod bývá rezistentní na dezinfekci a bývá častým původcem HAI. Bakterie tohoto rodu jsou vysoce odolné, tvoří červený pigment. Nejznámější původce jsou *Serratia marcescens* a *Serratia rubidaea*. Jsou rezistentní na ampicilin, cefalosporiny a kolistin. (Votava, 2003, s. 68).

1.5 Rezistence

Rezistence je schopnost bakterie přežít účinek inhibiční koncentrace k určitému ATB. V současnosti je rezistence bakterií jedním z nejvýznamnějších problémů při léčbě ATB. Dělí se na 2 druhy:

Přirozená – celá populace určitého druhu je rezistentní na určité ATB. Tato schopnost závisí na stavbě stěny buňky. Znamená to, že např. *Enterococcus faecium* je rezistentní ke všem beta-laktamovým ATB, bakterie některé druhy rodu *Enterobacter*, a *Citrobacter* jsou rezistentní na cefalosporiny 2. generace.

Získaná: Rezistence vzniká také následkem podávání ATB. Mechanizmů vzniku je celkem 7:

- **Enzymatická inaktivace ATB**

Vznik je při rozštěpení molekuly ATB nebo při připojení postranní skupiny. Tento typ rezistence je velmi častý, protože je velmi účinná, neboť jedna molekula enzymu dokáže rychle inaktivovat velké množství molekul ATB. Snadno se šíří v bakteriálních populacích.

- **Zábrana přístupu ATB k cílovému místu**

Cílové místo může bránit pouzdro, vrstva hlenu, zevní membrána nebo cytoplazmatická membrána.

- **Aktivní transport ATB do buňky**

Zde jsou používány efluxní systémy. Jsou to transmembránové pumpy, které vyčerpávají nežádoucí látky z buňky. Likvidují molekuly ATB proniklé do buňky. Do jisté míry mohou bakterie výkon těchto pump regulovat.

- **Zábrana aktivace ATB**

Bakterie snižují aktivitu enzymu, který ATB převádí do aktivované formy. Dále mohou vytvořit neúčinný enzym. To způsobí, že ATB zůstane v původní formě a nemá na bakterii vliv.

- **Modifikace cílového místa**

V tomto případě se jedná o změnu struktury, na kterou se naváží ATB. Může se jednat o enzymy, ribozomy, prvky buněčné membrány. ATB ztrácí afinitu k takovému místu. Změna může být zapříčiněna mutací genu, který kóduje enzym změnou metabolické dráhy.

- **Náhrada zablokované metabolické dráhy**

Pokud se zablokuje jedna metabolická dráha, vytvoří se druhá, která sice není tak výkonná, ale postačuje k přežití.

- **Vytvoření cílových míst v nadbytku**

Pokud ATB napadá nějaký enzym bakterie, začne ho sama produkovat ve větším množství. Takto mohou být vytvářeny i cílové buňky. I přes velkou energetickou náročnost je bakterie schopná přežít. (Beneš, 2018, s. 47 - 52).

1.5.1 Rezistence beta-laktamových ATB

Beta-laktamy patří k často používaným ATB, a proto roste i počet rezistentních bakterií. Rezistence je způsobena přítomností beta-laktamáz nebo mutacemi PBP. Ty snižují afinitu k beta-laktamovým ATB. Rezistence také vzniká, když je snížena propustnost ATB přes buněčnou stěnu nebo jejich vypuzováním díky pumpám (Fluit et al., 2001).

1.5.2 Rezistence zprostředkovaná beta-laktamázi

První beta-laktamáza byla zjištěna v roce 1965 po zahájení léčby penicilinem (Livermore, 1995). Některé gramnegativní bakterie mají kódované beta-laktamázy přirozeně. Enzymy se nejspíše vyvinuly z PBP a pravděpodobně vznikly následkem

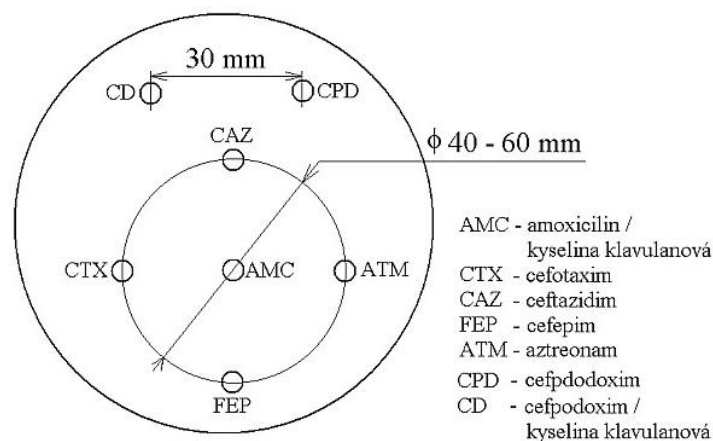
selektivního tlaku půdních organismů, které produkují beta-laktamy (Bradford, 2001). Beta-laktamázy mohou být produkovány konstitutivně (bakterie vytváří enzymy bez ohledu na přítomnosti nebo nepřítomnosti ATB a to v okolí nebo uvnitř buňky), anebo induktivně (beta-laktamázy jsou produkovány pouze, když je v okolí beta-laktamová ATB) (Livermore, 1995).

1.6 Laboratorní průkaz

V této kapitole jsou popsány metody detekce ESBL, ale v Nemocnici Písek, a.s. se neprovádí.

1.6.1 Konfirmační metoda CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute)

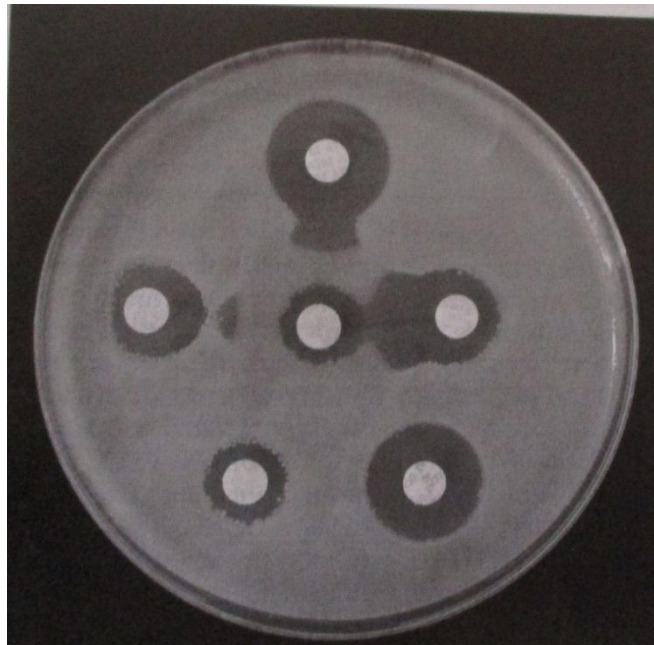
Tato metoda srovnává vytvořené inhibiční zóny kolem ATB disků. Mueller-Hintonova půda se naočkuje testovanou kulturou, na kterou se poté pokládají papírové disky s ATB. Jeden je napuštěný cefalosporinem a druhý je napuštěný stejným cefalosporinem a inhibitorem beta-laktamáz (např. kyselinou klavulanovou). Pokud se průměr zón liší o 5 mm a více, je kultura hodnocena jako producent ESBL. Inhibiční zóna kolem cefalosporinu a inhibitoru musí být větší než inhibiční zóna pouze s cefalosporinem (Hrabák et al., 2007b).



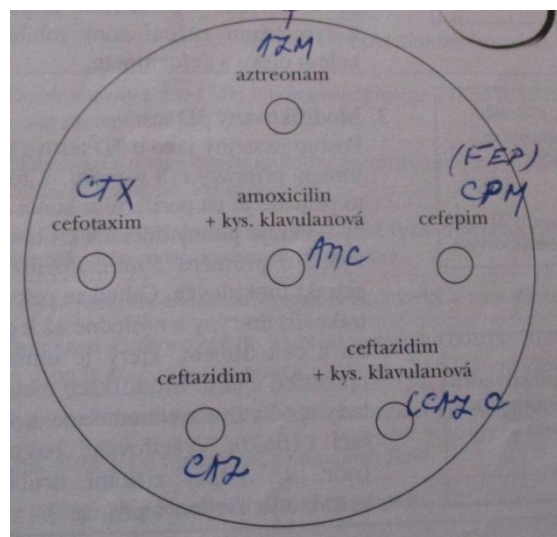
Obrázek 9: Rozložení disků v metodě CLSI (Hrabák et al., 2008)

1.6.2 Metoda DDST (Double Disk Synergy Test)

V této metodě se opět rozočkuje bakterie na Mueller-Hintonovu půdu. Poté se pokládají disky s ATB. Hodnotí se deformace inhibičních zón mezi diskem a amoxicilinem nebo kys. klavulanovou, aztreonamem a cefalosporiny (viz obr. 10 a 11). Pokud se vytvoří inhibiční zóna ve tvaru „špuntu od vína“ a je směřována od disku s amoxicilinem směrem k disku s jiným ATB, je kultura považována za producenta ESBL (Jarlier et al., 1988).



Obrázek 10: DDST test s pozitivním výsledkem (Kolář, 200, s. 196)



Obrázek 11: Rozložení disků v metodě DDST (Kolář, 200 s. 201)

2 CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY

2.1 Cíle

- Charakterizovat vlastnosti a působení ESBL kmenů
- Stanovení množství výskytu ESBL kmenů v moči v porovnání Nemocnice Písek, a.s. a okres Písek
- Celkové shrnutí pozorování výskytu v oddělení klinické mikrobiologie

Zpracovaná data jsou sledována v průběhu roku 2016.

2.2 Hypotézy

U této bakalářské práce předpokládám že:

- Vyšší výskyt pozitivních ESBL kmenů bude v nemocnici
- Nejvyšší výskyt bude na oddělení ONP, DIOP, SOCSL
- Vyšší výsledky rezistence bude mít rod *Escherichia*

3 METODIKA

3.1 Charakteristika souboru

Laboratorní část bakalářské práce byla provedena na oddělení klinické mikrobiologie v nemocnici Písek, pod vedením paní primářky MUDr. Věry Kůrkové. Všechna vyšetření byla prováděna pod odborným dozorem.

3.2 Technika sběru dat

Pro analýzu četnosti výskytu a rezistence kmenů ESBL byla použita data z databáze oddělení klinické mikrobiologie nemocnice Písek, a.s., Karla Čapka 589, Písek, za rok 2016. Při práci nebyla použita žádná jména ani rodná čísla pacientů.

3.3 Kultivace vzorků

Pro detekci ESBL jsem prováděla tyto metody:

- Kultivace chromogenních půd
- MAST test
- Diluční mikrometoda MIC

V praktické části jsem si také vyzkoušela kultivaci na krevním agaru (viz přílohy 1 - 3), na biochemickém klínu (viz přílohy 4 - 8), mikrotrační destičky (viz příloha 9) a pohybů v tekuté půdě (přílohy 10 - 12).

3.3.1 Chromogenní půdy

Tyto diagnostické půdy způsobují barevný růst bakterie. Obsahují indikátory, které v důsledku změn v okolí změni barvu např. změnou pH. Tyto půdy obsahují chromogeny, barevné molekuly navázané na substrát. Bakterie po rozštěpení substrátu chromogen uvolní a způsobí barevný růst (viz obr. 12 - 17).

Pracovní postup:

Sterilní kličkou se setře bakterie z již nakultivované plotny kolonie bakterie a vytvoříme inokulum, které poté rozočkujeme do jednotlivých kolonií. Kultivace trvá 18 - 24 hodin při 37°C.

Hodnocení:

Hodnotí se výsledná barva narostlých kolonií.

3.3.1.1 *Brilliance ESBL agar*

Vzhled jednotlivých bakterií vidíme na obrázcích 12 a 13.

- **Rod *Klebsiella***



Obrázek 12: *Klebsiella pneumoniae* na ESBL půdě (vlastní zdroj)

- **Rod *Escherichia***



Obrázek 13: *Escherichia coli* na ESBL půdě (vlastní zdroj)

3.3.1.2 *Brilliance UTI agar*

Na obrázcích 14 - 17 vidíme nakultivované bakterie na UTI půdě.

- Rod *Enterobacter*



Obrázek 14: *Enterobacter* na UTI plotně (vlastní zdroj)

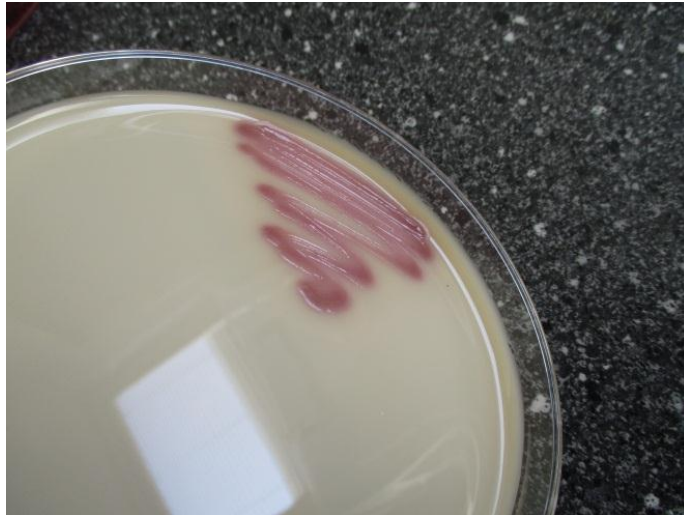
- Rod *Klebsiella*



Obrázek 15: *Klebsiella pneumoniae* na UTI plotně (vlastní zdroj)

Kolonie, které se nacházejí mimo rozočkovanou část půdy jsou způsobeny špatným naočkováním.

- Rod *Escherichia*



Obrázek 16: *Escherichia coli* na UTI plotně (vlastní zdroj)

- Rod *Proteus*



Obrázek 17: *Proteus* na UTI plotně (vlastní zdroj)

3.3.2 MAST test

Tento test se používá pro detekci AmpC a širokospektrých beta-laktamáz (viz obr. 18).

Pracovní postup:

Připravíme si inokulum o denzitě 0,5 MacFarlanda a přelijeme půdu. Přebytkovou tekutinu odstraníme a položíme sterilní jehlou disky.

Složení disků:

A = 10 µg cefpodoxim

B = 10 µg cefpodoxim + ES_L inhibitor

C = 10 µg cefpodoxim + AmpC inhibitor

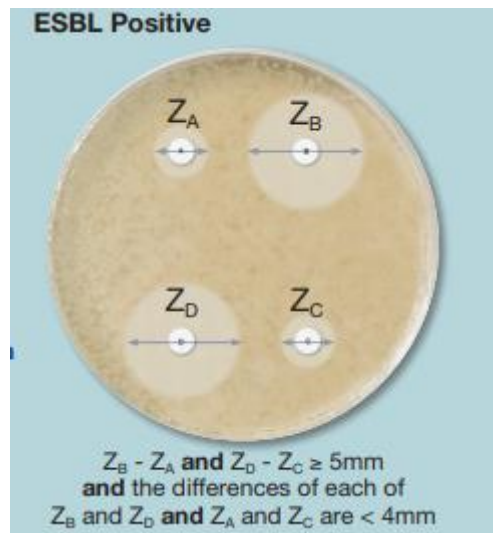
D = 10 µg cefpodoxim + ES_L inhibitor + AmpC inhibitor

Po kultivaci 17-24 hodin při 37°C se nejprve zóny změří. Pokud nevykazují žádnou inhibiční zónu, jejich výsledek se zapíše jako průměr 6 mm.

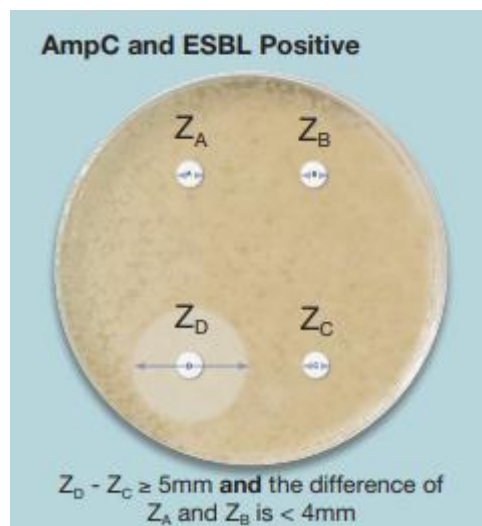
Hodnocení je ve 4 krocích:

1. Dále se porovnává inhibiční zóna disku A s ostatními (B, C, D). Pokud jsou všechny zóny od sebe vzdáleny do 2 mm, bakterie nevykazuje známky ESBL ani AmpC aktivity.
2. Zóny se od sebe odečítají a to A od B, C od D, B od D, A od C. Pokud je výsledek rozdílu B od A, a D od C větší nebo roven 5 mm, a rozdíly D od B a C od A menší než 5mm, bakterie vykazuje ESBL.
3. U tohoto kroku se provádí stejné odečty jako u předchozího. Pokud jsou výsledky rozdílů u zón B od A, a D od C menší než 5 mm a rozdíly D od B a C od A větší nebo rovny 5 mm, vykazují AmpC aktivitu.
4. Odečítají se průměry zón u disku C od zón disků D a A od B. Pokud je rozdíl zón D-C větší nebo roven 5mm, ale rozdíl B-A menší než 5 mm, bakterie vykazuje kombinaci ESBL i AmpC (příbalový leták).

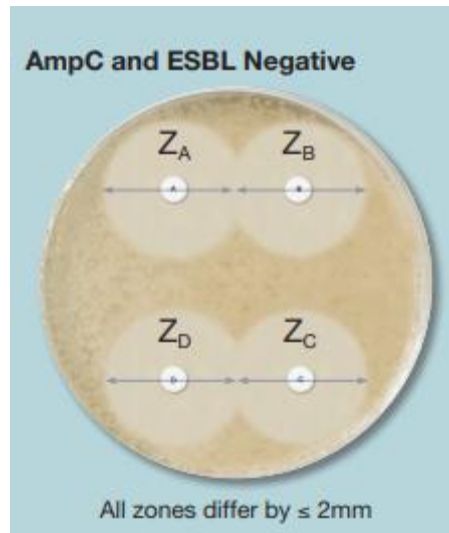
Vzhled pozitivního a negativního MAST testu můžeme vidět na obrázcích 18 - 20.



Obrázek 18: ESBL pozitivní MAST test (www.mastgrp.com)



Obrázek 19: ESBL a AmpC pozitivní MAST test (www.mastgrp.com)



Obrázek 20: ESBL negativní MAST test (www.mastgrp.com)

3.3.3 Mikrotitrační destičky

3.3.3.1 MIC G-I

Tento test je určen pro stanovení citlivosti k ATB čeledi *Enterobacteriaceae* na základě determinance MIC. To se posuzuje podle nejnižší koncentrace, která zamezí růstu bakterie. Principem je rehydratace ATB v jamkách za pomoci Mueller-Hintonovy II půdy, a přidání bakteriální suspenze. Poté se celá destička inkubuje 16 - 20 hodin a vizuálně jsou odečítány výsledky. V každé svislé řadě je jiné ATB a podle pozice jamky v řadě se liší jeho koncentrace (viz obr. 21). Podle toho, kde bakterie naroste, se vytvoří zákal.

antibiotik a jejich koncentračních řad na destičce

	AMP	AMS	CFZ	CXM	AZI	GEN	AMK	COL	T/S	OIP	CMP	TET
A	128	128/64	16	64	16	32	64	16	4/6	8	32	32
B	64	64/32	8	32	8	16	32	8	2/38	4	16	16
C	32	32/16	4	16	4	8	16	4	1/19	2	8	8
D	16	16/8	2	8	2	4	8	2	0,5/9,5	1	4	4
E	8	8/4	1	4	1	2	4	1	0,25/4,75	0,5	2	2
F	4	4/2	0,5	2	0,5	1	2	0,5	0,12/2,38	0,25	1	1
G	2	2/1	0,25	1	0,25	0,5	1	0,25	0,06/1,19	0,12	0,5	0,5
H	1	1/0,5	0,12	0,5	0,12	0,25	0,5	0,12	0,03/0,6	0,06	0,25	K

Obrázek 21: Tabulka koncentrací ATB v jamkách u setu G-I (vlastní zdroj)

Pracovní postup:

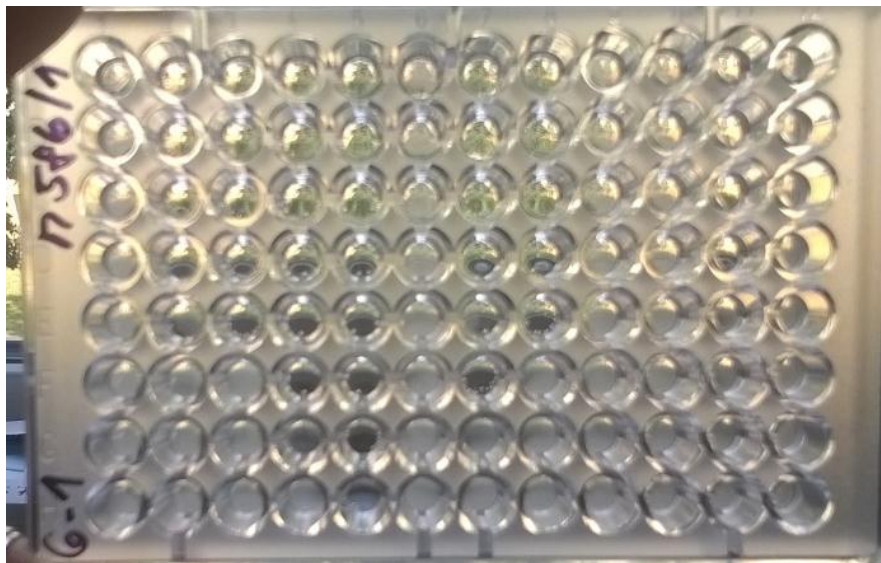
1. Do zkumavky si připravíme si 12 ml fyziologického roztoku.
2. Z kultury (18 - 24 hodin staré) použijeme několik kolonií k přípravě bakteriální suspenze (sterilní kličkou setřeme kolonie a ve fyziologickém roztoku za pomoci třepačky rozmícháme). Suspenze musí mít denzitu 0,5 MacFarlanda. Pro správné měření použijeme denzitometr.
3. Pipetou přeneseme 50 MIKRO této suspenze do zkumavky s 13 ml suspenzního média MIC.
4. Destička se vybalí z hliníkového obalu a postupně se do každé jamky napipetuje 100 mikro naředěné suspenze.
5. Takto napipetovanou destičku vložíme do PE sáčku (musí být zavřený, aby nedocházelo k vysychání inokula).
6. Takto inkubujeme 16 - 20 hodin při 37°C.

Hodnocení:

Podle zákalu vytvořeného v jamkách se odečítá první jamka odspoda, která je čirá (je tedy citlivá na určité ATB) a zamezuje růstu bakterie. Pro lepší viditelnost je vhodné odečítat proti světlu nebo černému pozadí. Jamka vpravo dole je kontrola (označení K). V této kontrole musí být vždy nárůst (viz obr. 22 a 23).



Obrázek 22: Naočkovaná mikrotitrační destička set G-I ESBL pozitivní (vlastní zdroj)



Obrázek 23: Naočkovaná mikrotitrační destička set G-I ESBL negativní (vlastní zdroj)

Výsledky se zapisují do počítače do systému Open Lims, v kterém má každý pacient tabulku. Do té se zapisuje číslo jamky, která je jako první odspoda citlivá. Systém sám vyhodnotí, zda je bakterie citlivá nebo rezistentní.

3.3.3.2 MIC G-II

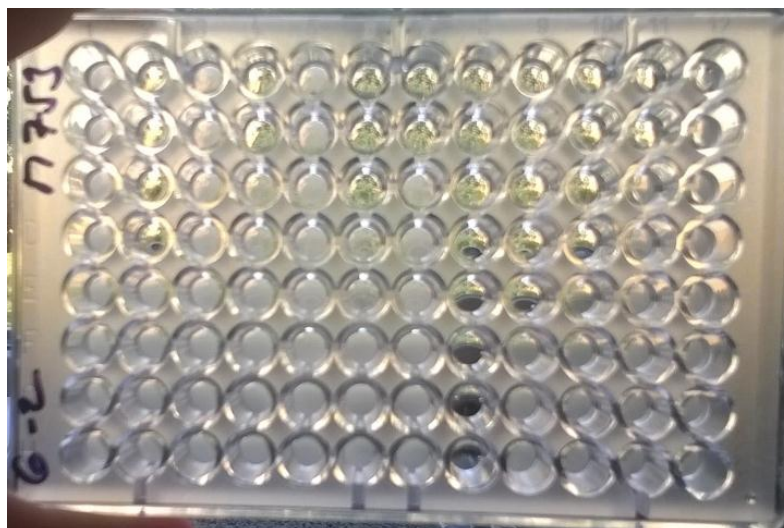
Princip testu je stejný jako u destiček MIC G-I, s tím rozdílem, že tento typ se používá pro pacienty se závažnými infekcemi, zejména u pacientů hospitalizovaných. Jsou zde pouze rozdíly v ATB a jejich koncentracích (viz obr. 24).

Pracovní postup i hodnocení je stejné jako u setu MIC G-I.

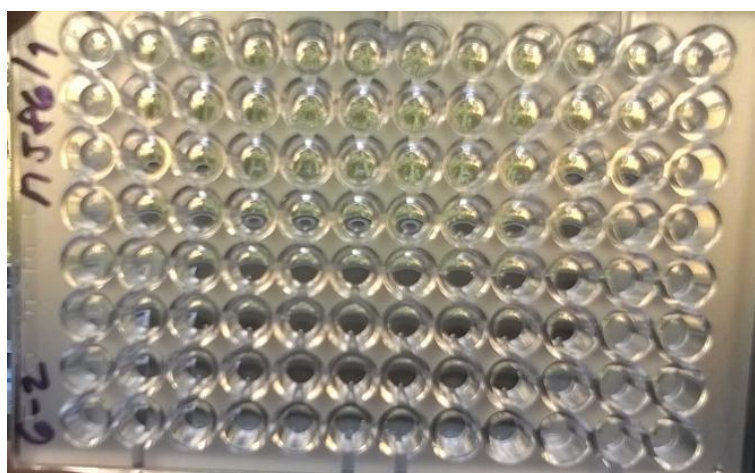
	PIP	PIT	CTX	CAZ	CPZ	OPS	CEP	MER	ERY	TGC	NET	TOB
A	128	128/4	8	16	64	64/32	16	16 R	2 R	8	16	8 R
B	64	64/4	4 R	8 R	32	32/16	8 R	8 μ	1 μ	4 R	8 R	4 μ
C	32 R	32/4 R	2 μ	4 μ	16	16/8	4 μ	4 μ	0,5 C	2 μ	4 μ	2 C
D	16 μ	16/4 μ	1 C	2 μ	8	8/4	2 μ	2 C	0,25	1 C	2 C	1
E	8 C	8/4 C	0,5	1 C	4	4/2	1 μ	1	0,12	0,5	1	0,5
F	4	4/4	0,25	0,5	2	2/1	0,5	0,5	0,06	0,25	0,5	0,25
G	2	2/4	0,12	0,25	1	1/0,5	0,25	0,25	0,03	0,12	0,25	0,12
H	1	1/4	0,06	0,12	0,5	0,5/0,25	0,12	0,12	0,015	0,06	0,12	K

Obrázek 24: Tabulka s koncentracemi ATB v jamkách u setu G-II (vlastní zdroj)

Výsledky se oproti setu G-I liší. Výsledky jsou viditelné na obrázcích 25 a 26.



Obrázek 25: Naočkovaná mikrotitrační destička set G-II ESBL pozitivní (vlastní zdroj)



Obrázek 26: Naočkovaná mikrotitrační destička G-II ESBL negativní (vlastní zdroj)

3.3.4 *Chí kvadrát (Test dobré shody)*

Tato matematická funkce slouží ke statistickému posuzování shody vůči pozorovaným a očekávaným hodnotám (zda se testovaný poměr shoduje s teoreticky očekávaným). Test se nehodí pro soubory s malými četnostmi.

Vzorec pro výpočet chí kvadrátu je:

$$x^2 = \sum \frac{(P-O)^2}{O}$$

Kde:

P jsou pozorované hodnoty

O jsou očekávané hodnoty pro danou kategorii

Hladina významnosti = 0,05 (5 %)

Podle výpočtu se výsledek porovná s hladinou významnosti a dále se určí, zda má tento soubor očekávanou shodu a vyplatí se ho sledovat.

Pokud má výsledek menší hodnotu, je velmi malá pravděpodobnost, že jsou hodnoty nezávislé a statisticky má významný vliv. (Papaková, 2010, s. 18 - 25).

4 VÝSLEDKY

Pro vyhodnocení výsledků z databáze jsem vytvořila tabulky a grafy, které ukazují na výskyt ESBL kmenů v Nemocnici Písek, a.s. a v komunitě mimo nemocnici okresu Písek. U některých tabulek je vypočítaný chí kvadrát.

Celkové porovnání v tabulkách a grafech

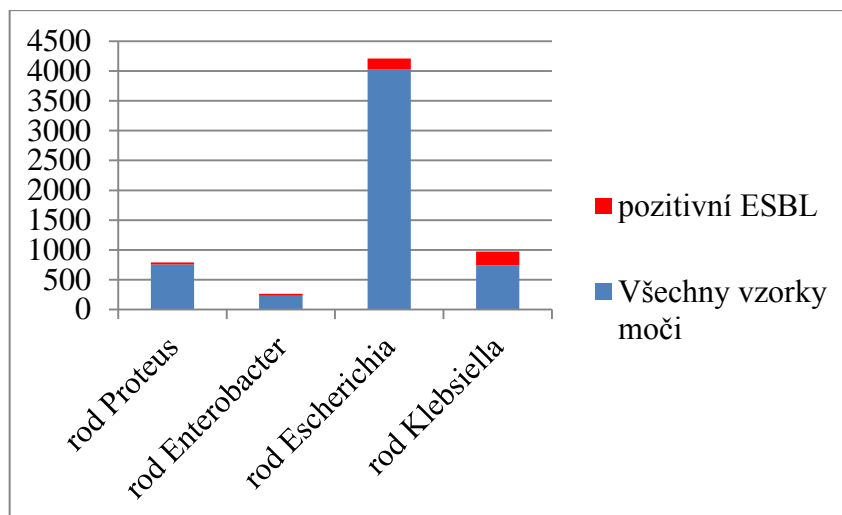
4.1 Celkový rozdíl mezi pozitivními a všemi vzorky z nemocnice a z komunity

Z tabulky č. 1 plyne, že nejvíce vzorků zastupuje rod *Escherichia* a to 4034, ze kterých bylo 178 pozitivní na ESBL. Rody *Proteus* a *Klebsiella* mají přibližně stejný počet celkových vzorků, avšak rod *Klebsiella* má pozitivních 231 a *Proteus* pouze 37. Rod *Enterobacter* má celkových vzorků 229, což je nejméně, ale pozitivních je srovnatelně s *Proteem* a to 36. Chí kvadrát = < 1 %.

Tyto hodnoty jsem zanesla i do grafu (viz obr. 27). Na něm je podle barevného odlišení viditelné, jakou část zastupují ESBL pozitivní kmeny.

Tabulka 1: Celkové porovnání všech vzorků moči k pozitivním ESBL vzorkům (vlastní zdroj)

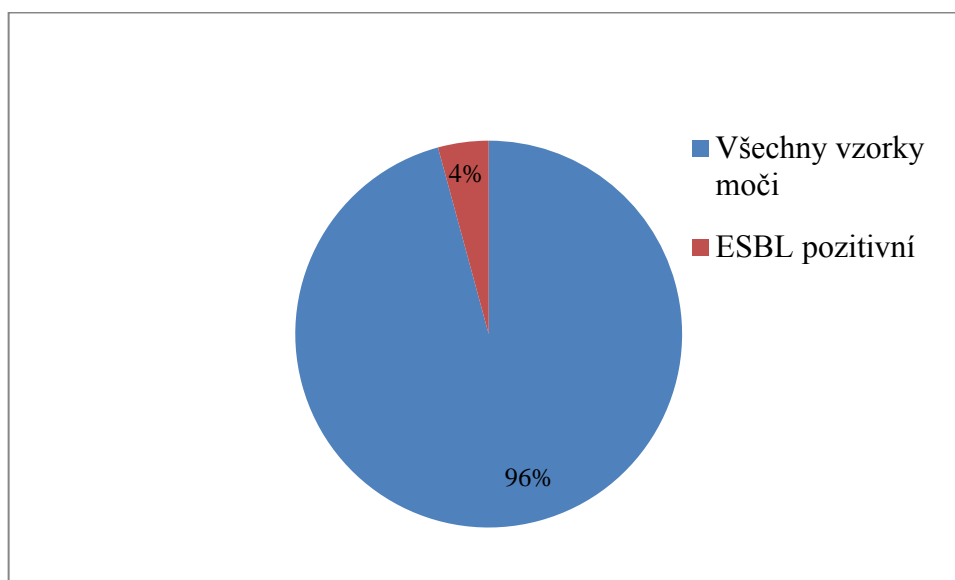
	Všechny vzorky moči	pozitivní ESBL
rod <i>Proteus</i>	755	37
rod <i>Enterobacter</i>	229	36
rod <i>Escherichia</i>	4034	178
rod <i>Klebsiella</i>	740	231



Obrázek 27: Graf všech vzorků a pozitivních ESBL vzorků (vlastní zdroj)

4.2 Procentuální zastoupení rodu *Escherichia*

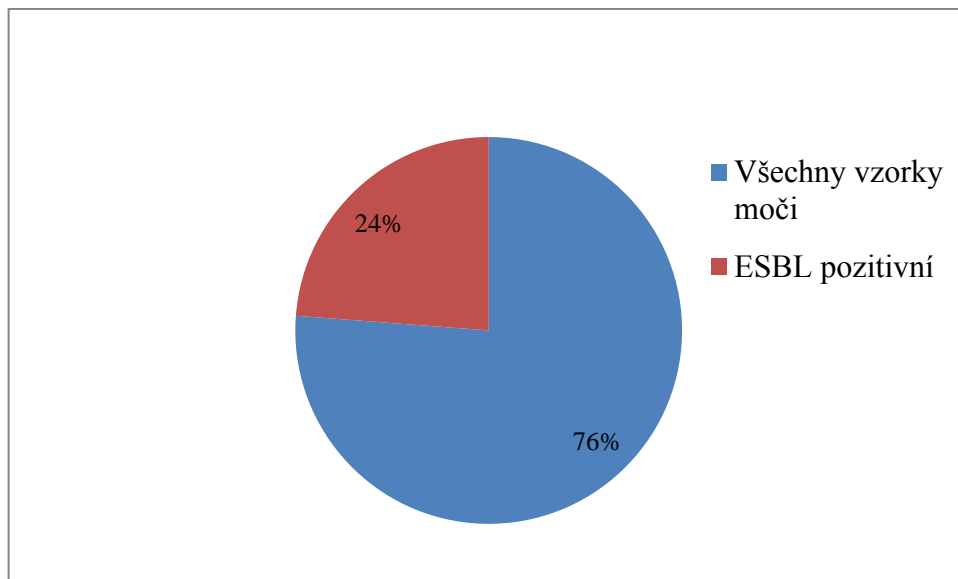
Z celkového počtu přijatých vzorků bylo ESBL pozitivních pouze 4 % (viz obr. 28)



Obrázek 28: Procentuální zastoupení pozitivních ESBL vzorků rodu *Escherichia* z celkového počtu vzorků (vlastní zdroj)

4.3 Procentuální zastoupení rodu *Klebsiella*

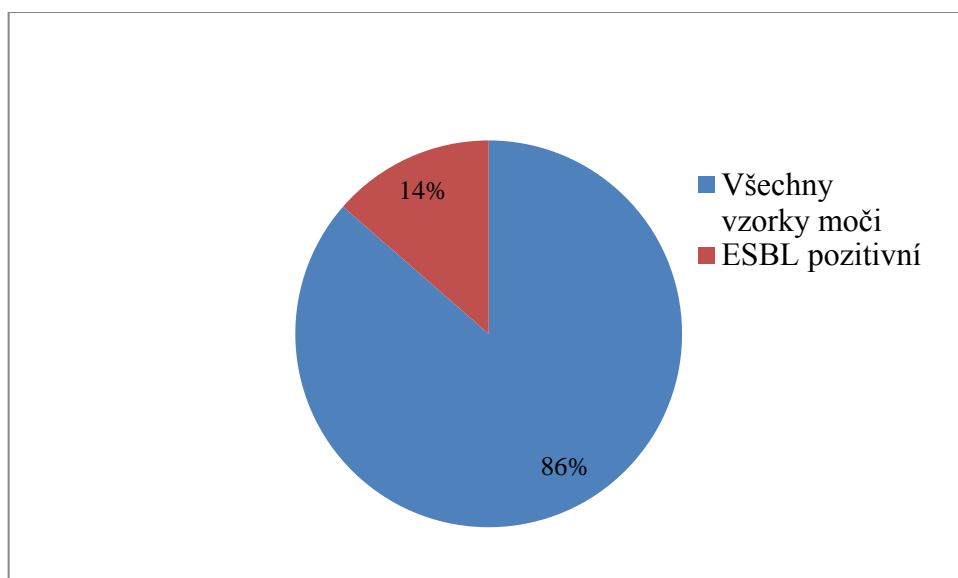
Z celkového počtu je ESBL vzorků pozitivních 24 % (viz obr. 29).



Obrázek 29: Procentuální zastoupení pozitivních ESBL vzorků rodu *Klebsiella* z celkového počtu vzorků (vlastní zdroj)

4.4 Procentuální zastoupení rodu *Enterobacter*

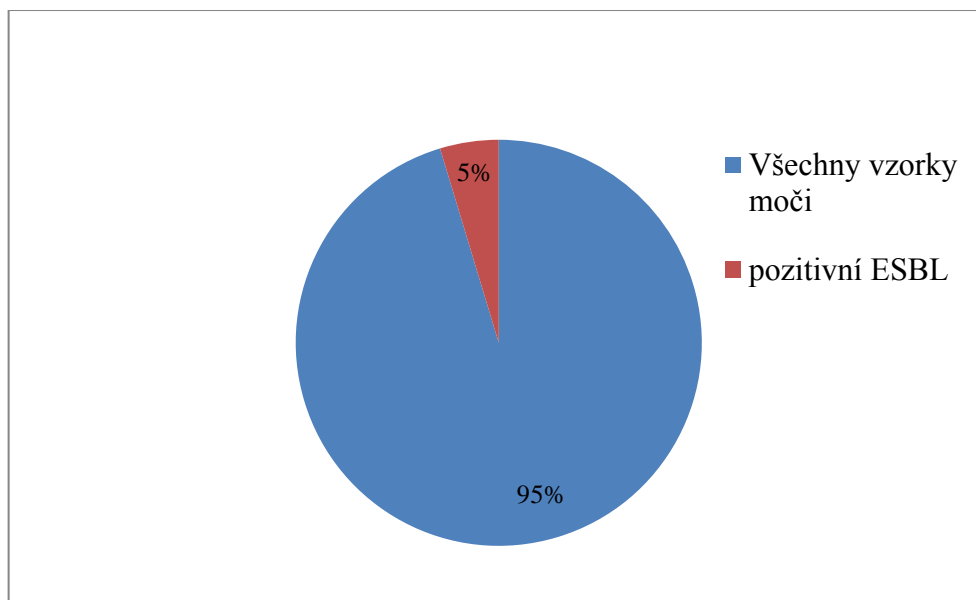
Z celkového počtu všech vzorků je pouze 14 % pozitivních (viz obr. 30).



Obrázek 30: Procentuální zastoupení pozitivních ESBL vzorků rodu *Enterobacter* z celkového počtu vzorků (vlastní zdroj)

4.5 Procentuální zastoupení rodu *Proteus*

Z celkového počtu přijatých vzorků je pozitivních 5 % (viz obr. 31).



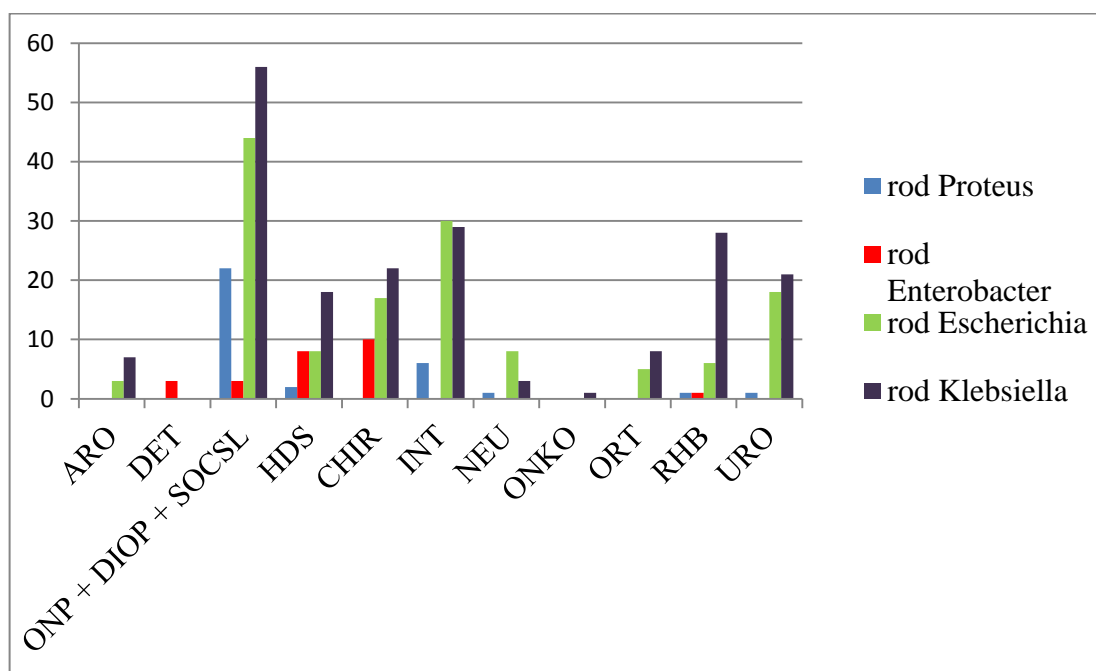
Obrázek 31: Procentuální zastoupení pozitivních ESBL vzorků z celkového počtu vzorků rodu *Proteus* (vlastní zdroj)

4.6 Srovnání ESBL vzorků na jednotlivých odděleních v nemocnici

Tabulka č. 2 ukazuje, že největší zastoupení pozitivních ESBL vzorků je na oddělení DIOP, ONP a SOCSL a naopak nejmenší výskyt má oddělení ONKO a DET. Graf (viz obr. 32) znázorňuje i zastoupení rodu bakterií. Nejvíce infekcí způsobuje rod *Klebsiella* a *Escherichia*. Chí kvadrát = < 1 %.

Tabulka 2: Porovnání pozitivních ESBL vzorků na odděleních nemocnice (vlastní zdroj)

	ARO	DET	ONP + DIOP + SOCSL	HDS	CHIR	INT	NEU	ONKO	ORT	RHB	URO
rod <i>Proteus</i>	0	0	22	2	0	6	1	0	0	1	1
rod <i>Enterobacter</i>	0	3	3	8	10	0	0	0	0	1	0
rod <i>Escherichia</i>	3	0	44	8	17	30	8	0	5	6	18
rod <i>Klebsiella</i>	7	0	56	18	22	29	3	1	8	28	21

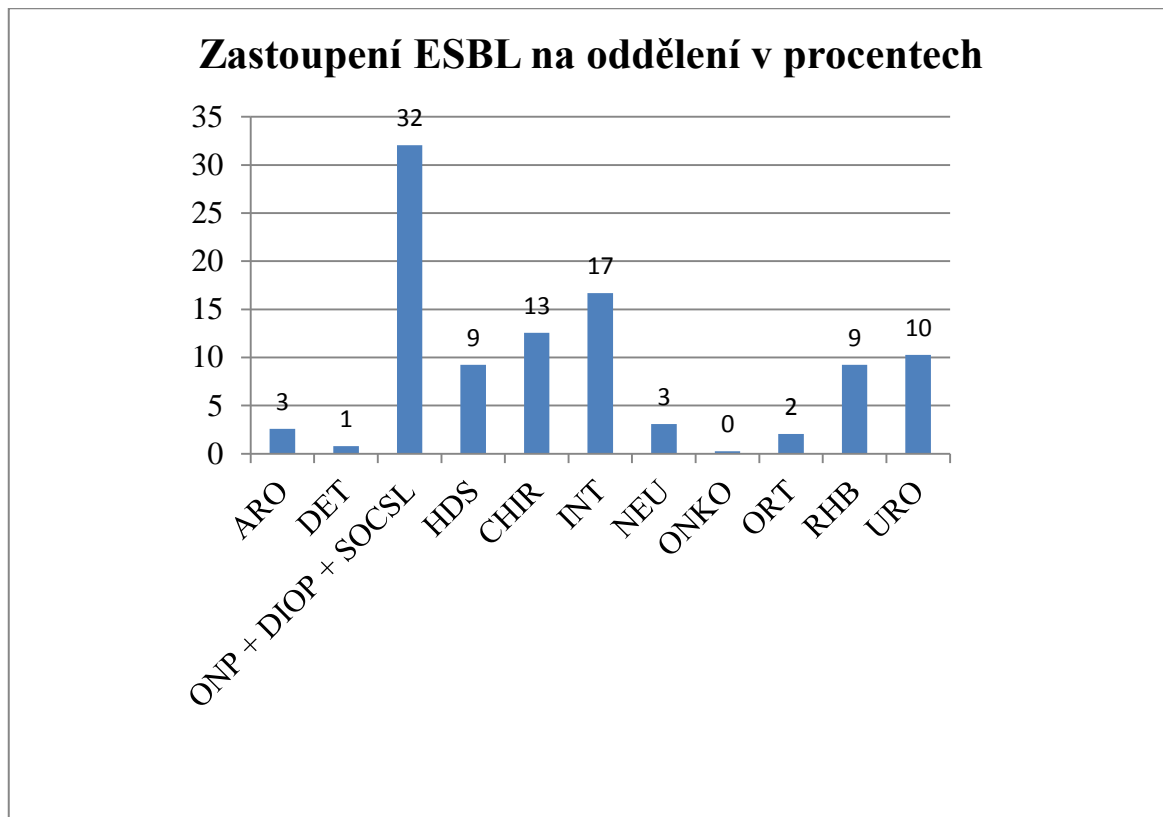


Obrázek 32: Graf s porovnáním ESBL vzorků v jednotlivých odděleních nemocnice (vlastní zdroj)

4.7 Procentuální rozdělení podle oddělení

Na grafu (viz obr. 33) můžeme vidět procentuální rozdělení pozitivních vzorků z nemocničních oddělení. Nejvíce jsou zastoupena oddělení ONP + DIOP + SOCSL

s 32 %, INT se 17 %, a CHIR s 13 %. Zbývající oddělení mají pod 10 %. Chí kvadrát = < 1 %.



Obrázek 33: Graf s procentuálním zastoupením výskytu ESBL vzorků (vlastní zdroj)

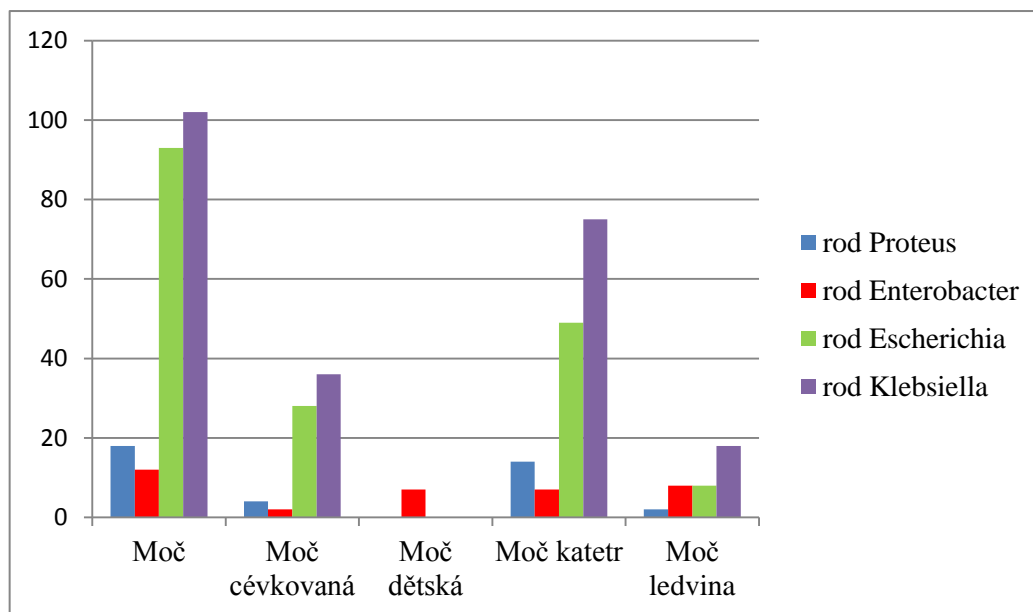
4.8 Srovnání podle druhu materiálu

V tabulce č. 3 vidíme srovnání podle druhu materiálu. Největší počet nálezů se vyskytuje v moči - celkem 225, v katetřované moči 145, v cévkované moči 70 a v moči z ledviny pouze 36. Nejméně pozitivních vzorků bylo v dětské moči - pouze 7. Graf znázorňuje i detailnější přehled s rodem bakterií (viz obr. 34). Chí kvadrát = < 1 %.

Tabulka 3: Srovnání vzorků podle materiálu (vlastní zdroj)

	Moč	Moč cévkovaná	Moč dětská	Moč katetr	Moč ledvina
rod <i>Proteus</i>	18	4	0	14	2
rod <i>Enterobacter</i>	12	2	7	7	8
rod	93	28	0	49	8

<i>Escherichia</i>					
rod <i>Klebsiella</i>	102	36	0	75	18



Obrázek 34: Graf s četností ESBL pozitivních vzorků podle druhu materiálu (vlastní zdroj)

4.9 Přehled všech vzorků a pouze pozitivních v nemocnici

V tabulce č. 4 vidíme srovnání všech pozitivních ESBL vzorků z nemocnice. Nejvíce celkových vzorků má rod *Escherichia*, avšak nejvíce pozitivních rod *Klebsiella*. Nejméně pak rod *Proteus* a *Enterobacter*. Chí kvadrát = < 1 %.

Tabulka 4: Porovnání se všemi vzorky a pouze pozitivními ESBL v nemocnici (vlastní zdroj)

	Všechny vzorky	pozitivní ESBL
rod <i>Proteus</i>	466	34
rod <i>Enterobacter</i>	149	25
rod <i>Escherichia</i>	1956	139
rod <i>Klebsiella</i>	515	195

4.10 *Přehled všech vzorků a pouze pozitivních v komunitě okresu Písek*

Mimo nemocnici je menší množství materiálu ve srovnání s nemocnicí. Tudiž je i méně vzorků pozitivních. Nejvíce celkových i pozitivních vzorků zastupuje rod *Escherichia* s 39 vzorky ESBL, za ní *Klebsiella* s 36, rod *Enterobacter* má 11 pozitivních a *Proteus* pouze 3 pozitivní vzorky (viz Tabulka č. 5), $\chi^2 = < 1 \%$.

Tabulka 5: Porovnání se všemi vzorky a pouze pozitivními ESBL vzorky mimo nemocnici (vlastní zdroj)

	Všechny vzorky	pozitivní ESBL
rod <i>Proteus</i>	289	3
rod <i>Enterobacter</i>	80	11
rod <i>Escherichia</i>	2078	39
rod <i>Klebsiella</i>	225	36

4.11 *Porovnání pozitivivity mezi komunitou a nemocnicí*

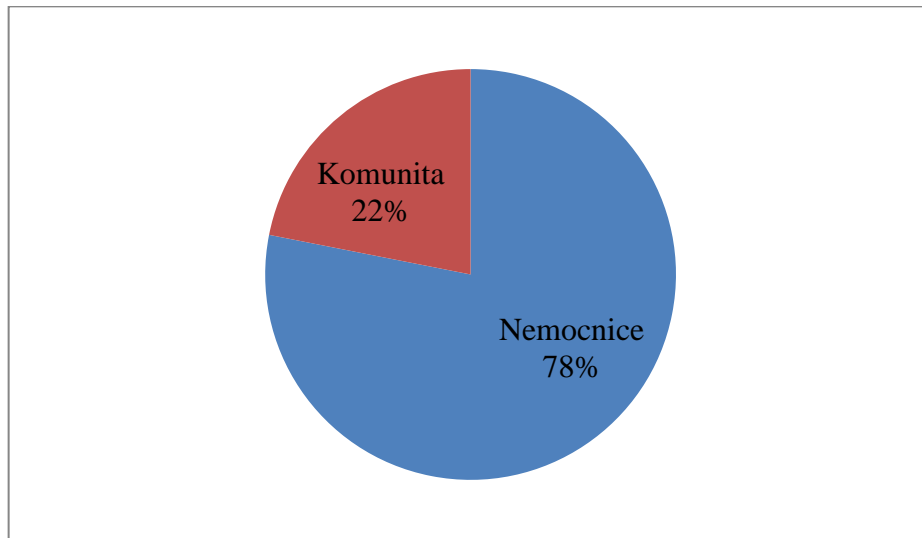
V tabulce č. 6 vidíme, že pozitivních kmenů má více nemocnice než komunita okresu. Největší zastoupení mají rody *Escherichia* a *Klebsiella*. Méně je jich u rodů *Enterobacter* a *Proteus*. $\chi^2 = < 3,2 \%$

Tabulka 6: Srovnání EBL pozitivních vzorků v nemocnici a v komunitě okresu (vlastní zdroj)

	Komunita	Nemocnice
rod <i>Proteus</i>	3	34
rod <i>Enterobacter</i>	11	25
rod <i>Escherichia</i>	39	139
rod <i>Klebsiella</i>	36	195

4.12 *Procentuální zastoupení pozitivitu rodu *Escherichia* v porovnání mezi nemocnicí a komunitou*

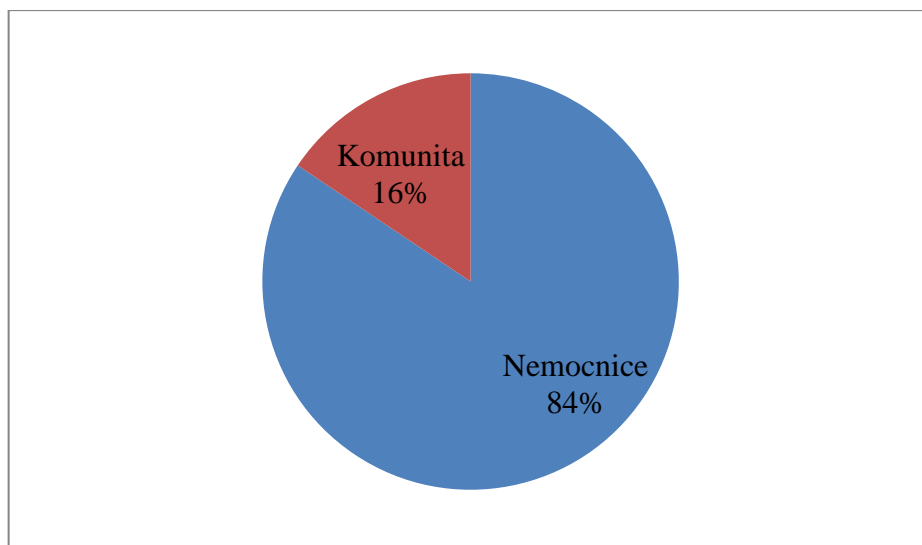
U rodu *Escherichia* ve srovnání nemocnice – komunita bylo pozitivních ESBL 78 % v nemocnici a 22 % v komunitě (viz obr. 35).



Obrázek 35: Porovnání pozitivních ESBL mezi nemocnicí a komunitou okresu rodu *Escherichia* (vlastní zdroj)

4.13 *Procentuální zastoupení pozitivitu rodu *Klebsiella* mezi nemocnicí a komunitou*

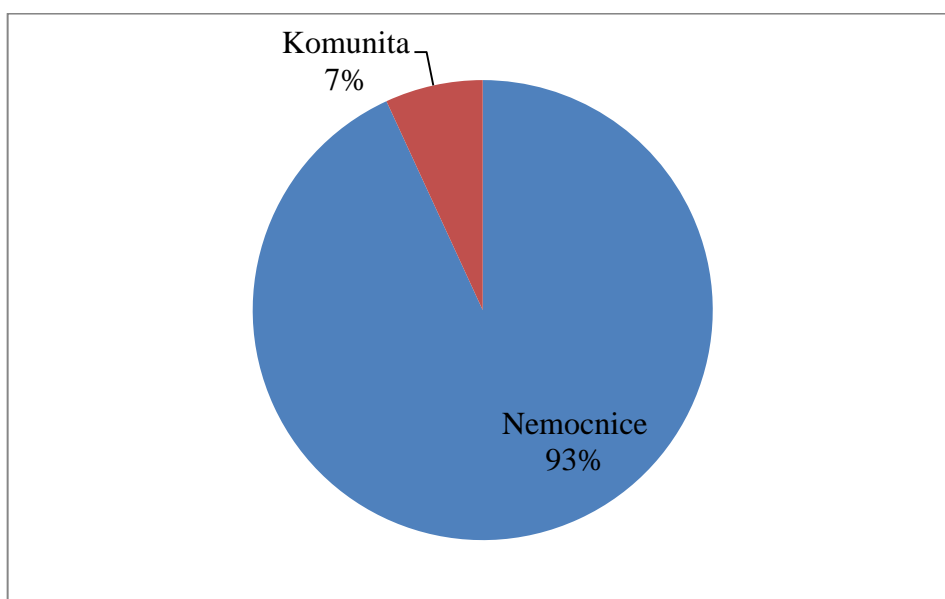
U rodu *Klebsiella* je pozitivita v nemocnici 84 % a v komunitě 16 % (viz obr. 36).



Obrázek 36: Porovnání pozitivních ESBL mezi nemocnicí a komunitou rodu *Klebsiella* (vlastní zdroj)

4.14 *Procentuální zastoupení positivity rodu Enterobacter mezi nemocnicí a komunitou*

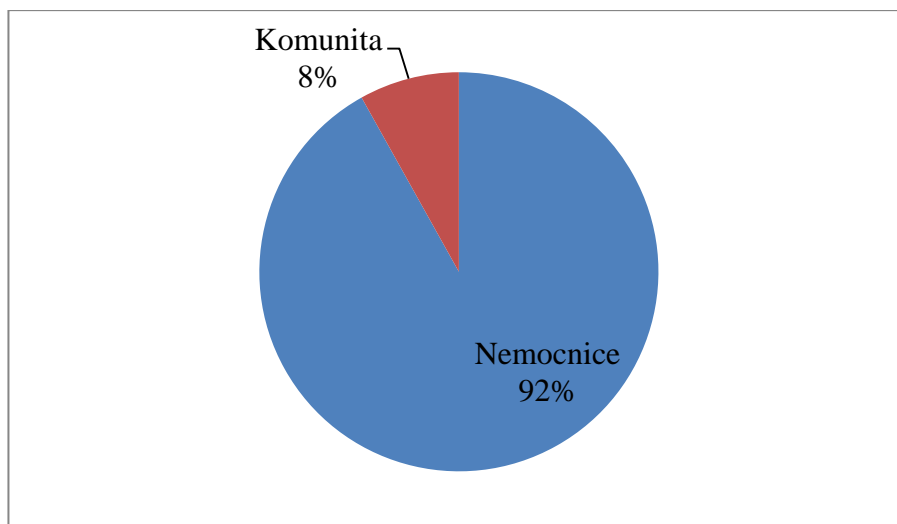
Rod *Enterobacter* se v nemocnici vyskytuje v 93 %, v komunitě v 7 % (viz obr. 37).



Obrázek 37: Porovnání pozitivních ESBL vzorků mezi nemocnicí a komunitou okresu rodu *Enterobacter* (vlastní zdroj)

4.15 *Procentuální zastoupení positivity rodu Proteus mezi nemocnicí a komunitou*

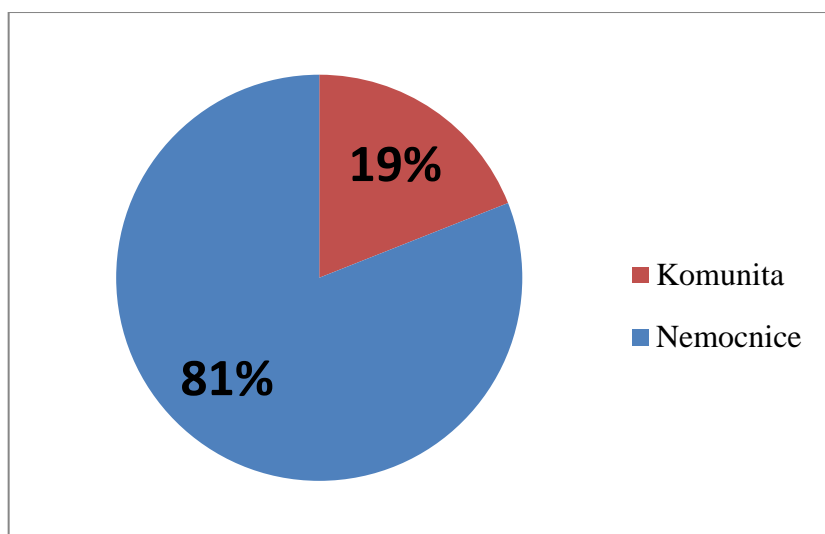
U rodu *Proteus* se výskyt v nemocnici a mimo ní téměř shoduje s rodem, *Enterobacter*. Liší se pouze o 1 %. A to že v nemoci je 92 % a v komunitě 8 % (viz obr. 38).



Obrázek 38: Porovnání pozitivních ESBL vzorků mezi nemocnicí a komunitou rodu *Proteus* (vlastní zdroj)

4.16 *Procentuální zastoupení positivity ESBL mezi nemocnicí a komunitou*

Celkové zastoupení pozitivních bakterií všech rodů (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* a *Proteus*) je několikanásobně vyšší v nemocnici než v komunitě (viz obr. 39). V nemocnici se vyskytuje 81 % všech ESBL pozitivních bakterií, zatímco v komunitě pouze 19 %.



Obrázek 39: Srovnání ESBL pozitivních vzorků v nemocnici a v komunitě okresu (vlastní zdroj)

U všech testovaných tabulek vyšel Chí kvadrát menší než 5 %. To znamená, že je velmi malá pravděpodobnost, že jsou hodnoty nezávislé a statisticky mají významný vliv.

5 DISKUZE

Detekce ESBL kmenů je velice důležitá z hlediska možné rezistence na některá ATB. Mezi nejčastější původce těchto kmenů patří bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, zejména rody *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* a rod *Proteus*. Tyto bakterie jsou poměrně časté, a tak je velmi důležité zachytit jejich ESBL pozitivitu včas. Mimo tyto rody bakterií dokáží také ESBL vykazovat bakterie rodu *Morganella*, *Providencia* a *Serratia*.

V Nemocnici Písek, a.s. se přímo na oddělení klinické mikrobiologie ESBL kmeny kultivují a to metodami MAST test, MIC a chromogenními agary. Jsou to poměrně jednoduché metody a výsledky jsou známy do 24 hodin.

Ve své bakalářské práci jsem hodnotila výsledky ESBL vzorků z laboratorního informačního systému Open Lims. Porovnávala jsem výsledky podle rodu bakterií, podle materiálu, podle oddělení a rozdíl mezi nemocnicí a komunitou.

Na základě výsledků bylo zjištěno, že z celkového počtu (téměř 5 800 vzorků), bez ohledu na to jestli jsou vzorky z nemocnice nebo z komunity, bylo nejvíce pozitivních z rodu *Klebsiella* (231), dále *Escherichia* (178). Tento rod měl také nejvíce celkových vzorků (přes 4 000). Nejmenší zastoupení mají rody *Proteus* (37) a *Enterobacter* (36). Z výsledků podle oddělení jsem zjistila, že nejvíce pozitivních vzorků je na oddělení DIOP + ONP + SOCSL a to 32 %. Z celé nemocnice jsou nejčastější původci na tomto oddělení rody *Escherichia* a *Klebsiella*. Oproti komunitě je v nemocnici pozitivita znatelně vyšší. Rod *Proteus* má z celkového počtu 34 pozitivních ze 466, *Enterobacter* 25 pozitivních ze 149, *Escherichia* 139 pozitivních z 1956 a *Proteus* 195 pozitivních z 515. Mimo nemocnici je výskyt těchto pozitivních kmenů nižší. U rodu *Proteus* jsou 3 pozitivní z 289, *Enterobacter* má 11 pozitivních z 80 vzorků, *Escherichia* pouze 39 pozitivních z 2 078 a *Klebsiella* pouze 36 z 225. Největší výskyt ESBL z hlediska rozdělení podle materiálu byl v moči, protože má nejvíce odebraných vzorků.

V nemocnici je nejvíce pozitivních ESBL vzorků způsobeno rodem *Klebsiella*, zatímco mimo ni rodem *Escherichia*. Rod *Escherichia* je v 78 % zastoupen v nemocnici a ve 22 % v komunitě. Z celkového počtu je tato bakterie ESBL pozitivní pouze ve 4 %, v 96 % je tedy ESBL negativní. Rod *Klebsiella* je v 84 % pozitivní v nemocnici, a v 16

% v komunitě. Z celkového počtu je ESBL pozitivní ve 24 %, negativní v 76%. Rod *Enterobacter* vykazuje pozitivitu u 93 % v nemocnici a v 7 % mimo ni. Procentuálně ze všech výsledků vykazuje ESBL pozitivitu ve 14 %, v 86 % je tedy negativní. A rod *Proteus* je pozitivní v nemocnici v 92 % zatím co v komunitě pouhých 8 %. Celkově je pozitivní pouze u 5 % vzorků. 95 % je tedy negativních.

Konečný výsledek výpočtů porovnávání dokazuje, že v nemocnici je téměř 4x větší výskyt ESBL pozitivních vzorků oproti výsledkům mimo ni. Procentuálně je z nemocnice pozitivních 81 % v komunitě pouze 19 %

Je důležité pomýšlet na stále se zvyšující rezistenci a použití správných ATB. Rezistentní bakterie nemají požadovaný účinek a nemusí tedy léčba fungovat. Z vypočítaných chí kvadrátů lze říci, že všechny výpočty jsou statisticky významné.

Z dosažených výsledků mohu říci, že 1. hypotéza (vyšší výskyt pozitivních ESBL kmenů bude v nemocnici) se potvrdila. 2. hypotéza (nejvyšší výskyt bude na oddělení ONP, DIOP, SOCSL) je také pravdivá. 3. hypotéza (vyšší výsledky bude mít rod *Escherichia*) je pravdivá pouze v porovnání celkových vzorků s pozitivními vzorky mimo nemocnici. V ostatních případech vykazuje nejvyšší pozitivitu rod *Klebsiella*.

6 ZÁVĚR

Cílem mé bakalářské práce byla charakteristika vlastností a působení ESBL kmenů, stanovení množství výskytu ESBL kmenů v moči v Nemocnici Písek, a.s. a okrese Písek, celkové shrnutí pozorování výskytu v oddělení klinické mikrobiologie.

V teoretické části jsem se zabývala popisem ESBL kmenů, jejich charakteristikou a působením, beta-laktamovými ATB a inhibitory, rezistencí a nejčastějšími producenty těchto ESBL kmenů. Jsou to nejčastěji rody *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* a *Proteus*. Za ESBL produkující bakterie se také považují i *Providentia*, *Serratia* a *Morganella*.

V praktické části jsem byla seznámena s provozem na oddělení klinické mikrobiologie – příjem vzorku, identifikace vzorku zaznamenáním do laboratorního informačního systému, proces kultivace (některé vzorky jsem si sama zkusila nakultivovat) a odečtení vzorků a zapsání do počítačového systému. ESBL detekce se na oddělení klinické mikrobiologie provádí metodami MIC, MAST testem a chromogenními půdami.

Ve své práci jsem ze systému OpenLims na oddělení mikrobiologie zhodnotila výsledky pozitivních ESBL kmenů v moči z nemocnice a komunity v okrese Písek za rok 2016. Jednotlivé výsledky jsem porovnávala v tabulkách a grafech, a tak došla k závěrečnému hodnocení.

Z celkového počtu přijatých vzorků do laboratoře má nejvíce ESBL pozitivních rod *Klebsiella*. V porovnání mezi nemocničními odděleními je nejvíce zastoupen také rod *Klebsiella* na oddělení DIOP + ONP + SOCSL. Toto oddělení má celkem 32 % pozitivních vzorků z celé nemocnice. V nemocnici je nejvíce pozitivita způsobeno rodem *Klebsiella*, zatímco mimo ni rodem *Escherichia*. Rod *Escherichia* je v 78 % zastoupen v nemocnici a rod *Klebsiella* je v 76 % pozitivní v nemocnici. Rod *Enterobacter* vykazuje pozitivitu u 93 % v nemocnici. A rod *Proteus* je pozitivní v nemocnici v 92 %. Procentuálně je z nemocnice pozitivních 81 % a 19 % z komunity. Statisticky je významné sledovat tyto ESBL kmény, jelikož u všech testovaných tabulek vyšel χ^2 kvadrát < 1 %.

7 SEZNAM LITERATURY

1. Aplikace ss beta-laktamového spektra [online], [cit. 2018-07-20]. Dostupné z: <http://agscientific.com/blog/2013/03/beta-lactamase-bs-broad-spectrum-inactivates-beta-lactams>
2. BEDNÁŘ, M., et al., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil. ISBN 80-238-0297-6. 265, 226 s.
3. BEN-AMI R., SCHWABER M. J., et al. 2006. Influx of Extended-Spectrum - Lactamase--Producing Enterobacteriaceae into the Hospital. *Clinical Infectious Diseases*. [databáze] **42** (7), 925-934. [cit. 2018-02-16] DOI: 10.1086/500936. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16511754>
4. BENEŠ, J., 2018. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-802-7106-363. 96, 97, 142 - 144, 192 - 196, 47 – 52 s.
5. BONNET, R. 2004. Growing Group of Extended-Spectrum Beta-Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. [databáze]. 48(1), 1-14. [cit. 2018-01-20]. DOI: 10.1128/AAC.48.1.1-14.2004. Dostupné také z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.48.1.1-14.2004>
6. BRADFORD, P. A., 2001. Extended-Spectrum Beta-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, [databáze] 14(4), 933-951. [cit. 2018-1-20] DOI: 10.1128/CMR.14.4.933-951. Dostupné také z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>
7. BRHELOVÁ, E., 2010. *Betalaktamázy se širokým spektrem účinku, jejich genetický základ a metody detekce*. Brno. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzita
8. BUSH K, JACOBY GA, MEDEIROS AA. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [databáze] 39(6):1211-1233. [cit. 2018-01-23]
9. CANTÓN, R., et al. 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*., [databáze] 14, 144-153. [cit. 2018-01-25] DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01850 Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14604857>

10. DE CHAMPS, C. et al. 2000 “A 1998 Survey of Extended-Spectrum β -Lactamases in Enterobacteriaceae in France.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online] 3177–3179. [cit. 2018-02-02] Dostupné také z https://www.researchgate.net/publication/12288465_A_1998_survey_of_extended-spectrum_beta-lactamases_in_Enterobacteriaceae_in_France_The_French_Study_Group
11. DU BOIS, S. K., M. S. MARRIOTT, S. AMYES G. B., 1995. TEM- and SHV-derived extended-spectrum β -lactamases: relationship between selection, structure and function, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 35, [databáze] Issue 1, 1 January, Pages 7–22, Dostupné také z <https://doi.org/10.1093/jac/35.1.7>
12. *ESBL and AmpC detection set disc* [online] [cit. 2018-02-16] Dostupné také z: http://www.mastgrp.com/Identification%20strips%20discs%20and%20rings/Glossies/ESBL_6pp.pdf
13. FLUIT, A. C et al. 2001. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance: molecular aspects, mobility and impact on public health. *Clinical Microbiology Reviews*. [databáze] 14(4), 836-871. [cit. 2018-1-25] DOI: 10.1128/CMR.14.4.836-871.2001. Dostupné také z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.14.4.836-871.2001>
14. HOHEL I. 2015 [online]. *CH 3 SCH 3. Antibiotika H N H O H OH H 3. část I*. [cit. 2018-07-20]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/452373-Ch-3-sch-3-antibiotika-h-n-h-o-h-oh-h-3-cast-i-igor-hochel.html>
15. GNIADKOWSKI, M., 2008. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*. [databáze] 14, 11-32. [cit. 2018-1-29] DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01854.x Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14604729>
16. HRABÁK J., 2007a. Klinicky významné [beta]-laktamázy gramnegativních bakterií: širokospektré [beta]-laktamázy (*ESBL*). *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*, Roč. 56, č. 3 ISSN: 1210-7913/103-111s.
17. HRABÁK J., et al., 2007b. Průkaz [beta]-laktamáz širokého spektra (*ESBL*) a typu AmpC u enterobakterií. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*. 16(1), [online] ISSN 1211-7358. Dostupné také z: <http://www.szu.cz/prukaz-beta-laktamaz-sirokeho-spektra-esbl-a-typu-ampc-u?highlightWords=clsi>

18. HRABÁK J., et al. 2008. Rozložení disků v metodě CLSI : [online]. *Průkaz beta-laktamáz širokého spektra (ESBL) a typu AmpC u enterobakterií*. [cit. 2018-07-20]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/prukaz-beta-laktamaz-sirokeho-spektra-esbl-a-typu-ampc-u?highlightWords=clsi> 2008
19. HRABÁK J., et al. 2009. [online]. Detekce širokospektrých β -laktamáz (ESBL), β -laktamáz AmpC, metalo- β -laktamáz (MBL) a karbapenemáz KPC u gramnegativních tyčků. [cit. 2018-07-20]. Dostupné také z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/18_2009/3_brezen/100_beta.pdf
20. JARLIER V., et al. 1988. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility pattern. *Rev Infect Dis*. [databáze] (10), p. 867-878. [cit. 2018-02-16] Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3263690>
21. JURČÍČKOVÁ, Z. 2010 *Sledování výskytu kmenů s ESBL u vybraných druhů enterobakterií v chovech skotu v ČR*. Brno. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. 29 s.
22. KLABAN, V., 2005. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 2. přeprac. vyd. Praha: Galén, ISBN 80-726-2341-9. 167 s.
23. KLIEBE C, et al. 1985. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. [databáze] 28(2):302-307 [cit. 2018-1-28]. Dostupné také z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3879659>
24. KOLÁŘ M, 2007. Klinický význam širokospektrých β -laktamáz a zkušenosti s jejich identifikací mikrobiologické praxi. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. Praha: Trios, **13**(5), 196, 198, 195 – 204s.
25. LIVERMORE D. M. 1995. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. [databáze] 8(4):557-584. [cit. 2018-1-28]. Dostupné také z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665470>
26. LIVERMORE, D. M. a WOODFORD N., 2006. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. *Trends in Microbiology*. [databáze] 14(9), 413-420. [cit. 2018-02-16] DOI: 10.1016/j.tim.2006.07.008. ISSN 0966842X. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X06001818>

27. PAPAČOVÁ M., 2010. *Využití Chi kvadrát testů na příkladech experimentálních dat s využitím Geostatistical Analyst v softwaru ArcMap*. Olomouc, Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci. 18-25 s.
28. PATERSON, D. L. a. BONOMO R. A., 2005. Extended-Spectrum Beta-Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews.*, [databáze] 18(4), 657-686. [cit. 2018-02-16] DOI: 10.1128/CMR.18.4.657-686.2005. Dostupné také z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>
29. POLENOVÁ, L., 2014. *Detekce producentů širokospektré beta – laktamázy v komunitě a v nemocnici*. České Budějovice, Bakalářská práce. Zdravotně sociální fakulta Jihočeská univerzita. 33, 32 s.
30. ROSSOLINI, G. M., D'ANDREA M.M., a. MUGNAIOLI C., 2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases: the Versatile Beta-Lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*. [databáze] 14(3), 33-41. [cit. 2018-02-16] DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01867.x. ISSN 1198743X. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14604730>
31. SMET A., et al. 2010. Broad-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiology Reviews.*, [databáze] 34(3), 295-316. [cit. 2018-02-16] DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00198. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2009.00198.x>
32. SOUGAKOFF W., et al., 1988. The TEM-3- beta-lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiology Letters*. [databáze] 56(3), 343-348. [cit. 2018-02-16] DOI: 10.1111/j.1574-6968.1988.tb03204.x. ISSN 03781097. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1988.tb03204.x>
33. TOLEMAN MA., et al., 2003. Molecular and Biochemical Characterization of OXA-45, an Extended-Spectrum Class 2d' β -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. [databáze] 47(9):2859-2863. [cit. 2018-02-16] DOI:10.1128/AAC.47.9.2859-2863.2003. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12936985>
34. VOTAVA, M., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. ISBN 80-902-8966-5. 495, 66, 64, 69, 68 s.

35. VOTAVA, M., 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, ISBN 80-868-5000-5. 246 s.

8 Seznam tabulek

Tabulka 1: Celkové porovnání všech vzorků moči k pozitivním ESBL vzorkům (vlastní zdroj).....	40
Tabulka 2: Porovnání pozitivních ESBL na odděleních nemocnice (vlastní zdroj).....	44
Tabulka 3: Srovnání vzorků podle materiálu (vlastní zdroj)	45
Tabulka 4: Porovnání se všemi vzorky a pouze pozitivními ESBL v nemocnici (vlastní zdroj).....	46
Tabulka 5: Porovnání se všemi vzorky a pouze pozitivními ESBL mimo nemocnici (vlastní zdroj).....	47
Tabulka 6: Srovnání ESBL pozitivních vzorků v komunitě a v nemocnici (vlastní zdroj)	47

9 Seznam obrázků

Obrázek 1: Beta-laktamový kruh (http://agscientific.com).....	14
Obrázek 2: Vzorec penicilinu (Votava, 2005 s. 246).....	15
Obrázek 3: Vzorec cefalosporinu (Votava, 2005 s. 246).....	16
Obrázek 4: Vzorec monobaktamu (Votava, 2005 s. 246).....	18
Obrázek 5: Vzorec karbapenemu (Votava, 2005 s. 246).....	18
Obrázek 6: Vzorec kyseliny klavulanové (Hohel I. 2015).....	19
Obrázek 7: Vzorec sulbaktamu (Hohel I. 2015).....	20
Obrázek 8: Vzorec tazobaktamu (Hohel I. 2015).....	20
Obrázek 9: Rozložení disků v metodě CLSI (Hrabák et al, 2008).....	25
Obrázek 10: DDST test s pozitivním výsledkem (Kolář, 2007 s. 196).....	26
Obrázek 11: Rozložení disků v metodě DDST (Kolář, 2007 s. 201).....	26
Obrázek 12: Klebsiella pneumoniae na ESBL půdě (vlastní zdroj).....	29
Obrázek 13: Escherichia coli na ESBL půdě (vlastní zdroj).....	29
Obrázek 14: Enterobacter na UTI plotně (vlastní zdroj).....	30
Obrázek 15: Klebsiella pneumoniae na UTI plotně (vlastní zdroj).....	30
Obrázek 16: Escherichia coli na UTI plotně (vlastní zdroj).....	31
Obrázek 17: Proteus na UTI plotně (vlastní zdroj)	31
Obrázek 18: ESBL pozitivní MAST test (www.mastgrp.com).....	33
Obrázek 19: ESBL a AmpC pozitivní MAST test (www.mastgrp.com).....	33
Obrázek 20: ESBL negativní MAST test (www.mastgrp.com).....	34
Obrázek 21: Tabulka koncentrací ATB v jamkách u setu G-I (vlastní zdroj).....	35
Obrázek 22: Naočkovaná mikrotitrační destička set G-I ESBL pozitivní (vlastní zdroj).	36
Obrázek 23: Naočkovaná mikrotitrační destička set G-I ESBL negativní (vlastní zdroj).....	36
Obrázek 24: Tabulka s koncentracemi ATB v jamkách u setu G-II (vlastní zdroj)	37

Obrázek 25: Naočkovaná mikrotitrační destička set G-II ESBL pozitivní (vlastní zdroj).....	38
Obrázek 26: Naočkovaná mikrotitrační destička G-II ESBL negativní (vlastní zdroj) .	38
Obrázek 27: Graf všech vzorků a pozitivních ESBL vzorků (vlastní zdroj)	41
Obrázek 28: Procentuální zastoupení pozitivních ESBL vzorků rodu <i>Escherichia</i> z celkového počtu vzorků (vlastní zdroj).....	41
Obrázek 29: Procentuální zastoupení pozitivních ESBL vzorků rodu <i>Klebsiella</i> z celkového počtu vzorků (vlastní zdroj)	42
Obrázek 30: Procentuální zastoupení pozitivních ESBL vzorků rodu <i>Enterobacter</i> z celkového počtu vzorků (vlastní zdroj).....	43
Obrázek 31: Procentuální zastoupení pozitivních ESBL vzorků z celkového počtu vzorků rodu <i>Proteus</i> (vlastní zdroj).....	43
Obrázek 32: Graf s porovnáním ESBL vzorků v jednotlivých odděleních nemocnice (vlastní zdroj).....	44
Obrázek 33: Graf s procentuálním zastoupením výskytu ESBL vzorků (vlastní zdroj) 45	
Obrázek 34: Graf s četností ESBL pozitivních vzorků podle druhu materiálu (vlastní zdroj).....	46
Obrázek 35: Porovnání pozitivních ESBL mezi nemocnicí a komunitou rodu <i>Escherichia</i> (vlastní zdroj).....	48
Obrázek 36: Porovnání pozitivních ESBL mezi nemocnicí a komunitou rodu <i>Klebsiella</i> (vlastní zdroj).....	48
Obrázek 37: Porovnání pozitivních ESBL vzorků mezi nemocnicí a komunitou okresu rodu <i>Enterobacter</i> (vlastní zdroj).....	49
Obrázek 38: Porovnání pozitivních ESBL vzorků mezi nemocnicí a komunitou rodu <i>Proteus</i> (vlastní zdroj).....	50
Obrázek 39: Srovnání ESBL pozitivních vzorků v nemocnici a v komunitě okresu (vlastní zdroj)	51

10 PŘÍLOHY

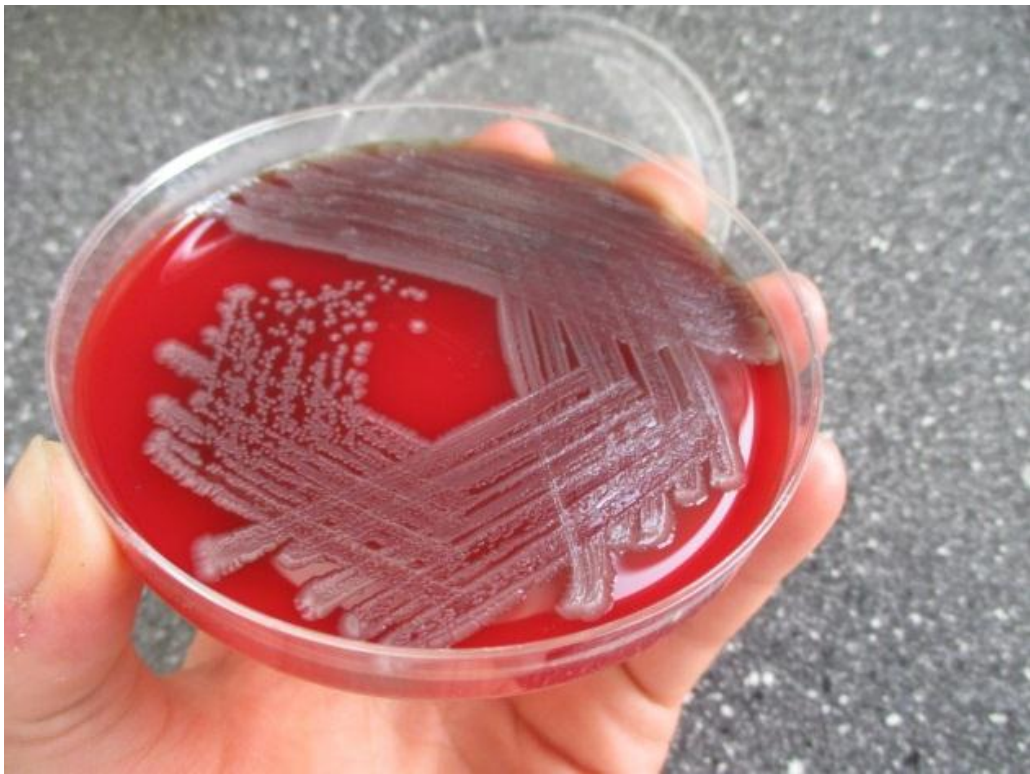
Příloha č. 1 - Rod *Enterobacter* na krevním agaru (vlastní zdroj)



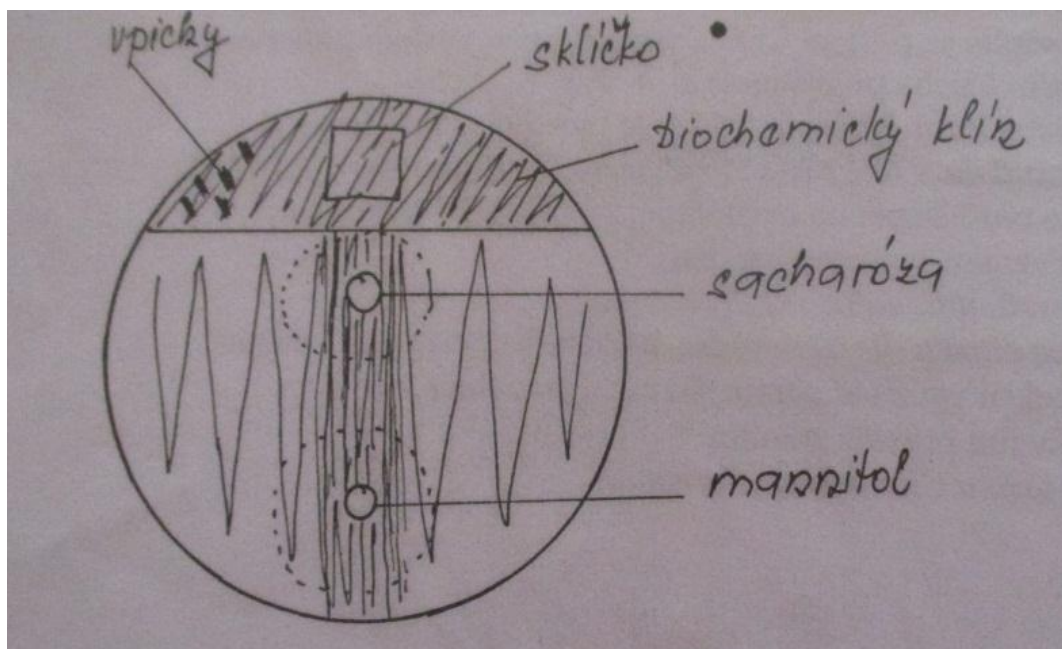
Příloha č. 2 - Rod *Klebsiella* na krevním agaru (vlastní zdroj)



Příloha č. 3 - *Escherichia coli* na krevním agaru (vlastní zdroj)



Příloha č. 4 - Správné rozočkování biochemického klínu (vlastní zdroj)



Příloha č. 5 - Rod *Enterobacter* na biochemickém klínu (vlastní zdroj)



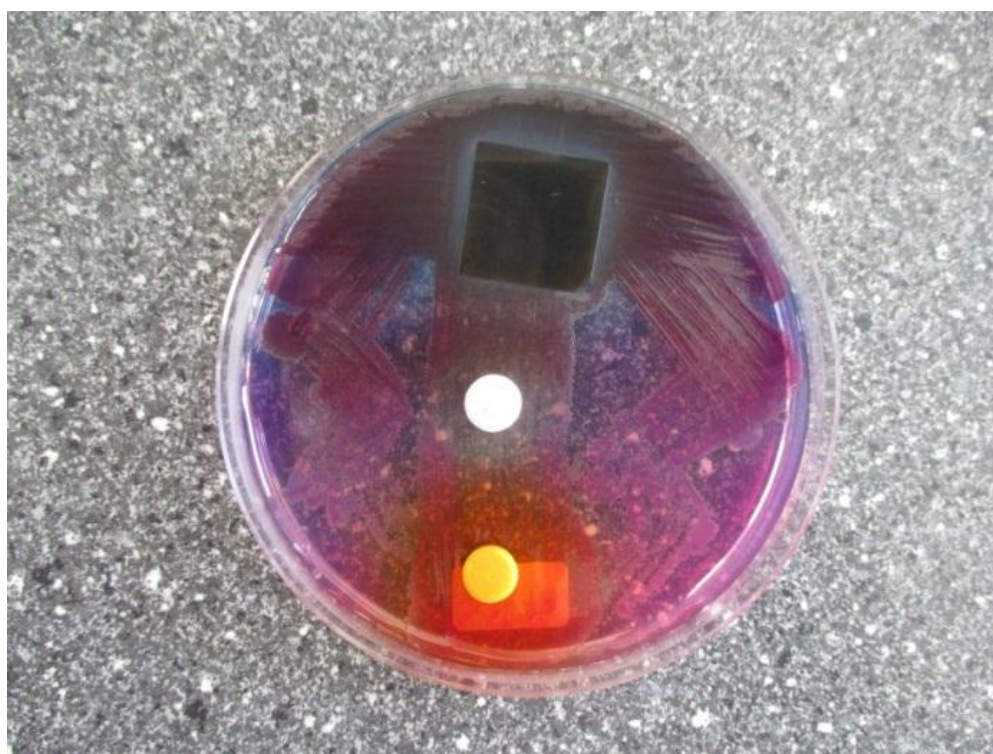
Příloha č. 6 - *Klebsiella pneumoniae* na biochemickém klínu (vlastní zdroj)



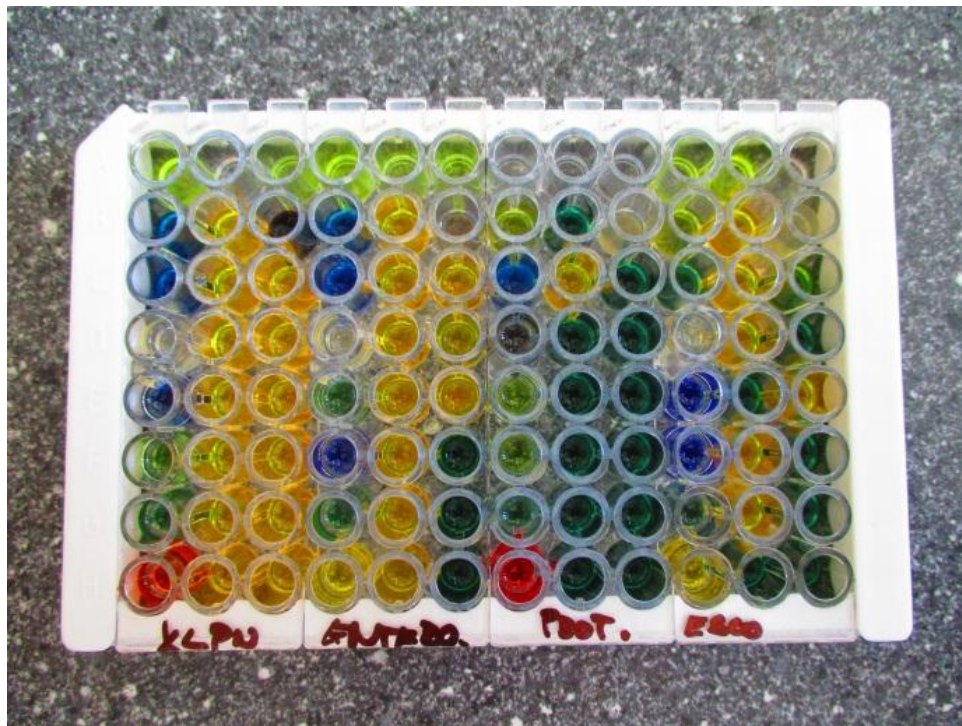
Příloha č. 7 - *Escherichia coli* na biochemickém klínu (vlastní zdroj)



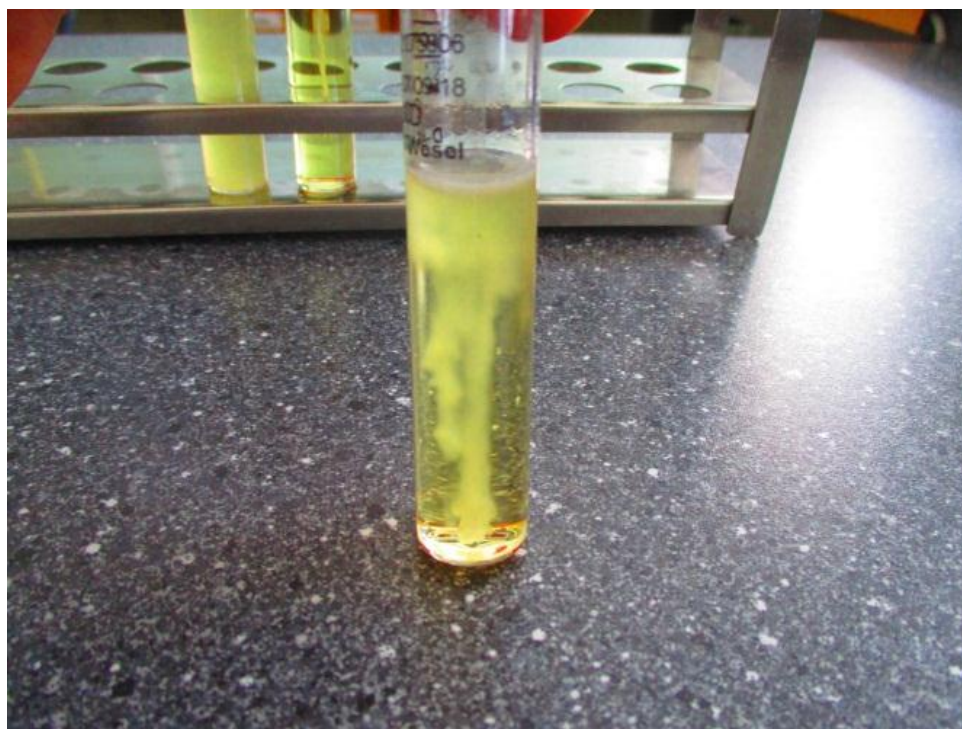
Příloha č. 8 - Rod *Proteus* na biochemickém klínu (vlastní zdroj)



Příloha č. 9 - Mikrotitrační destička s bakteriemi *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, *Proteus* a *Escherichia coli* (vlastní zdroj)



Příloha č. 10 - *Klebsiella pneumoniae* v tekuté půdě (vlastní zdroj)



Příloha č. 11 - *Proteus* v tekuté půdě (vlastní zdroj)



Příloha č. 12 - *Staphylococcus aureus* v tekuté půdě (vlastní zdroj)



11 SEZNAM ZKRATEK

ESBL - extended-spectrum beta.lactamases

ATB - antibiotika

PBP - penicillin-binding proteins

MIC – minimální inhibiční koncentrace

HAI – healthcare associated infections