

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Andrea Lálová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: B0914P360004 Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Andrea Lálová

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

**REZISTENCE K BETA-LAKTAMOVÝM ANTIBIOTIKŮM
A JEJÍ DETEKCE V KLINICKÉ PRAXI**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Chudějová, Ph.D.

PLZEŇ 2023

Na této straně se v tištěné verzi nachází zadání bakalářské práce.

Na této straně se v tištěné verzi nachází zadání bakalářské práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 30. 03. 2023

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Lállová Andrea

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Rezistence k beta-laktamovým antibiotikům a její detekce v klinické praxi

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Chudějová, Ph.D.

Počet stran – číslované: 44

Počet stran – nečíslované: 25

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 80

Klíčová slova: antibiotika, antibiotická rezistence, mechanismy rezistence, karbapenemázy

Souhrn:

Tato bakalářská práce je věnována problematice antibiotické rezistence a výskytem karbapenemáz ve Fakultní nemocnici Plzeň. V teoretické části je popsána jedna z nejpoužívanějších skupin antibiotik, kterou jsou beta-laktamová antibiotika. Dále je teoretická část věnována nejčastějším mechanismům vzniku a přenosu genů rezistence k této skupině antibiotik. Praktická část je rozdělena na dva celky. První celek se v krátkosti věnuje metodám detekce karbapenemáz na Ústavu mikrobiologie ve Fakultní nemocnici Plzeň. Druhá část se věnuje hlavnímu cíli této práce, což je statistické zpracování výskytu karbapenemáz ve Fakultní nemocnici Plzeň v letech 2019 až 2022. Statistické zpracování je graficky znázorněno.

Abstract

Surname and name: Lálová Andrea

Department: Department of Paramedic Science, Medical Diagnostics Studies and Public Health

Title of thesis: Resistance to beta-lactam antibiotics and its detection in clinical practice

Consultant: Mgr. Kateřina Chudějová, Ph.D.

Number of pages – numbered: 44

Number of pages – unnumbered: 25

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 80

Keywords: antibiotics, antibiotic resistance, resistance mechanisms, carbapenemases

Summary:

This bachelor thesis is dedicated to the problematic of antibiotic resistance and the incidence of carbapenemases in the University Hospital Pilsen. The theoretical part describes one of the most used groups of antibiotics, which are beta-lactam antibiotics. Furthermore, the theoretical part is devoted to the most common mechanisms of emergence and transmission of resistance genes to this group of antibiotics. The practical part is divided into two units. The first unit briefly discusses the methods of detection of carbapenemases at the Department of Microbiology at the University Hospital in Pilsen. The second unit is devoted to the main objective of this thesis, which is the statistical evaluation of the incidence of carbapenemases in the University Hospital Pilsen from 2019 to 2022.

Předmluva

Uvedení prvních antibiotik na trh ve 40. letech minulého století znamenalo velký pokrok k léčbě infekcí. Málokdo si ale uvědomoval, co mohou způsobit při špatném používání. Od 60. let minulého století docházelo a stále dochází k nadužívání antibiotik, což významně přispívá v rozvoji rezistence mezi mnoha bakteriálními kmeny. Tato bakalářská práce má za cíl seznámit se s nejpoužívanější skupinou antibiotik a nejčastějšími mechanismy vzniku a přenosu rezistence.

Poděkování

Děkuji Mgr. Kateřině Chudějové, Ph.D. za odborné vedení práce, poskytování cenných rad a materiálních podkladů. Dále děkuji pracovníkům Ústavu mikrobiologie za pomoc při zpracovávání praktické části. Také děkuji rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	11
SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM TABULEK	13
SEZNAM ZKRATEK	14
ÚVOD.....	16
TEORETICKÁ ČÁST.....	17
1 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE.....	17
2 BETA-LAKTAMOVÁ ANTIBIOTIKA.....	20
2.1 Peniciliny	21
2.2 Cefalosporiny	24
2.2.1 Cefalosporiny 1. generace	25
2.2.2 Cefalosporiny 2. generace	25
2.2.3 Cefalosporiny 3. generace	25
2.2.4 Cefalosporiny 4. generace	26
2.2.5 Cefalosporiny 5. generace	26
2.3 Karbapenemy	27
2.4 Monobaktamy	29
2.5 Inhibitory beta-laktamáz	30
3 ZÁKLADNÍ MECHANISMY PŘENOSU GENŮ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE..	32
3.1 Vertikální přenos genů.....	32
3.2 Horizontální přenos genů.....	32
3.2.1 Konjugace.....	33
3.2.2 Transformace	33
3.2.3 Transdukce.....	33
3.3 Nejčastější typy mobilních genetických elementů (MGE).....	34
3.3.1 Plazmidy	34
3.3.2 Transpozony	34
3.3.3 Integrony.....	34
4 NEJČASTĚJŠÍ MECHANISMY REZISTENCE K BETA-LAKTAMOVÝM ANTIBIOTIKŮM U GRAMNEGATIVNÍCH BAKTERIÍ	35
4.1 Tvorba beta-laktamáz	35
4.1.1 Širokospektré beta-laktamázy	36
4.1.2 Beta-laktamázy typu AmpC	37
4.1.3 Karbapenemázy	37
4.2 Poriny a efluxní pumpy.....	39
4.3 Modifikace cílového místa.....	40

PRAKTICKÁ ČÁST	41
5 CÍL A ÚKOLY PRÁCE	41
5.1 Hlavní cíl.....	41
5.2 Dílčí cíle.....	41
6 VÝZKUMNÉ OTÁZKY	42
7 METODY DETEKCE KARBAPENEMÁZ VE FN PLZEŇ	43
7.1 Screening biologického materiálu a vyhledávání suspektních izolátů na základě citlivosti.....	43
7.2 Detekce hydrolýzy meropenemu pomocí MALDI-TOF (MS).....	44
7.3 Určení fenotypu za využití inhibitorů.....	45
7.4 Molekulárně-genetické metody	49
8 METODIKA PRÁCE	50
8.1 Statistické zpracování výskytu karbapenemáz ve FN Plzeň v letech 2019-2022. 50	
9 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	51
DISKUZE	57
1) <i>Zvyšoval se výskyt karbapenemáz ve sledovaném období?</i>	58
2) <i>Měnilo se ve sledovaném období spektrum detekovaných karbapenemáz? ..</i>	58
3) <i>Převažovaly detekované případy na odděleních intenzivní péče (KARIM, ARO, JIP) a odděleních s imunokompromitovanými pacienty?</i>	58
ZÁVĚR.....	59
SEZNAM LITERATURY	60
SEZNAM PŘÍLOH	68
PŘÍLOHY	69
Příloha A – Povolení sběru informací ve FN Plzeň	69

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Počty karbapenemáz v období 2019-2022	51
Graf 2 Počty detekovaných typů karbapenemáz za jednotlivé roky.....	52
Graf 3 Počty vyšetřovaných bakteriálních kmenů za jednotlivé roky	53
Graf 4 Počty biologických materiálů, které byly zaslány za jednotlivé roky	54
Graf 5 Znázornění jednotlivých oddělení a v jakém počtu zasílaly biologické materiály .	55
Graf 6 Znázornění počtu pohlaví za jednotlivé roky	56

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schéma programu One Health.....	18
Obrázek 2 Schéma nejčastějších úmrtí za rok v dnešní době ve srovnání s odhadovaným počtem úmrtí díky AMR v roce 2050.....	19
Obrázek 3 Obecný strukturní vzorec penicilinů.....	22
Obrázek 4 Obecný strukturní vzorec cefalosporinů.....	24
Obrázek 5 Obecný strukturní vzorec karbapenemů.....	28
Obrázek 6 Znázornění hydroxyethylu ve strukturním vzorci karbapenemů.....	28
Obrázek 7 Strukturní vzorec aztreonamu.....	30
Obrázek 8 Rozdíl mezi vertikálním a horizontálním přenosem genů.....	33
Obrázek 9 Příklad hmotnostních spekter při měření hydrolýzy meropenemu na MALDI-TOF MS	45
Obrázek 10 Schéma rozložení pro určení fenotypu karbapenemázu produkujícího izolátu	46
Obrázek 11 <i>E. coli</i> produkující karbapenemázu KPC	47
Obrázek 12 <i>K. variicola</i> produkující karbapenemázu NDM	47
Obrázek 13 <i>K. pneumoniae</i> produkující karbapenemázu OXA-48-like	48
Obrázek 14 <i>P. aeruginosa</i> produkující karbapenemázu typu VIM	48
Obrázek 15 <i>P. aeruginosa</i> produkující karbapenemázu IMP	49

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Klasifikace beta-laktamových antibiotik	21
Tabulka 2 Breakpointy a epidemiologické mezní hodnoty (ECOFF) pro screening karbapenemázu produkujících enterobakterií.....	43

SEZNAM ZKRATEK

AMR	Antimikrobiální rezistence
ARGs	Geny antibiotické rezistence
ARO	Anesteziologicko-resuscitační oddělení
ATB	Antibiotikum
CDC	Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí
DHP	Dehydropeptidáza
EDTA.....	Kyselina ethylendiamintetraoctová
ESBL.....	Širokospektré betalaktamázy
EU	Evropská unie
EUCAST	Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti
FN	Fakultní nemocnice
HGT	Horizontální přenos genů
HOO.....	Hemato-onkologické oddělení
IMP	Karbapenemáza typu IMP (<i>Imipenemase enzymes</i>)
JIP	Jednotka intenzivní péče
IZ.....	Inhibiční zóna
KARIM	Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny
KPC.....	Karbapenemáza typu KPC (<i>Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase</i>)
LIS	Laboratorní informační systém
MBL.....	Metallo-beta-laktamáza
MGE.....	Mobilní genetické elementy

MIC.....	Minimální inhibiční koncentrace
MS.....	Hmotnostní spektrometrie
MRSA	Methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NDM	Karbapenemáza typu NDM (<i>New Delhi Metallo-beta-lactamase</i>)
OMPs	Proteiny vnější membrány
OSN	Organizace spojených národů
OXA.....	Karbapenemáza typu OXA (<i>oxacillinase</i>)
PBPs.....	Penicilin vázající proteiny
VGT	Vertikální přenos genů
VIM.....	Karbapenemáza typu VIM (<i>Verona Integron-encoded Metallo-beta-lactamase</i>)
WHO.....	Světová zdravotnická organizace

ÚVOD

Antibiotika jsou látky využívané pro léčbu bakteriálních infekcí, neboť poškozují nebo ničí bakterie. Jsou to látky přírodního původu a přirozená rezistence k nim existovala dávno před objevem jejich léčebného účinku. Užíváním antibiotik se ale přispívá k získané rezistenci – bakterie si určitými mechanismy vytvořily rezistenci až po vystavení antibiotikům. Právě tato získaná rezistence souvisí se stále pokračujícím nadužíváním antibiotik.

Antibiotická rezistence se stává stále větším problémem. Zaznamenána byla ještě před oficiálním uvedením penicilinu do klinické praxe, ale po uvedení penicilinu a dalších antibiotik byla spousta infekcí úspěšně vyléčena. Postupně se bohužel antibiotika začala nadužívat, což významně přispívalo a stále přispívá k vývoji rezistence. Rezistenci k antibiotikům se přibližně před třiceti lety začaly zabývat Světová zdravotnická organizace a Organizace spojených národů. Od 90. let se šíření rezistence nezastavilo, a tak v roce 2014 Světová zdravotnická organizace zařadila rezistenci mezi hlavní problémy.

Teoretická část této práce se zabývá seznámením se s beta-laktamovými antibiotiky, které patří mezi nejpoužívanější antibiotika. Patří mezi ně penicilin, který byl vůbec prvním objeveným antibiotikem. V další části jsou probrány cesty přenosu genů pro antibiotickou rezistenci a nejčastější mechanismy rezistence u beta-laktamových antibiotik.

Praktická část je zaměřená na detekci rezistence k beta-laktamovým antibiotikům a hlavní část tvoří statistické zpracování výskytu karbapenemáz ve Fakultní nemocnici v Plzni. Karbapenemázy jsou ve zkratce významné enzymy zapříčiňující rezistenci k antibiotikům, jejichž výskyt způsobuje velký problém v léčbě, neboť na bakterie produkující tyto enzymy zatím neexistují účinná antibiotika.

TEORETICKÁ ČÁST

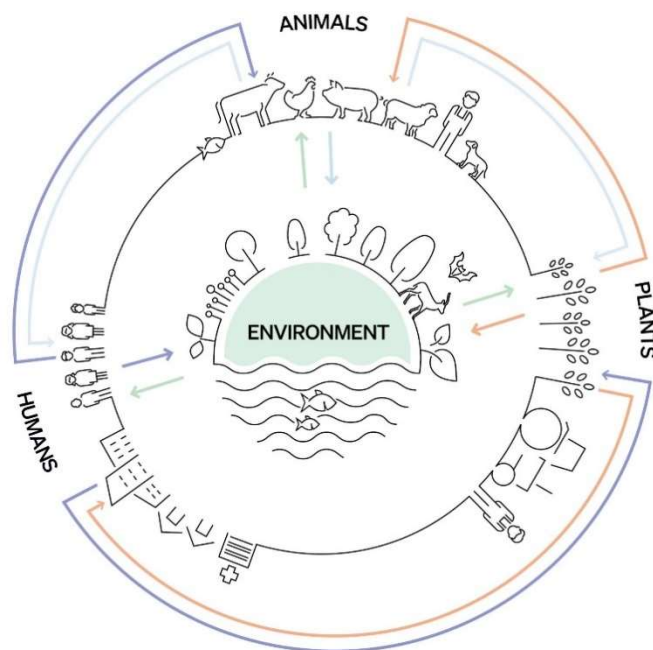
1 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE

Antibiotická rezistence provází léčbu antibiotiky již od jejich objevení ve 40. letech minulého století. První rezistence na antibiotika byla zaznamenána v roce 1940, tedy ještě před tím, než byl do klinické praxe zaveden první penicilin. Už od 60. let docházelo k nadužívání antibiotik, i na léčbu nemocí, které nebyly bakteriálního původu. A právě špatné užívání a jejich nadměrná preskripce vede k šíření rezistence. Problém nadměrného užívání antibiotik je celosvětovou záležitostí, v České republice od 80. let. Na konci 90. let minulého století se antibiotická rezistence začala řešit na zasedáních mezinárodních organizací, jako je Světová zdravotnická organizace (WHO) a Organizace spojených národů (OSN) (1; 2). V současné době Česká republika patří mezi evropské státy, kde je vysoký výskyt multirezistentních kmenů, což omezuje možnosti účinné léčby (3).

Pro správné pochopení problému antibiotické rezistence je důležité zmínit, že antibiotická rezistence nevznikla s prvním antibiotikem. Antibiotika jsou látky původně přírodního původu a bakterie si v přítomnosti těchto látek vytvořily mechanismy, jak tyto látky “překonat”. Naším problémem je zejména tzv. “získaná” rezistence, tj. rezistence, která vznikla u kmene původně citlivého na danou látku. Získaná rezistence vzniká mutací bakteriálních genů, nebo v důsledku získání vnějších genetických determinantů rezistence (např. od rezistentních patogenů přítomných v životním prostředí) (4).

Antibiotika se po metabolizaci v těle pacienta/užívajícího dostávají exkrecí do životního prostředí, a to hlavně do odpadních vod. Do vody se antibiotika dostávají nejen z nemocnic, ale také z farem a z farmaceutických firem, dále v menším měřítku pak z domácností a z lidských odpadů. Některé patogeny neodstraní ani dobře fungující čistírna odpadních vod (5; 6). Tím, že se antibiotika dostávají do životního prostředí, kde je na ně vyvíjen selekční tlak, se podporuje přenos velkého množství genů antibiotické rezistence (ARGs, *antibiotic resistance genes*) u kmenů způsobujících onemocnění (7). Kromě přenosu vodou je nebezpečné i podávání antibiotik zvířatům určeným na porážku. Právě potravinový řetězec lze považovat za hlavní cestu přenosu rezistentních bakterií mezi zvířecí a lidskou populací. Například v některých krmivech pro skot se používají antibiotika jako stimulátor růstu, což poté přispívá k rozvoji rezistence vůči antibiotikům u lidí (8). V Evropské unii (EU) je zakázáno používat antibiotika v krmivech od roku 2003 (9).

Tuto souvislost s rezistentními patogeny v životním prostředí propaguje program “One Health“ z Centra pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*) založeného v roce 2009. Mezi hlavní zájmy programu One Health patří připravenost na pandemie, nouzové situace v rozhraní člověk-zvíře-životní prostředí (kam spadá antimikrobiální rezistence) a celosvětový dohled nad respiračními chorobami v rámci One-Health programu (**Obrázek 1**) (10).

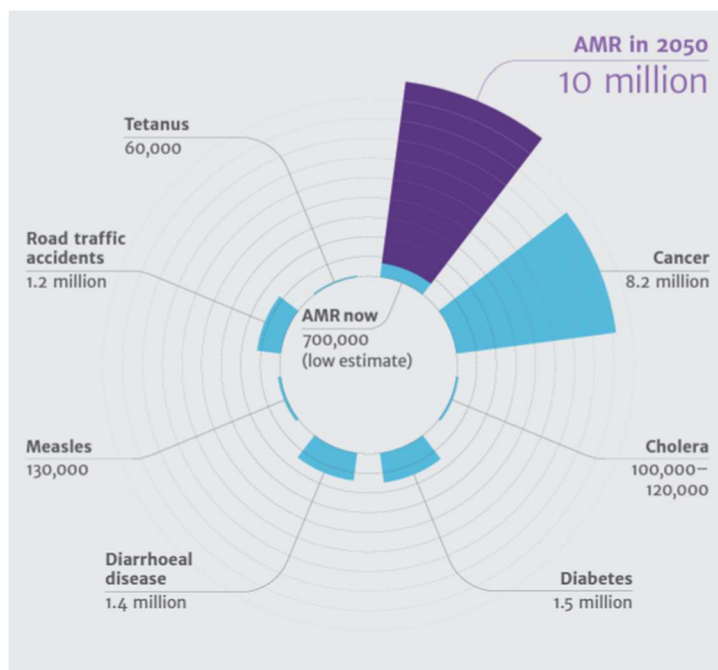


Obrázek 1 Schéma programu One Health

Zdroj: (11)

Za zvyšování rezistence na antibiotika jsou samozřejmě nejvíce zodpovědní lidé. Spoustu pacientů si antibiotika vyžádá u svého praktického lékaře, nebo je předepíše sám lékař „pro jistotu“. Antibiotika se také mnohdy předepisují na virové infekce, aniž by se ověřilo, že se skutečně jedná o virovou infekci, a ne o infekci bakteriální. Dle výzkumu z roku 2021 od agentury Engage Hill a REMMARK žádalo o antibiotika 40 % dotazovaných, většina byli mladí lidé ve věku 16-24 let. Z těchto 40 % respondentů uvedlo 20 % z nich, že antibiotika přestanou užívat, pokud se začnou cítit lépe. Mimo to přibližně 30 % ze všech respondentů výzkumu uvedlo, že antibiotika zabíjí viry (11). Mimo ordinace praktických lékařů se rezistence rozvíjí i v nemocnicích. Na léčbu nozokomiálních infekcí se často zbytečně používají širokospektrá antibiotika, místo antibiotik volby, které by účinkovaly přesněji na původce infekce (12). Z průzkumu antimikrobiální rezistence (AMR, *antimicrobial resistance*), který zpracoval britský ekonom Jim O’Neill v roce 2014,

vyplývá, že při pokračování v současném nadužívání antibiotik se už v roce 2050 dostaneme do tzv. “postantibiotické éry”, kdy bude AMR nejčastější příčinou úmrtí a budou smrtelné i dnes běžné infekce. Na **Obrázku 2** je ukázáno, že v dnešní době má AMR ročně 700 000 obětí. Je to nízký odhad, neboť v některých zemích neexistují přesná data o AMR (13).



Obrázek 2 Schéma nejčastějších úmrtí za rok v dnešní době ve srovnání s odhadovaným počtem úmrtí díky AMR v roce 2050

Zdroj: (13)

Antibiotická rezistence je momentálně jednou z priorit EU. Jen v EU se ročně vyskytne zhruba 670 000 infekcí způsobených bakteriemi rezistentními vůči antibiotikům, z toho zhruba 33 000 případů končí smrtí v přímém důsledku těchto infekcí. Je proto třeba dbát na prevenci a kontrolu antibiotické rezistence. Díky probíhajícímu surveillance se dají sledovat trendy, ale i v rámci EU se surveillance může lišit dle času nebo země, neboť systém surveillance není zcela stejný ve všech státech EU (6). WHO v roce 2014 antibiotickou rezistenci zařadila mezi tři nejvýznamnější hrozby pro veřejné zdraví 21. století (14).

Surveillance nicméně poskytuje zásadní informace, které lze využít k řešení výzev, jež AMR představuje, a pomáhá organizacím veřejného zdraví a zúčastněným stranám v Evropě i na celém světě pokračovat v boji proti AMR – v boji, který si nemůžeme dovolit prohrát (6).

2 BETA-LAKTAMOVÁ ANTIBIOTIKA

Beta-laktamová antibiotika mají svou zásadní roli v léčbě infekcí, neboť jsou nejpoužívanějšími antibiotiky dnešní doby. Nejsou toxické, protože působí pouze na bakteriální stěnu, kterou lidské buňky nemají (15).

Společným znakem beta-laktamů je čtyřčlenný beta-laktamový kruh, obsahující tři uhlíky a jeden dusík. Jednotlivá antibiotika se od sebe liší substituenty vázanými na tuto strukturu. V současné době rozlišujeme pět základních tříd beta-laktamových antibiotik: peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktamy a inhibitory beta-laktamáz (**Tabulka 1**) (16).

Beta-laktamy inhibují tvorbu buněčné stěny bakterií. Účinek těchto antibiotik spočívá v navázání na enzymy, které bakteriální buňka potřebuje pro tvorbu buněčné stěny (transpeptidázy, karboxypeptidázy a další enzymy). Transpeptidázy katalyzují poslední krok syntézy peptidoglykanu. Díky tomu, že beta-laktamová antibiotika inhibují katalytickou aktivitu transpeptidáz, nazývají se tyto enzymy penicilin vázající proteiny (*penicillin-binding proteins*, PBPs). Pokud dojde k reakci beta-laktamového antibiotika s PBPs, vznikne silná vazba, která způsobí ireverzibilní poškození buňky, což vede k inhibici tvorby buněčné stěny a zároveň uvolnění autolytických enzymů, které způsobí lýzu buňky. Účinek beta-laktamových antibiotik je tedy baktericidní. Jejich antimikrobiální účinek byl objeven právě na základě podobnosti D-Alanin-D-Alanin s amidem a karboxylátem (17; 18).

I přesto, že jsou netoxické, mohou mít nežádoucí účinky. Nežádoucí účinky jsou většinou nespecifické, jako například zvracení, průjem, nauzea, nebo flebitida při intravenózním podání. Poměrně častým nežádoucím účinkem je také alergie, která může představovat pro pacienty i značné zdravotní riziko, neboť příznaky se pohybují od mírné vyrážky až po závažné laryngospasmy a bronchospasmy (19).

Beta-laktamová antibiotika se z velké části vylučují ledvinami, kde se uplatňuje glomerulární filtrace a tubulární exkrece. Biologický poločas je různý, pohybuje se od třiceti minut do osmi hodin. Příkladem beta-laktamu s krátkým poločasem je penicilin a příkladem preparátu s dlouhým poločasem je například ceftriaxon, který se vylučuje žlučí. V organismu se metabolizují jen některé beta-laktamy. Díky tomu, že se rychle vylučují močí, mají krátký nebo žádný postantibiotický efekt, což znamená, že hladina účinné látky trvá jen krátce

po podání a je potřeba brát antibiotika v kratších intervalech, například po šesti až osmi hodinách (16).

Tabulka 1 Klasifikace beta-laktamových antibiotik

Peniciliny	Základní peniciliny	penicilin G (benzyl penicilin), penicilin V (fenoxymetylpenicilin)
	Protistafylokokové peniciliny	oxacilin
	Širokospektré peniciliny	aminopeniciliny (amoxicilin, ampicilin)
		ureidopeniciliny (piperacilin)
Cefalosporiny	I. generace	cefalotin, cefazolin, cefalexin
	II. generace	cerufoxim
	III. generace	cefotaxim, ceftriaxon, ceftazidim
	IV. generace	cefepim
	V. generace	ceftarolin, ceftobiprol, cefiderocol
Karbapenemy	imipenem, meropenem, doripenem, ertapenem	
Monobaktamy	aztreonam	
Inhibitory beta-laktamáz	kyseliny klavulanová, sulbaktam, tazobaktam, relebactam, vaborbactam, avibactam	

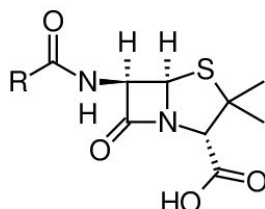
Zdroj: (19), upraveno

2.1 Peniciliny

Peniciliny jsou nejstaršími a nejznámějšími antibiotiky. Jedná se o původně přírodní látku objevenou již v roce 1928 skotským lékařem Alexandrem Flemिंगem, ale v terapii byla úspěšně použita až v roce 1941. Později v 50. letech minulého století byla také zavedena jeho chemická syntéza (16). Peniciliny se používají jako lék první volby pro svou dobrou účinnost a nízkou toxicitu. První peniciliny byly ale nestabilní v kyselém prostředí a měly úzké spektrum účinku. Na rozdíl od dnešní doby tehdy účinkovaly i na zlatého stafylokoka,

který v současnosti v 90 % tvoří enzym penicilinázu, který peniciliny rozkládá (20; 21). Peniciliny jsou obecně dobře účinné na grampozitivní bakterie, a z gramnegativních bakterií působí např. na *Neisseria meningitidis* nebo *Neisseria gonorrhoeae*. Jejich účinek je baktericidní (19). Peniciliny zůstávají lékem volby u mnoha mírných lokalizovaných infekcí měkkých tkání, nebo se stále používají v těhotenství, i přesto, že výskyt rezistentních bakteriálních kmenů omezil jejich užitečnost (22).

Jedná se o antibiotikum, které má na svém beta-laktamovém kruhu navázaný thiazolidinový kruh obsahující síru (**Obrázek 3**). Substitucí postranních řetězců vznikly různé peniciliny, které se liší spektrem účinku. Kromě spektra účinku se liší také stabilitou vůči nízkému pH a beta-laktamázám (20).



Obrázek 3 Obecný strukturní vzorec penicilinů

Zdroj: (23)

Podle spektra účinku se dělí na základní peniciliny, peniciliny odolné vůči penicilináze, aminopeniciliny, a protipseudomonádové peniciliny. Toto dělení ještě můžeme rozšířit o skupinu penicilinů v kombinaci s inhibitory beta-laktamázy (16; 22).

Základní peniciliny tvoří skupinu látek, které vznikly odvozením z přirozených antibiotik. Řadíme mezi ně peniciliny G, F, K a X, ale pro léčebné využití se používá **penicilin G** (benzylpenicilin), který se podává intravenózně. Dále do této skupiny řadíme podskupinu penicilinů s prodlouženým účinkem. Účinek těchto antibiotik spočívá v tom, že úpravou struktury penicilinu, konkrétně spojením penicilinu s nosičem, se účinná látka uvolňuje postupně. Do této skupiny patří **prokain-penicilin** a **benzatin-penicilin**. Další podskupinou jsou peniciliny pro orální podání. Působí na některé gramnegativní koky a grampozitivní koky i tyčinky. Používají se pro léčbu závažných infekcí způsobených například streptokoky a klostridiami, pro léčbu pneumokokových infekcí nebo meningokokových meningitid (24). Řadíme zde **penicilin V**, který je odolný vůči nízkému pH. Proto v žaludeční šťávě zůstává stabilní a může se tedy podávat i perorálně. Díky tomu patří mezi nejvíce předepisovaná antibiotika. Kromě jeho odolnosti v nízkém pH je totožný

s penicilinem G. Klasicky se používá pro léčbu například tonzilofaryngitid vyvolaných kmeny *Streptococcus pyogenes* (19; 16).

Další skupinou jsou **peniciliny odolné vůči stafylokokové penicilináze**. Stafylokoky, konkrétně *Staphylococcus aureus*, byly původně citlivé k penicilinu. Jejich vývojem se ale krátce po zavedení penicilinu vytvořila rezistence na základě tvorby penicilinázy (beta-laktamázy patřící do třídy A). Peniciliny v této podskupině také vznikly úpravou postranního řetězce. Oproti základním penicilinům jsou méně účinné, ale odolávají beta-laktamázám. V České republice se z této skupiny používá **oxacilin**, **kloxacilin** a **flukloxacilin**. Používají se pro léčbu stafylokokových infekcí (19; 16).

Aminopeniciliny, nebo také **peniciliny s rozšířeným spektrem**, jsou další samostatnou skupinou. Jak již název napovídá, vznikly připojením aminoskupiny do postranního řetězce penicilinu G. Díky tomu se spektrum rozšířilo o účinek na gramnegativní bakterie (kromě pseudomonád). Co se týče účinku na grampozitivní bakterie, mají podobné spektrum jako penicilin. Působí na bakterie, které neprodukují beta-laktamázy (21). Hlavními zástupci jsou **ampicilin** a **amoxicilin**. Ampicilin je indikován pro léčbu meningitidy, sepsí a epiglotitid způsobených kmeny *Haemophilus influenzae* neprodukujícími beta-laktamázu. Amoxicilin je na tom velmi podobně, ale má lepší farmakokinetické vlastnosti – podává se v delších intervalech. Podává se zejména perorálně pro léčbu komunitních respiračních infekcí (otitida, sinusitida) nebo komunitních pneumonií (19; 16).

Protipseudomonádové peniciliny vznikly další modifikací postranních řetězců, a proto se jejich spektrum účinku rozšířilo o účinek na pseudomonády. Tato skupina se dále dělí na karboxypeniciliny a acylureidopeniciliny. V České republice se používá zástupce acylureidopenicilinů **piperacilin**. Používá se v kombinaci s aminoglykosidy pro léčbu infekcí vyvolaných *Pseudomonas aeruginosa* (19; 16).

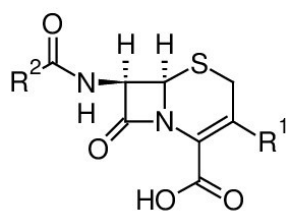
Poslední skupinou jsou **nezařazené peniciliny**. Patří sem antibiotika odvozená od penicilinu a nezařazují se do žádné z uvedených skupin. Jsou to látky s úzkým spektrem účinku a jsou zaměřené na enterobakterie. Jelikož nebyly tak dobré jako cefalosporiny 3. a 4. generace, postupně mizely, ale protože disponují velmi dobrou odolností vůči častým beta-laktamázám, začínají se znovu objevovat na trhu (16).

2.2 Cefalosporiny

Cefalosporiny jsou spolu s peniciliny nejvíce předepisovanými antibiotiky. Byly objeveny krátce po penicilinu, avšak oproti penicilinu neměly takový úspěch, neboť nebyly tolik účinné na tehdy nejčastější patogeny; stafylokoky, streptokoky a pneumokoky. Až na konci 50. let minulého století se rozšířil jejich výzkum, protože se zjistilo, že cefalosporinové jádro lépe přijímá substituce. Díky tomu se začaly vyvíjet semisyntetická antibiotika. Působí jako ostatní beta-laktamy, a to tak, že zpomalují tvorbu buněčné stěny a tím působí baktericidně. Od jejich objevení a uvedení na trh se vyrobilo spousta cefalosporinových antibiotik, v České republice se jich registrováno konkrétně třináct (16).

Cefalosporiny mají poměrně široké spektrum účinku i malou toxicitu, avšak ta je vyšší než u penicilinů. Většinou nevykazují nežádoucí účinky. Pokud se nežádoucí účinky vyskytnou, bývají většinou nespecifické a mírné. S používáním cefalosporinů vyšších generací může být spojeno riziko rozvoje klostridiové kolitidy. Tyto antibiotika mohou také v některých případech působit jako induktory beta-laktamáz, což způsobuje rychlejší rozšíření rezistentních kmenů při jejich dlouhodobém podávání (19).

Základní molekulu cefalosporinových antibiotik tvoří kyselina 7-aminocefalosporanová, která obsahuje beta-laktamový kruh spojený s šestičlenným dihydrothiazinovým kruhem. K této struktuře se připojují další postranní řetězce, konkrétně se substituují na řetězce R1 a R2 (**Obrázek 4**), což zajišťuje velkou možnost přípravy dalších antibiotik (25).



Obrázek 4 Obecný strukturní vzorec cefalosporinů

Zdroj: (23)

Podle svých antimikrobiálních vlastností se cefalosporinová antibiotika dělí do čtyř až pěti generací. Dělí se podle spektra účinku proti gramnegativním a grampozitivním bakteriím a odolnosti vůči beta-laktamázám (26).

2.2.1 Cefalosporiny 1. generace

Jsou účinné proti grampozitivním bakteriím. Používají se k léčbě infekcí způsobených *Streptococcus pneumoniae*, který je zodpovědný za většinu případů komunitní pneumonie, a také proti *Staphylococcus aureus* (27). Původně účinkovaly i na gramnegativní bakterie (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), ale díky narůstající rezistenci už není účinek na tyto kmeny klinicky významný. Tato antibiotika disponují odolností vůči stafylokokové penicilináze (beta-laktamáza namířena proti penicilinům), ale proti beta-laktamázám gramnegativních bakterií odolné nejsou. Jsou snadno hydrolyzovány širokospektrými beta-laktamázami. Enterokoky jsou k cefalosporinům přirozeně rezistentní, protože jejich PBPs mají nízkou afinitu k cefalosporinům (26; 16).

Cefalosporiny první generace, které se užívají perorálně, se používají pro léčbu nekomplikovaných infekcí kůže a měkkých tkání (způsobených obvykle stafylokoky nebo streptokoky). Mohou se také použít pro léčbu kostních infekcí (26).

Do této generace cefalosporinů řadíme **cefalotin**, **cefazolin** a **cefadroxil**. První dvě antibiotika se podávají nitrožilně, cefadroxil orálně. Cefalotin a cefazolin mají podobný účinek, oba se používají jako profylaxe v chirurgii nebo jako náhrada za penicilin při respiračních infekcích. Cefalotin není registrován v ČR (26; 19). Cefadroxil se indikuje pro léčbu infekcí orofaryngu způsobených streptokoky, nebo pro léčbu infekcí kůže a měkkých tkání nebo močových cest (16).

2.2.2 Cefalosporiny 2. generace

Tyto cefalosporiny mají podobný účinek jako první generace, ale jsou navíc účinné i proti některým gramnegativním patogenům, jako je například *E. coli*, *K. pneumoniae* a *H. influenzae* (producent beta-laktamázy) (3). Jsou stabilní vůči základním beta-laktamázám, ale stejně jako první generace mohou být snadno hydrolyzovány širokospektrými beta-laktamázami (16).

Mezi cefalosporiny 2. generace patří **cerufoxim**. Podávat se může orálně i nitrožilně pro léčbu například lymeské boreliózy (26).

2.2.3 Cefalosporiny 3. generace

V porovnání s cefalosporiny druhé generace mají cefalosporiny třetí generace zesílený účinek na gramnegativní bakterie a vysokou odolnost proti základním beta-laktamázám. Naopak mají slabší účinek na grampozitivní bakterie, zejména

na stafylokoky. I tato generace je snadno hydrolyzována širokospektrými beta-laktamázi. Mají účinek na kmeny, které jsou rezistentní k cefalosporinům první a druhé generace (16). Používají se k léčbě infekcí neznámého původu nebo jako profylaxe. Také se podávají pacientům alergickým na penicilin. Díky jejich lepšímu průniku do mozkomíšního moku se upřednostňují pro léčbu infekcí centrálního nervového systému, například meningitidy (27).

Protože cefalosporiny třetí generace disponují rozdílnou farmakokinetikou, rozdělují se do dalších podskupin na základní cefalosporiny 3. generace, protipseudomonádové cefalosporiny a cefalosporiny kombinované s inhibitory beta-laktamáz. **Základní cefalosporiny 3. generace** působí na gramnegativní patogeny, ale nemají žádný účinek proti pseudomonádám. V gramnegativních patogenech dobře pronikají poriny v buněčné stěně. **Cefotaxim** a **ceftriaxon** dobře prostupují hematoencefalickou bariérou a účinně působí proti bakteriím v mozkomíšním moku (26). Další podskupina, **protipseudomonádové cefalosporiny**, působí stejně na gramnegativní patogeny jako předchozí podskupina, ale jak název napovídá, působí proti kmenům *P. aeruginosa*. Díky tomu, že se účinek rozšířil na tento kmen, snížil se účinek proti grampozitivním patogenům. Proti *P. aeruginosa* je spolehlivý **ceftazidim** (27). Poslední podskupinou jsou **cefalosporiny kombinované s inhibitory beta-laktamáz**. Jedná se o kombinaci cefalosporinů se sulbaktamem nebo tazobaktamem. Tato kombinace účinkuje na většinu producentů beta-laktamáz třídy A, ale na širokospektré beta-laktamázy a karbapenemázy není spolehlivě účinná (16).

2.2.4 Cefalosporiny 4. generace

Spektrum účinku této generace je z dosud zmíněných nejširší. Účinkují na gramnegativní bakterie podobně jako třetí generace a na grampozitivní účinkují podobně jako generace první. Mimo jiné účinkují i na beta-laktamázu typu AmpC. Toho bylo docíleno změnou v postranním řetězci jejich struktury. Díky tomu mohou cefalosporiny lépe procházet buněčnou stěnou a zároveň mají nízkou afinitu k beta-laktámázám (27).

Mezi cefalosporiny čtvrté generace patří **cefepim**, podávaný intravenózně pro léčbu závažných systémových infekcí. Může pronikat do mozkomíšního moku a má lepší pronikavost membránou gramnegativních bakterií (26).

2.2.5 Cefalosporiny 5. generace

Tato generace se také může označovat jako cefalosporiny účinné proti multirezistentním bakteriím (27). Mají vyšší afinitu k PBPs, díky čemuž jsou účinné proti

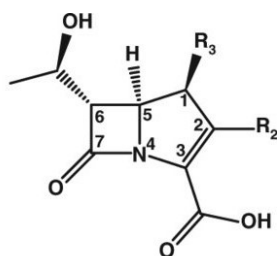
významným patogenům. Měly by se používat jen v případech, kdy na obtížně léčitelné infekce neúčinkují běžná antibiotika (25).

Ceftarolin je širokospektré antibiotikum účinné proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, ale oproti ostatním cefalosporinům jeho spektrum účinku pokrývá i MRSA (methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*) (26). Nejnovějšími zástupci jsou **cefiderocol** a **ceftobiprol**, které jsou účinné proti multirezistentním kmenům *P. aeruginosa* způsobujícím zejména nemocniční infekce. Díky jejich podobnosti s ceftazidimem a cefepimem odolávají hydrolýze beta-laktamázi (28). V České republice zatím nejsou registrována a dostupná jsou pouze na zvláštní dovoz.

2.3 Karbapenemy

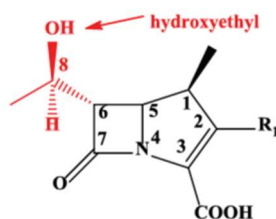
Tato antibiotika jsou jednou z nejdůležitějších tříd beta-laktamů a jsou považována za velmi účinné látky s širokým spektrem účinku v porovnání s ostatními beta-laktamovými antibiotiky. Jsou odolné proti hydrolýze většinou beta-laktamázi, včetně širokospektrých beta-laktamázi. Hydrolyzovány mohou být pouze tzv. karbapenemázami. V některých případech mohou působit jako inhibitory beta-laktamázi. Jsou účinné proti řadě gramnegativních a grampozitivních patogenů (15). Karbapenemy byly objeveny v 70. letech minulého století a v roce 1985 byl zaregistrován první přípravek, imipenem. Po něm následovaly další, poslední doripenem byl registrován v roce 2007 (16).

Základ struktury karbapenemů tvoří beta-laktamový kruh spojený s dihydropyrolovým jádrem. Díky hydroxyetylovému postrannímu řetězci (**Obrázek 5**) jsou karbapenemy odolné vůči hydrolýze beta-laktamázi. K tomu přispívá i trans-konfigurace uhlíků na páté a šesté pozici (**Obrázek 6**). Mimo to je důležitý i jejich uhlík v první pozici. Bylo zjištěno, že přispívá k účinnosti karbapenemů a jejich stabilitě vůči beta-laktamázi. Jejich mechanismus účinku spočívá v inhibici PBPů. U *E. coli* a *P. aeruginosa* inhibují konkrétně PBP2 a PBP4. Inhibice PBPů se liší podle jednotlivých přípravků. Špatně prostupují přes buněčnou stěnu. Obecně buněčnou stěnou prostupují díky proteinům vnější membrány (*outer membrane proteins*, OMPs), poriny. Po průchodu poriny periplasmatickým prostorem karbapenemy acylují a inhibují PBPů. Mají určitou výhodu v tom, že se vážou na více rozdílných PBPů (29; 16).



Obrázek 5 Obecný strukturní vzorec karbapenemů

Zdroj: (30)



Obrázek 6 Znázornění hydroxyethylu ve strukturním vzorci karbapenemů

Zdroj: (29)

Karbapenemy se špatně vstřebávají z gastrointestinálního traktu, podávají se proto intravenózně. Jako ostatní beta-laktamy se vylučují převážně ledvinami. Byla ale u nich popsána nefrotoxicita a neurotoxicita a je proto třeba řádně zvážit jejich podání (31; 29).

Používají se jako antibiotika poslední volby, nebo pokud pacient s infekcí jinak vážně onemocní, nebo má infekci způsobenou rezistentními bakteriemi. Karbapenemy jsou určeny k léčbě závažných infekcí způsobených bakteriemi tvořící širokospektré beta-laktamázy nebo AmpC beta-laktamázy, nebo při podezření na infekci způsobenou více mikroby, kdy antibiotikum musí účinkovat na široké spektrum patogenů. Tato antibiotika by se měla používat pouze jako poslední volba, neboť po nich už žádné záložní nebo lepší neexistují. Bohužel se ale někde používají na jednotkách intenzivní péče jako běžný přípravek pro léčbu nozokomiálních infekcí, jejichž původci jsou multirezistentní kmeny (29; 16).

Při léčbě karbapenemy se mohou dostavit nežádoucí účinky, které jsou většinou nespecifické. Například bolesti hlavy, nauzea, zvracení, průjem nebo flebitida v místě aplikace. Mimo těchto příznaků se může laboratorně odhalit mírné zvýšení jaterních enzymů, trombocytóza a eozinofilie nebo neutropenie (16).

Jako první byl z této skupiny do praxe zaveden **imipenem**. Zajímavostí tohoto antibiotika je rychlost rozkladu jeho molekuly v lidském organismu. Rozkládá ho enzym

vyskytující se v ledvinách, dehydropeptidáza (DHP). Aby se imipenem mohl léčebně využít, je potřeba k němu přidat cilastatin, inhibitor DHP, v poměru 1:1 (16). Přidání DHP inhibitoru předchází nefrotoxicitě, která byla pozorována, když byl imipenem podán samostatně (32). Jejich spektrum účinku je široké a je rozšířeno o gramnegativní nefermentující tyčinky. Hlavní indikace pro tato antibiotika jsou těžké nozokomiální infekce (19).

Jako další byl zaveden **meropenem**, který má stejné spektrum účinku jako již zmíněný imipenem, ale je účinnější na gramnegativní bakterie a anaeroby. Od imipenemu se odlišuje zlepšenou stabilitou v lidském organismu a není potřeba k němu přidávat inhibitory DHP. Meropenem se od imipenemu strukturně liší pyrrolidinovým substituentem, který je považován za důvod jeho účinnosti proti gramnegativním bakteriím, včetně *P. aeruginosa* (32). Považuje se za nejúčinnější antibiotikum pro léčbu infekcí vyvolaných multirezistentními enterobakteriemi a pro léčbu závažných nozokomiálních infekcí (19).

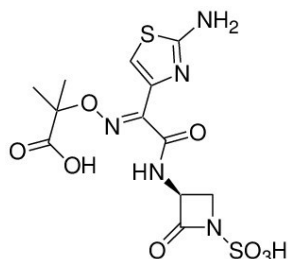
Ertapenem disponuje větší molekulou, neboť má na postranních řetězcích navázané dvě karboxylové skupiny. Díky tomu má toto antibiotikum delší biologický poločas, ale na úkor toho hůře prochází buněčnými stěnami (32). Proto nejde použít na pseudomonády a acinetobaktery. Toto antibiotikum má také široké spektrum účinku. Pro svůj dlouhý biologický poločas, který umožňuje dávkování jednou denně, se používá v ambulantní péči pro léčbu komunitních infekcí. Může se použít pro léčbu nitrobršních a akutních komunitních infekcí.

Poslední z této skupiny, **doripenem**, má spektrum účinku stejné jako imipenem a meropenem, ale velmi dobře působí proti nefermentujícím tyčinkám. Jedná se o nejúčinnější antibiotikum proti nefermentujícím tyčinkám. Jeho molekula je asi nejstabilnější ze všech karbapenemů a je odolná vůči běžným beta-laktamázám. V České republice ale nikdy nebyl uveden na trh a v rámci EU byl v roce 2014 z trhu stažen (16).

2.4 Monobaktamy

Monobaktamy jsou jediné beta-laktamy, které nemají beta-laktamový kruh navázaný na jinou kruhovou strukturu. Byly vyvinuty v 80. letech minulého století a jsou to nejmladší beta-laktamová antibiotika (16).

Jako jediný ze skupiny monobaktamů se používá **aztreonam** (Obrázek 7). Toto antibiotikum se silně váže na PBP3 a slaběji na PBP1a, čímž způsobí filamentaci a následný rozpad bakterie (33). Je odolné vůči hydrolýze beta-laktamázi třídy B a základním beta-laktamázi třídy A a D, ale mimo ESBL (širokospektré beta-laktamázy). To je způsobeno jeho methylovým substituentem na uhlíku v 2. pozici beta-laktamového kruhu (15).



Obrázek 7 Strukturní vzorec aztreonamu

Zdroj: (34)

Díky tomu, že je odolné vůči velkému počtu beta-laktamáz, používá se jako rezervní antibiotikum proti multirezistentním gramnegativním bakteriím (19). Jelikož působí pouze na gramnegativní bakterie, používá se i pro léčbu dalších infekcí, ale v kombinaci s jinými antibiotiky, např. vankomycinem nebo klindamycinem (16).

Působí dobře proti gramnegativním aerobním bakteriím, včetně *P. aeruginosa*, ale špatně proti gramnegativním bakteriím. Nevstřebává se gastrointestinálním traktem, neboť není substrátem transpeptidů ve střevní stěně. Podává se intramuskulárně, tento způsob podání zajistí až 100% biologickou dostupnost. Většina se vyloučí močí v nezměněné formě, malá část zmetabolizuje a vyloučí se jako neaktivní metabolit (15).

Při podání aztreonamu nebyly pozorovány alergické reakce u pacientů s alergií na peniciliny nebo cefalosporiny (15).

2.5 Inhibitory beta-laktamáz

Inhibitory beta-laktamáz jsou látky s beta-laktamovým kruhem. Svou strukturou jsou podobné penicilinům, a právě s nimi se tyto inhibitory kombinují. Kromě penicilinů se kombinují také s cefalosporiny. Jejich účinek spočívá v inhibici funkce beta-laktamáz, enzymů rozkládajících beta-laktamová antibiotika (19; 16). Používají se v kombinaci s citlivými beta-laktamovými antibiotiky a představují hlavní strategii boje proti rezistenci

k antibiotikům, způsobenou beta-laktamázi (18). První inhibitory beta-laktamázy můžeme najít i pod označením „sebevražedné inhibitory“ kvůli svému mechanismu účinku. Inhibitory totiž vniknou do aktivního centra beta-laktamázy, kde se rozštěpí, ale zůstávají v aktivním centru a dál působí (35).

Byly vyvinuty v 70. letech minulého století. Jedná se o **kyselinu klavulanovou**, **sulbaktam** a **tazobaktam**. S dalším vývojem se do dnešní doby podařilo vyvinout další; například **avibaktam**, **relebaktam** a **kyselinu boronovou**, nově také **vaborbaktam** (16).

3 ZÁKLADNÍ MECHANISMY PŘENOSU GENŮ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE

Antibiotická rezistence je podmíněna přenosem genetických informací mezi bakteriemi. Rozlišují se dva základní způsoby přenosu – vertikální a horizontální přenos (Obrázek 8).

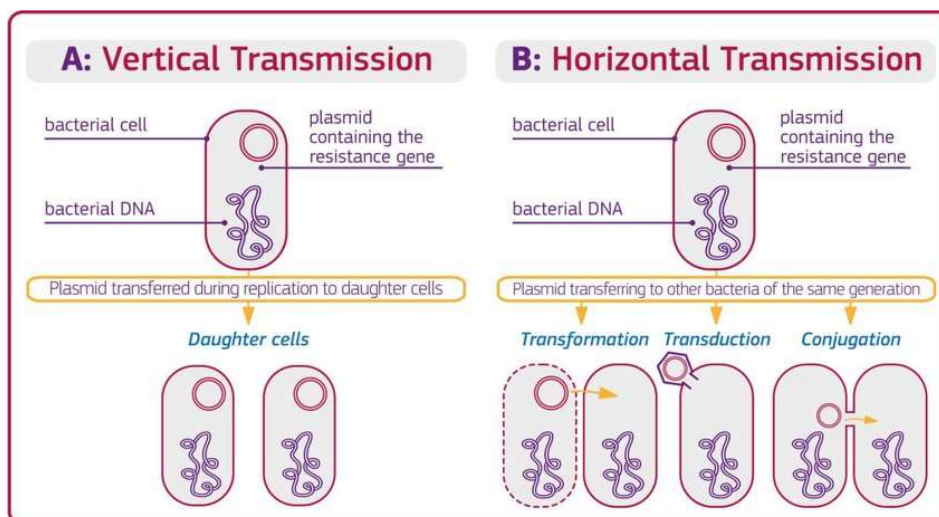
3.1 Vertikální přenos genů

Vertikální (klonální) přenos genů (VGT, *vertical gene transfer*) probíhá v rámci buněčného dělení, při kterém se genetická informace mateřské buňky kopíruje do dceřiných buněk. VGT je označení také pro buněčný růst (36; 37).

3.2 Horizontální přenos genů

Horizontální (HGT, *horizontal gene transfer*) umožňuje šíření genů, jak mezi bakteriemi stejného druhu, tak mezi různými druhy. Jedná se o sdílení genetické informace mezi organismy, které nejsou ve vztahu rodič-potomek. Horizontálním přenosem se vyměňují geny nebo celé genové úseky. Díky HGT mohou rychle vznikat velmi různorodé genomy, které zajišťují bakteriím větší adaptabilitu včetně rezistence na antibiotika a toxiny. Výměna genů probíhá nejčastěji přenosem plazmidů, nebo vkládáním kratších genomových oblastí (genových kazet, transpozonů a dalších), nebo se jedná jen o výměnu jednotlivých genů (38; 39; 40). Horizontální přenos genů zajišťují tzv. mobilní genetické elementy (MGE). Jedná se o genetické prvky, které přispívají k vnitrobuněčné mobilitě DNA. Mezi hlavní typy MGE patří plazmidy, transpozony, genové kazety a integrony (41). HGT je považován za jednu z hlavních cest šíření genů rezistence, a to nejen k antibiotikům (37).

Rozlišují se tři základní mechanismy horizontálního přenosu genů – konjugace, transformace a transdukce (38; 39; 40).



Obrázek 8 Rozdíl mezi vertikálním a horizontálním přenosem genů

Zdroj: (42)

3.2.1 Konjugace

Konjugace je nejčastějším mechanismem HGT. Jedná se o přenesení genetického materiálu přímým kontaktem, kdy slouží jedna buňka jako dárce genetického materiálu (donor) a druhá jako jeho příjemce (recipient). Bakterie se spojí pomocí tzv. F-faktoru (také sex-pili), který zprostředkovává tvorbu trubicovité struktury zvané konjugační pilus, která se nachází v buněčné membráně. Pilus k sobě bakterie „přitáhne“ pro předání genetického materiálu. Nejčastěji přenášeným genetickým materiálem při konjugaci je plazmid, který velmi často nese geny rezistence (38; 39; 40; 43).

3.2.2 Transformace

Transformace je považována za jeden z jednodušších typů HGT. Jedná se o mechanismus, při kterém bakterie získává část DNA přímo z okolního prostředí (4; 44). Pro získání DNA není potřeba živé buňky, bakterie může DNA získat například z uhynulé bakterie (např. v odpadních vodách), přičemž se nemusí jednat o bakterie stejného druhu (16). Ale jen málo bakterií je schopno transformace a na základě ní vyvinout klinickou rezistenci (4; 44).

3.2.3 Transdukce

Při transdukcii bakteriofág (virus, který infikuje bakterie) přenáší genetický materiál z jedné buňky do druhé. Bakteriofágy využívají bakterie jako hostitele pro tvorbu dalších virů. Rozlišujeme dva typy transdukce, generalizovanou a specifickou. Generalizovaná transdukce je proces, při kterém bakteriofág může převzít jakoukoli část genomu hostitele.

Specializovaná transdukce znamená, že bakteriofágy přebírají pouze specifické části DNA hostitele. Zajímavostí je, že tento proces využívají vědci pro vnášení požadovaných genů do buněk (38; 39).

3.3 Nejčastější typy mobilních genetických elementů (MGE)

3.3.1 Plazmidy

Plazmidy jsou extrachromozomální kruhové struktury DNA schopné samostatné replikace a jsou důležitým prostředkem pro rychlou adaptaci bakteriálních populací na měnící se podmínky prostředí. Genetická variabilita vytvářená nosičstvím plazmidů v populacích zajišťuje odolnost vůči změnám prostředí a hrají důležitou roli při mobilizaci a šíření genů rezistence k antibiotikům (45). Plazmidy kromě toho obsahují geny pro svou replikaci nebo přenos, ale neobsahují geny pro základní životní funkce buňky. Plazmidy se mohou přenášet jak vertikálně, tak horizontálně – nejčastěji konjugací (46).

3.3.2 Transpozony

Transpozony (také označovány jako skákající geny) dělíme do dvou kategorií, inzerční sekvence a kompozitní transpozony. **Inzerční sekvence** jsou malé MGE nesoucí obvykle jeden nebo dva geny kódující transposázu, enzym, který vystřihne úsek DNA a přemístí ho na jiné místo (41; 47). **Kompozitní transpozony** obsahují genové sekvence kódující proteiny, které kódují rezistenci k jednomu nebo více antibiotikům (46). Geny pro rezistenci se na kompozitních transpozonech nachází v jejich centrální části a jsou ohraničeny inzerčními sekvencemi (48).

3.3.3 Integrony

Integrony jsou struktury schopné získávat a přeskupovat otevřené čtecí rámce obsažené v genových kazetách a přeměňovat je na funkční geny tím, že se starají o jejich správnou expresi. Integrony můžeme dělit do dvou skupin na **mobilní integrony**, které mají menší počet kazet a obvykle kódují antibiotickou rezistenci, a na **superintegrony**, které mají kazet více a jsou uloženy na chromozomech. Mobilní integrony byly izolovány z proteobakterií (rod *Escherichia*, *Salmonella* a další) ze sladké vody a dnes již víme, že hrají důležitou roli v distribuci rezistence vůči antibiotikům a jsou jednou z příčin multirezistence u gramnegativních bakterií (49; 50).

4 NEJČASTĚJŠÍ MECHANISMY REZISTENCE K BETA-LAKTAMOVÝM ANTIBIOTIKŮM U GRAMNEGATIVNÍCH BAKTERIÍ

4.1 Tvorba beta-laktamáz

Tvorba beta-laktamáz je nejrozšířenějším mechanismem vzniku a rozvoje rezistence k beta-laktamovým antibiotikům (51). Jedná se o enzymy (hydrolázy), které katalyzují hydrolýzu amidové vazby v beta-laktamovém kruhu beta-laktamů (52). Beta-laktamázy byly objeveny v podstatě ve stejné době jako první penicilin. Od té doby jich bylo identifikováno už velké množství, které neustále narůstá. Momentálně je v databázi beta-laktamáz přes 4300 subtypů těchto enzymů (18).

Beta-laktamázy mají společný prekurzorový protein se strukturními prvky PBPs. PBPs i beta-laktamázy obsahují serin, který tvoří kovalentní komplex s molekulou antibiotika (s acylenzymem). Tím dochází k přerušení již zmíněné amidové vazby v beta-laktamovém kruhu. Následně se vytváří se ireverzibilní komplex antibiotika a PBPs, což vede k inhibici funkce enzymu (52). Díky této podobnosti s PBPs fungují beta-laktamázy jako „falešný“ substrát pro beta-laktamy (18).

Existuje několik typů klasifikací beta-laktamáz. Například funkční dělení (dle Bush-Jacoby), které enzymy klasifikuje do tří skupin podle jejich substrátových a inhibičních profilů. Toto dělení se používalo dříve, ale dnes se využívá komplexnější dělení dle Amblera. Dělení dle Amblera (molekulární dělení) dělí enzymy dle jejich proteinové sekvence na 4 skupiny (A, B, C, D). Skupiny A, C, D jsou označovány jako tzv. serinové beta-laktamázy, jelikož mají ve svém aktivním místě serin. Naopak skupina B neboli metalo-beta-laktamázy, mají ve svém aktivním místě zinek (18; 51; 53).

Skupina A se také nazývá serinové penicilinázy. Zahrnuje největší počet enzymů, které jsou nejrozšířenější a patří mezi intenzivně studované. Enzymy v této skupině mají velmi široké spektrum aktivity, jejich substráty jsou peniciliny, cefalosporiny (i širokospektré) ale i karbapenemy (54). Tato skupina enzymů je citlivá na dostupné inhibitory beta-laktamáz (např. klavulonát), s výjimkou karbapenemázy typu **KPC**. Dalšími významnými zástupci jsou například penicilinázy **PC1**, které způsobují rezistenci k penicilinu u *S. aureus*, dále beta-laktamáza typu **TEM**, která byla první objevenou

beta-laktamázu lokalizovanou na plazmidu a je nejčastěji detekována u enterobakterií (16; 55), dále beta-laktamáza **SHV** nebo celosvětově rozšířená beta-laktamáza **CTX-M** s širokým hydrolytickým účinkem na beta-laktamová ATB s výjimkou karbapenemů (56; 18; 57).

Skupina B neboli metalo-beta-laktamázy (MBL) zahrnuje enzymy, jejichž substrátem je většina beta-laktamových antibiotik včetně karbapenemů. Enzymy v této skupině nejsou příbuzné PBPs a vykazují širokospektrou aktivitu. Nejsou inhibovány inhibitory beta-laktamáz, ale chelatačními činidly jako je kyselina dipikolinová nebo kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (54; 58). Skupina B se dělí na podskupiny B1, B2 a B3, přičemž nejčastěji detekovanou podskupinou je B1 (18). MBL mohou být lokalizovány na chromozomu, ale častěji se objevují na plazmidech nebo jiných MGE. Nejznámějšími zástupci této skupiny jsou karbapenemázy typu **IMP**, **VIM** nebo **NDM**, které hydrolyzují všechna beta-laktamová antibiotika s výjimkou aztreonamu (59; 54; 18).

Skupinu C můžeme označit také jako cefalosporinázy, neboť substrátem enzymů této skupiny jsou kromě penicilinů také cefalosporiny. Enzymy této skupiny se často vyskytují na chromozomech gramnegativních bakterií, ale už se začínají více vyskytovat i na MGE, konkrétně plazmidech. Do této skupiny patří beta-laktamázy typu **AmpC** (60; 61).

Poslední skupinou beta-laktamáz je **skupina D**, nazývaná také oxacilinázy. Substrátem této skupiny enzymů jsou peniciliny a kloxacilin. Výraznými zástupci z této skupiny jsou enzymy podskupiny **OXA**, o kterých je nejméně informací ze všech beta-laktamáz. Tyto enzymy kromě cefalosporinů a penicilinů rozkládají hraničně i karbapenemy. Vyskytují se na chromozomech, ale rozšiřují se na plazmidy (18; 57; 53).

4.1.1 Širokospektré beta-laktamázy

Širokospektré beta-laktamázy (*extended spectrum beta-lactamase*, ESBL) jsou nejčastěji zástupci skupin A a D. Jedná se o enzymy, které účinně hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny s úzkým i širokým spektrem, a monobaktamy. Naopak ale nemohou rozkládat karbapenemy a inhibitory beta-laktamáz. Od prvního objevení ESBL jich bylo popsáno více než 200 druhů a představují významné riziko pro veřejné zdraví a hospitalizované pacienty. Mezi nejvýznamnější a nejrozšířenější zástupce beta-laktamáz typu ESBL patří skupina **CTX-M** (nejčastěji CTX-M-13 a CTX-M-15), která je nejčastěji detekována u enterobakterií a šíří se chromozomálně i pomocí plazmidů. Dalším významným zástupcem je např. skupina

TEM – nejčastěji TEM-1 detekovaná kromě enterobakterií také u kmenů *Haemophilus influenzae* nebo *Neisseria gonorrhoeae* (55; 57).

4.1.2 Beta-laktamázy typu AmpC

Jejich název je odvozen od jejich schopnosti rozkládat ampicilin a zároveň patří do skupiny C (17). Tyto enzymy hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny první až třetí generace a monobaktamy, karbapenemy zůstávají zachovány. Jejich geny jsou většinou lokalizovány na chromozomu, ale už není výjimkou, že jsou přenášeny i plazmidy (18). Mezi nejčastější podtypy AmpC patří beta-laktamázy **CMY**, **DHA**, **MIR** nebo **ACC** (62).

4.1.3 Karbapenemázy

Karbapenemázy náleží do skupin beta-laktamáz A, B a D. Jsou kódovány jak chromozomálními, tak plazmidovými geny. Jedná se o hlavní mechanismus rezistence ke karbapenemům. Jsou to enzymy s nejširším beta-laktamázovým spektrem – hydrolyzují všechny beta-laktamy včetně karbapenemů. Nejčastěji jsou produkovány různými enterobakteriemi (zejména *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* komplex a další), ale vyskytující se také ve stále větší míře u pseudomonád a acinetobakterů (63). V současné době je alarmující zvýšený výskyt karbapenemáz například u kmenů *Acinetobacter baumannii*, které se běžně vyskytují v životním prostředí a v nemocnicích, kde způsobují nozokomiální infekce a velmi ohrožují oslabené jedince a pacienty na jednotkách intenzivní péče (64; 65). Důvodem jejich zvyšujícího se výskytu je používání karbapenemů při léčbě závažných infekcí způsobených ESBL bakteriemi. Geny kódující karbapenemázy se často vyskytují na různých MGE (zejména plazmidech) a mají tak potenciál se šířit celosvětově. V současné době jsou nejčastějšími a nejsledovanějšími typy karbapenemáz subtypy **KPC**, **OXA-48-like group**, **VIM**, **NDM** a **IMP** (63).

4.1.3.1 Serinové karbapenemázy skupiny A

Karbapenemázy podtypu KPC (*Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase*) jsou nejčastějšími karbapenemázami skupiny A. Rozkládají kromě karbapenemů také peniciliny, cefalosporiny a monobaktamy. Geny pro KPC se ve většině případů šíří pomocí plazmidů schopných samostatné konjugace. Na plazmidu jsou geny pro KPC nejčastěji lokalizovány na transpozonu *Tn4401*, který se šíří celosvětově. Geny pro KPC se nejčastěji vyskytují u kmenů *K. pneumoniae*, pro které je typická schopnost hromadit a přenášet determinanty rezistence. Další kmeny, u kterých se v dnešní době KPC vyskytují, jsou nejen různé enterobakterie, ale i nefermentující tyčinky – většinou *P. aeruginosa*

nebo *A. baumannii* komplex. První enzym, KPC-1, byl poprvé izolován v roce 1996 v Americe u *K. pneumoniae* (odtud název enzymu), později byly identifikovány typy KPC-2 a KPC-3, které se začaly rozšiřovat i na další enterobakterie. Během několika let se rozšířily do celého světa – byly izolovány na Středním východě, v Řecku, Itálii a Číně, kde jsou dnes považovány za endemické. V současné době je popsáno 153 různých variant KPC (63; 66; 67).

4.1.3.2 *Metallo-beta-laktamázy (skupina B)*

Epidemiologicky nejvýznamnějším zástupcem karbapenemáz skupiny B je typ **NDM** (*New Delhi Metallo-beta-lactamase*). Enzymy této skupiny hydrolyzují všechny beta-laktamy s výjimkou aztreonamu. Typ NDM-1 byl poprvé izolován ve Švédsku v roce 2007 u pacienta repatriovaného z Indie z Nového Dillí, který byl postižen infekcí způsobenou *K. pneumoniae* rezistentní ke karbapenemům. Přibližně od roku 2010 se díky turistům a cestovatelům typ NDM-1 rozšířil do všech evropských zemí a Spojených států, i přesto ale Indie zůstává největším ohniskem výskytu. Další významné ohnisko se nachází na Balkáně a v severní Africe. Geny pro NDM se nejvíce vyskytují u enterobakterií (zejména *K. pneumoniae*, *E. coli*) a dále také u *P. aeruginosa*, u kmenů *A. baumannii* komplex poměrně málo. Geny pro NDM nesou nejčastěji plazmidy, konkrétně například typ *IncX3*. Celosvětové rozšíření karbapenemáz typu NDM je jedním z nejvíce znepokojivých případů rezistence. V současné době je známo 48 podtypů NDM (63; 68; 69; 67)

Karbapenemázy typu **VIM** (*Verona Integron-encoded Metallo-beta-lactamase*), jsou dalším zástupcem skupiny B. Poprvé byl enzym typu VIM, VIM-1, izolován z *P. aeruginosa* v Itálii v roce 1997 ve Veroně, a poté VIM-2 ve Francii. Kromě těchto zemí byly postupem času zaznamenány v Americe, Brazílii, ve Spojených arabských emirátech, nebo Libanonu. Enzymy typu VIM se sice vyskytují i u dalších enterobakterií, ale výskyt u *P. aeruginosa* zůstává nejčastější. Hydrolyzují všechny beta-laktamy včetně karbapenemů, ale s výjimkou monobaktamů (aztreonamu). Geny pro enzymy typu VIM jsou uloženy na integronech, které mohou být začleněny do plazmidů nebo chromozomů. Plazmidy nesoucí geny pro VIM u enterobakterií patří nejčastěji do skupiny *IncA/C* nebo *IncN*. V současné době je známo 83 typů VIM enzymů, přičemž se dělí do 3 základních skupin VIM-1-like, VIM-2-like a VIM-7-like (63; 69; 67).

Karbapenemázy typu **IMP** (*IMiPenemase enzymes*), patřící také do skupiny B, hydrolyzují všechny beta-laktamy včetně karbapenemů, ale s výjimkou monobaktamů

(aztreonamu). Podtyp IMP-1, byl poprvé popsán v roce 1991 u kmene *P. aeruginosa* v Japonsku, kdy vykazoval rezistenci k imipenemu. Gen pro tento enzym je nejčastěji lokalizován na plazmidech schopných konjugace, často jako součást integronu. Japonsko a jihovýchodní Asie dodnes zůstává největším ohniskem výskytu IMP-1. Tento enzym byl o pár let později detekován v Itálii u *A. baumannii* komplex jako první záchyt enzymu IMP v Evropě. Později byly popsány IMP-2 a IMP-5 v Itálii a Portugalsku, dále IMP-4 v Americe a IMP-1 a IMP-2 na Středním východě nebo IMP-7 v Austrálii. Tento přehled je důkazem, že výskyt IMP není limitován. V současné době je známo 98 typů enzymu IMP (63; 67).

4.1.3.3 *Serínové karbapenemázy skupiny D*

Karbapenemázy typu **OXA-48-like** patřící do skupiny D jsou nejčastěji detekovány zejména u enterobakterií, u nefermentujících tyčinek poměrně vzácně. Plně rozkládají peniciliny a cefalosporiny, hydrolyza karbapenemových antibiotik je často hraniční a může snadno uniknout pozornosti. Geny pro enzymy OXA-48-like přenáší nejčastěji plazmidy typu *IncL/M*. Enzym OXA-48-like byl poprvé detekován u izolátu *K. pneumoniae* v Turecku v roce 2001. Kromě Turecka, kde se jejich producenti vyskytují endemicky, byly zaznamenávány do roku 2020 poměrně vzácné (68). Enterobakterie nesoucí geny pro OXA-48-like mohou zároveň vytvářet geny kódující ESBL nebo AmpC, což zvyšuje jejich rezistenci k aztreonamu, cefalosporinům s rozšířeným spektrem a hlavně ke karbapenemům. Jejich detekce je ale obtížná a zatím chybí spolehlivé fenotypové testy pro jejich rozlišení (63; 68; 70).

4.2 Poriny a efluxní pumpy

Spousta antibiotik, užívaných v klinické praxi, má za cíl proniknutí do bakterie přes cytoplazmatickou membránu gramnegativních bakterií. Aby antibiotika nemohla přes membránu projít tak snadno, vytvořily si bakterie obranné mechanismy, jak tomu zabránit. Gramnegativní bakterie si vyvinuly mechanismus, jak ovlivnit propustnost membrány ovlivněním funkce porinů nebo efluxních pump, čímž jsou ovlivněny mj. také beta-laktamová antibiotika (4).

Poriny se nachází ve vnější membráně všech gramnegativních bakterií spolu s lipopolysacharidy a fosfolipidy. Díky tomuto složení funguje membrána jako účinná bariéra před řadou látek (71). Poriny se skládají ze 3 částí, které tvoří trubicovitou strukturu a prostupuje všemi membránami, které gramnegativní buňka má (72). Poriny umožňují pasivní průnik hydrofilních molekul a podílejí se na výměně živin a iontů. Na rozdíl

od jiných antibiotik, mají beta-laktamová antibiotika poměrně malou molekulu, a tak využívají poriny pro vstup do buňky. Bakteriální buňky vytváří různé druhy porinů a vstup antibiotik mohou regulovat tím, že sníží jejich počet, propustnost, nebo je dočasně přestanou tvořit (73).

Efluxní pumpy patří mezi tzv. transmembránové pumpy, které dokáží vyčerpávat z buňky nežádoucí látky, v tomto případě antibiotika. Jsou uspořádané jako struktura procházející buněčným obalem a zajišťují komunikaci mezi cytoplazmou a vnějším prostředím. Nežádoucí látky vyčerpávají proti koncentračnímu gradientu, a proto je tento proces pro buňku energeticky náročný. Efluxní pumpy nemusí být specifické pro jedno antibiotikum, dokáží vyčerpávat širokou škálu těchto látek. Díky tomu mohou přispívat k multirezistenci. Snižují intracelulární hladinu antibiotika a na to navazují další mechanismy, které zvýší rezistenci (72; 16). Geny kódující efluxní pumpy mohou být přenášeny různými typy MGE nebo mohou být na chromozomech bakterie. Chromozomové geny pak objasňují vrozenou rezistenci, nebo sníženou citlivost některých bakteriálních druhů k určitému ATB (4).

Efluxní pumpy se dělí do 5 typů. ABC (*ATP-binding cassette superfamily*), MATE (*multidrug and toxic compound extrusion family*), MFS (*major facilitator superfamily*). SMR (*small multidrug resistance family*) a typ RND (*resistance nodulation division superfamily*), který vyčerpává z bakterií např. beta-laktamy. Jednotlivé typy se od sebe liší strukturou, zdrojem energie, substráty, které jsou schopny vyčerpávat z buňky a typem bakteriálních organismů, u kterých se nachází. Zdrojem energie pro RND je vodíkový gradient. Je také zodpovědný např. za multirezistenci u pseudomonád. Geny kódující efluxní pumpy typu RND se často vyskytují na chromozomech a určují stupeň rezistence vůči několika antibiotikům (4; 16).

4.3 Modifikace cílového místa

Modifikace cílového místa je další mechanismus, jakým se rozvíjí rezistence. Tento mechanismus spočívá v mutaci cílové struktury antibiotika. Mutace se může projevit změnou produkci nebo afinitou proteinů vázajících penicilin, PBPs. Každá bakterie vlastní různé PBPs a každé antibiotikum má specifické cílové místo (74; 75). PBPs jsou kódovány geny, z nichž například gen *mecA* kóduje PBP2a, který disponuje nízkou afinitou ke všem beta-laktamům včetně karbapenemů. Gen *mecA* obvykle nesou MGE. Změna afinity PBPs byla vzácně pozorována u *E. coli*, *P. aeruginosa* a *A. baumannii* komplex (76).

PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

5.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo statistické zpracování výskytu karbapenemáz ve Fakultní nemocnici (FN) Plzeň v letech 2019 až 2022.

5.2 Dílčí cíle

1. Seznámit se s problematikou karbapenemáz.
2. Seznámit se s diagnostickými metodami pro detekci karbapenemáz.
3. Statistické zpracování výskytu karbapenemáz ve Fakultní nemocnici Plzeň v letech 2019 až 2022.

6 VÝZKUMNÉ OTÁZKY

Pro tuto bakalářskou práci byly stanoveny následující výzkumné otázky.

Výzkumná otázka 1: Zvyšoval se výskyt karbapenemáz ve sledovaném období?

Výzkumná otázka 2: Měnilo se ve sledovaném období spektrum detekovaných karbapenemáz?

Výzkumná otázka 3: Převažovaly detekované případy na odděleních intenzivní péče (KARIM, ARO, JIP) a odděleních s imunokompromitovanými pacienty?

7 METODY DETEKCE KARBAPENEMÁZ VE FN PLZEŇ

7.1 Screening biologického materiálu a vyhledávání suspektních izolátů na základě citlivosti

Abychom mohli vyslovit podezření na produkci karbapenemáz, musí být vyšetřovaný kmen rezistentní alespoň k jednomu z karbapenemových antibiotik. Pro screening producentů je možné využít buď selektivní kultivační média nebo stanovení izolátů ke karbapenemům.

Pro screeningové vyhledávání producentů karbapenemáz přímo z biologického materiálu je možné použít různá selektivní kultivační média (komerční i připravovaná). Příkladem je MacConkey agar s přidaným meropenemem o koncentraci 1 mg/L nebo komerční půda CHROMID CARBA SMART Agar (BioMérieux, Francie). Využití screeningových ploten je vhodné zejména pro materiály z gastrointestinálního traktu (nejčastěji rektální výtěry), které obsahují velké množství bakteriálních druhů. Screeningové plotny tak slouží jako selektivní a zároveň diagnostická média (77).

Další možností je využití stanovení citlivosti ke karbapenemům u čistých bakteriálních kultur. A to ať už za využití stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) pomocí mikrodilučního testu, nebo stanovení inhibičních zón (IZ) pomocí diskové difúzní metody. Po kultivaci jsou obě metody hodnoceny dle kritérií vydávaných společností EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) za využití breakpointových nebo epidemiologických mezních hodnot zobrazených v **Tabulce 3**. Doporučovaným screeningovým antibiotikem je meropenem (77).

Tabulka 2 Breakpointy a epidemiologické mezní hodnoty (ECOFF) pro screening karbapenemázu produkujících enterobakterií

karbapenem	MIC (mg/l)		průměr IZ (mm) kolem 10 µg disku	
	C/I breakpoint	ECOFF	C/I breakpoint	ECOFF
meropenem	≤2	>0,125	≥22	<28
ertapenem	≤0,5	>0,125	≥25	<25

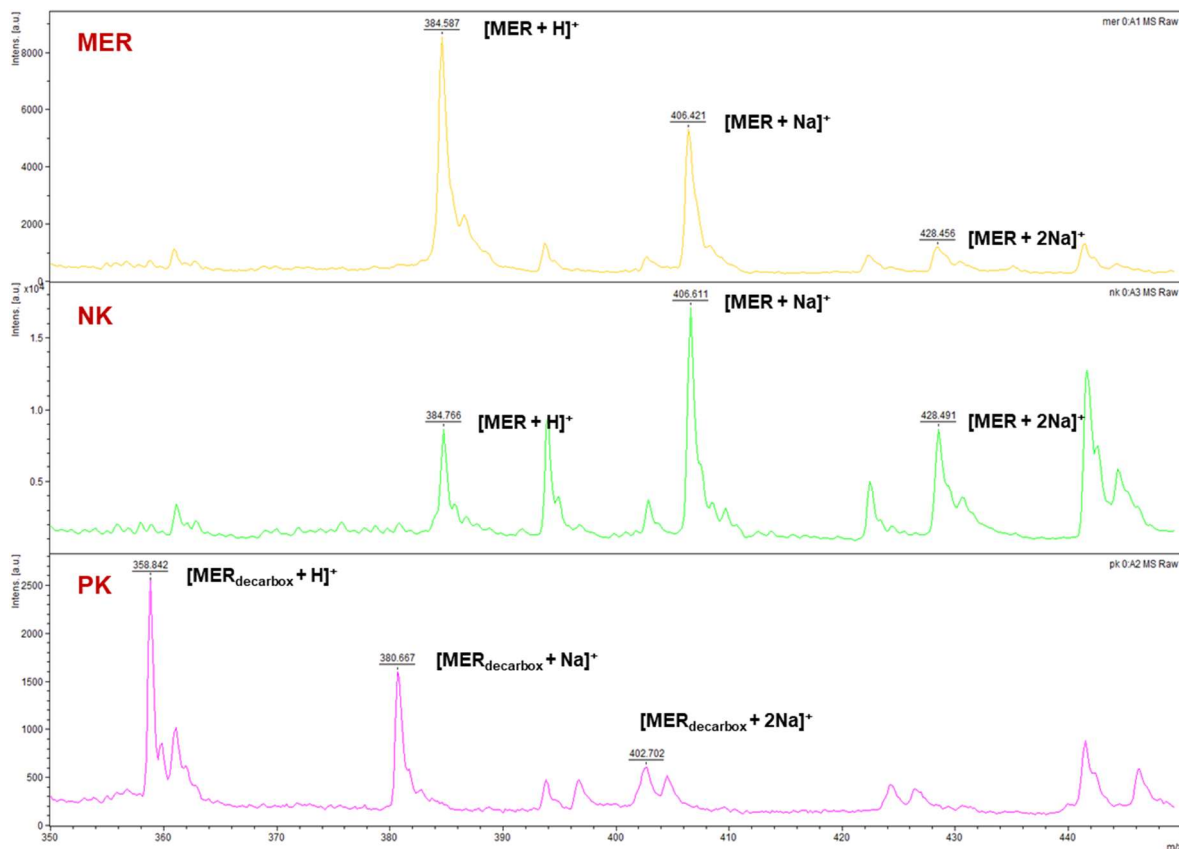
Zdroj: (77)

7.2 Detekce hydrolýzy meropenemu pomocí MALDI-TOF (MS)

Metoda MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (MS) je základní metodou pro detekci tvorby karbapenemáz. Dokáže detekovat ať už karbapenemy, nebo jejich degradační produkty, jako je např. sodná sůl, které vznikají hydrolýzou karbapenemů (58).

Postup pro zpracování vzorků pro test hydrolýzy meropenemu hmotnostní spektrometrií začíná kultivací suspektního kmene. Po kultivaci se několik kolonií bakteriální kultury odebere a resuspenduje pro vytvoření zákalu 3,0 McFarlandu. Tato vzniklá směs se napipetuje do zkumavky a zcentrifuguje. Po odstranění supernatantu následuje resuspendace vzniklé pelety v reakčním pufru obsahujícím meropenem a dále následuje inkubace směsi 2-4 hodiny v termostatu při 37 °C. Po skončení inkubační doby jsou reakční směsi opět zcentrifugovány. Poté se nanáší 1 µl supernatantu na MALDI-TOF destičku, který je po uschnutí převrstven 1 µl matrice (10 mg 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny v 1 ml 50 % etanolu). Pro kontrolu správnosti se ke každému měření nanese na destičku samotný roztok meropenemu, a dále pozitivní a negativní kontrola. Vzorky se dají změřit do spektrometru ihned po zaschnutí. Naměřená spektra se ukládají do systému a následně proběhne analýza spekter (58).

Pokud je ve vzorku kmen produkující karbapenemázu, ve spektru najdeme píky, které ukazují na degradační produkty meropenemu, a píky meropenemu a jeho sodné soli nenajdeme. Kmen se dá považovat za producenta karbapenemázy, pokud je ve spektru pík alespoň jednoho degradačního produktu a zároveň ve spektru není molekula meropenemu. Kmen považujeme za producenta karbapenemázy, pokud je ve spektru alespoň jeden pík meropenemu nebo jeho sodné soli a zároveň žádný degradační produkt meropenemu – **Obrázek 9** (58).



Obrázek 9 Příklad hmotnostních spekter při měření hydrolyzy meropenemu na MALDI-TOF MS

Legenda: [MER] – hmotnostní spektrum kontrolního roztoku s meropenemem; [NK] – hmotnostní spektrum negativní kontroly *E. coli*; [PK] – hmotnostní spektrum pozitivní kontroly *K. pneumoniae* produkující karbapenemázu KPC; [MER+H]⁺ – meropenem (m/z 384,6); [MER+Na]⁺ – sodná sůl meropenemu (m/z 406,6); [MER+2Na]⁺ – disodná sůl meropenemu (m/z 428,5); [MER_{decarbox}+H]⁺ – dekarboxylovaný degradační produkt meropenemu po hydrolyze karbapenemázou (m/z 358,8); [MER_{decarbox}+Na]⁺ – sodná sůl dekarboxylovaného degradačního produktu meropenemu po hydrolyze karbapenemázou (m/z 380,7); [MER_{decarbox}+2Na]⁺ – disodná sůl dekarboxylovaného degradačního produktu meropenemu po hydrolyze karbapenemázou (m/z 402,7)

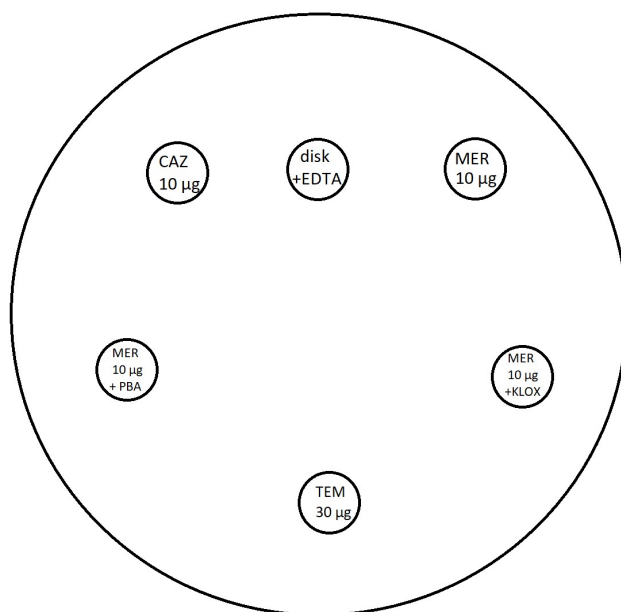
Zdroj: Ústav mikrobiologie – Oddělení virologie, sérologie a parazitologie, FN Plzeň [28. 2. 2023]

7.3 Určení fenotypu za využití inhibitorů

U izolátů, u kterých byla detekována hydrolyza meropenemu na MALDI-TOF MS, se dále provádí určení fenotypu za využití inhibitorů. Využívá se schopnost některých látek inhibovat karbapenemázy a jiné beta-laktamázy. Pro určení fenotypu se využívají antibiotické disky s meropenemem a následně přidaným inhibitorem, disk s temocilinem a ceftazifimem a “prázdný“ disk s následně přidanou EDTA. Pro karbapenemázy skupiny A se jako inhibitor využívá kyselina fenylboritá (PBA), pro MBL se využívá EDTA nebo kyselina dipikolinová a pro skupinu D se využívá disk s μg temocilinu. Dále se využívá

disk s 10 μ l kloxacilinu, který inhibuje AmpC, čímž se odliší hyperprodukce AmpC od produkce karbapenemáz.

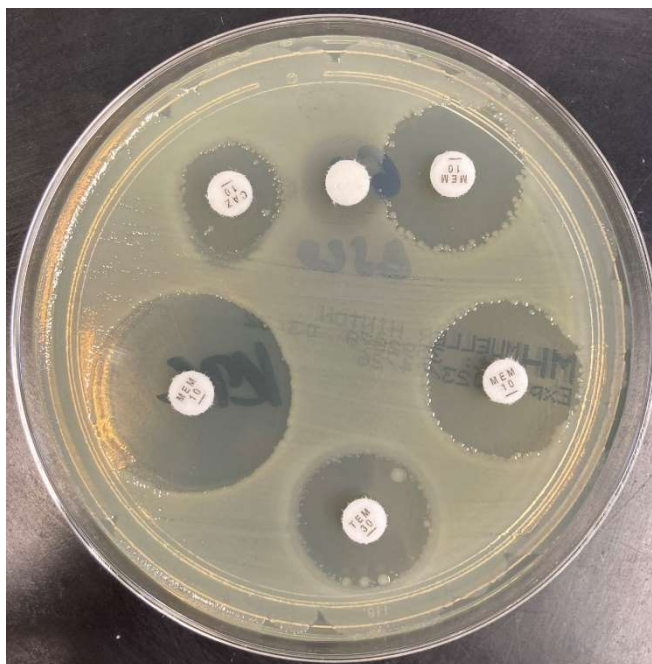
Testovaný kmen je rovnoměrně inokulován na Mueller-Hintonův agar. Poté se nanese antibiotické disky v přesně daném rozložení (**Obrázek 10**) a hned poté se na disky napipetuje příslušný inhibitor. Následně se kultivační půdy inkubují při 37 °C a přibližně 16 hodin po kultivaci se odečítá průměr IZ a srovnává se jejich velikost, případně se hodnotí jejich specifická deformace. Příklady inhibičních testů jsou uvedeny na **Obrázku 11** až **15**.



Obrázek 10 Schéma rozložení pro určení fenotypu karbapenemázu produkujícího izolátu

Legenda: CAZ – ceftazidim; EDTA – kyseliny ethylendiaminotetraoctová; KLOX – kloxacilin; MER – meropenem; PBA – kyselina fenylboritá; TEM – temocilin

Zdroj: Ústav mikrobiologie – Oddělení virologie, sérologie a parazitologie, FN Plzeň [28. 2. 2023]



Obrázek 11 *E. coli* produkující karbapenemázu KPC

Zdroj: Ústav mikrobiologie – Oddělení virologie, sérologie a parazitologie, FN Plzeň [28. 2. 2023]



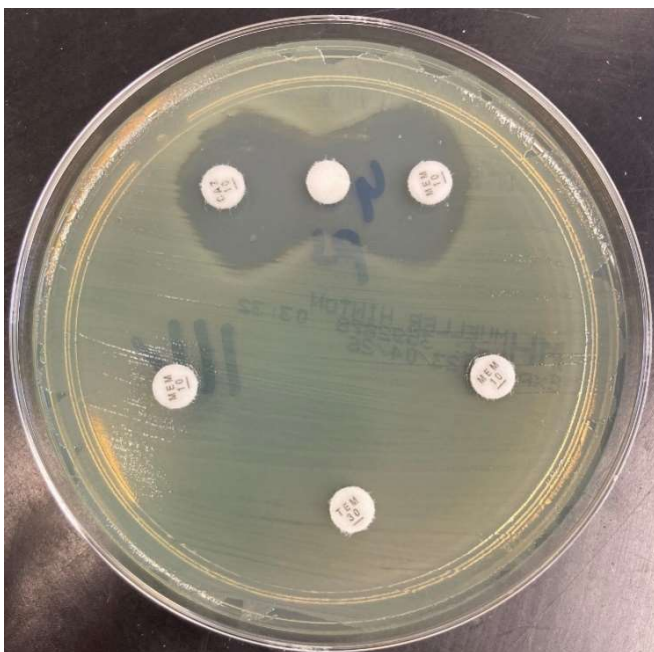
Obrázek 12 *K. variicola* produkující karbapenemázu NDM

Zdroj: Ústav mikrobiologie – Oddělení virologie, sérologie a parazitologie, FN Plzeň [28. 2. 2023]



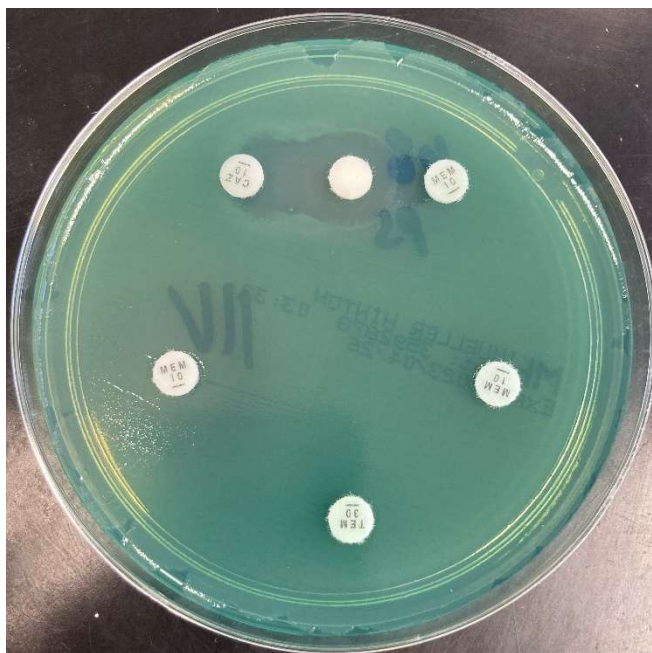
Obrázek 13 *K. pneumoniae* produkující karbapenemázu OXA-48-like

Zdroj: Ústav mikrobiologie – Oddělení virologie, sérologie a parazitologie, FN Plzeň [28. 2. 2023]



Obrázek 14 *P. aeruginosa* produkující karbapenemázu typu VIM

Zdroj: Ústav mikrobiologie – Oddělení virologie, sérologie a parazitologie, FN Plzeň [28. 2. 2023]



Obrázek 15 *P. aeruginosa* produkující karbapenemázu IMP

Zdroj: Ústav mikrobiologie – Oddělení virologie, sérologie a parazitologie, FN Plzeň [28. 2. 2023]

7.4 Molekulárně-genetické metody

Molekulárně-genetické metody se používají po fenotypových testech jako doplňkové vyšetření, nebo k identifikaci typu karbapenemázy u potvrzených producentů. Mezi molekulárně-genetické metody se řadí polymerázová řetězová reakce (PCR) nebo DNA mikročipy.

PCR se používá pro detekci genů s následnou elektroforézou, tedy detekcí produktu na gelu. Pro tuto metodu se používají na míru připravované primery pro detekci hledaných genů. PCR se používá jako hlavní metoda detekce genů karbapenemáz.

DNA mikročipy lze detekovat ESBL a AmpC beta-laktamázy a karbapenemázy. Pro tuto metodu je nutné izolovat DNA z bakteriální kultury, nikoliv z klinického materiálu. Výsledek této metody ovlivňuje právě kvalita izolace DNA (59).

8 METODIKA PRÁCE

Praktická část této práce byla provedena na Ústavu mikrobiologie ve FN Plzeň. Ústav mikrobiologie ve FN Plzeň a Národní referenční laboratoř v Praze jsou jediné laboratoře v České republice zabývající se detekcí karbapenemáz. Do obou laboratoří jsou zasílány bakteriální kmeny, které vykazují hraniční nebo rezistentní citlivost ke karbapenemům.

Hlavním cílem této práce je statistické zpracování výskytu karbapenemáz ve FN Plzeň v letech 2019 až 2022. Soubor pro statistické zpracování byl sestaven z bakteriálních kmenů jednotlivých pacientů, u kterých byla prokázána tvorba karbapenemáz. Údaje pro statistické zpracování byly vypsány z laboratorního informačního systému (LIS) a následně zpracovány a vyhodnoceny. Pro statistické zpracování byl využit program MS Office Excel.

Údaje z laboratorního informačního systému byly vypsány a zpracovány se souhlasem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči Fakultní nemocnice Plzeň.

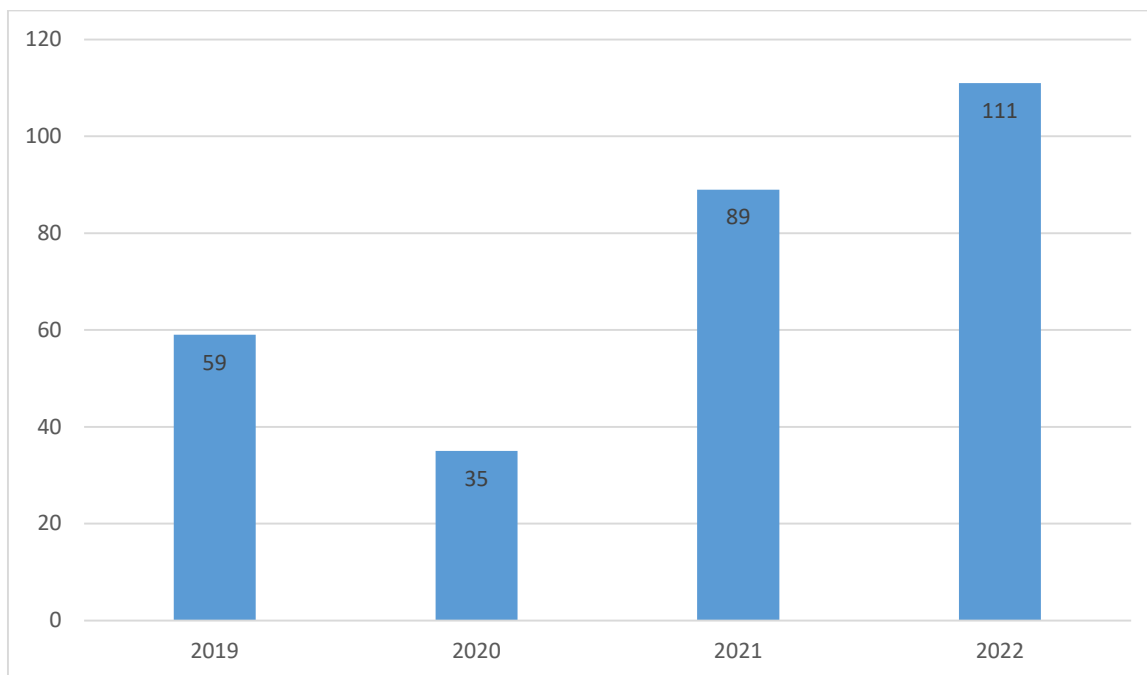
8.1 Statistické zpracování výskytu karbapenemáz ve FN Plzeň v letech 2019-2022

Pro statistické zpracování byly použity následující údaje z laboratorního informačního systému: bakteriální kmen, typ produkované karbapenemázy, datum příjmu pacienta, oddělení, druh biologického materiálu a pohlaví.

9 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

V této kapitole jsou zahrnuty výsledky ze statistického zpracování epidemiologických dat výskytu karbapenemáz ve Fakultní nemocnici Plzeň za období 2019-2022. Za sledované období bylo celkem identifikováno 294 izolátů s produkcí karbapenemáz.

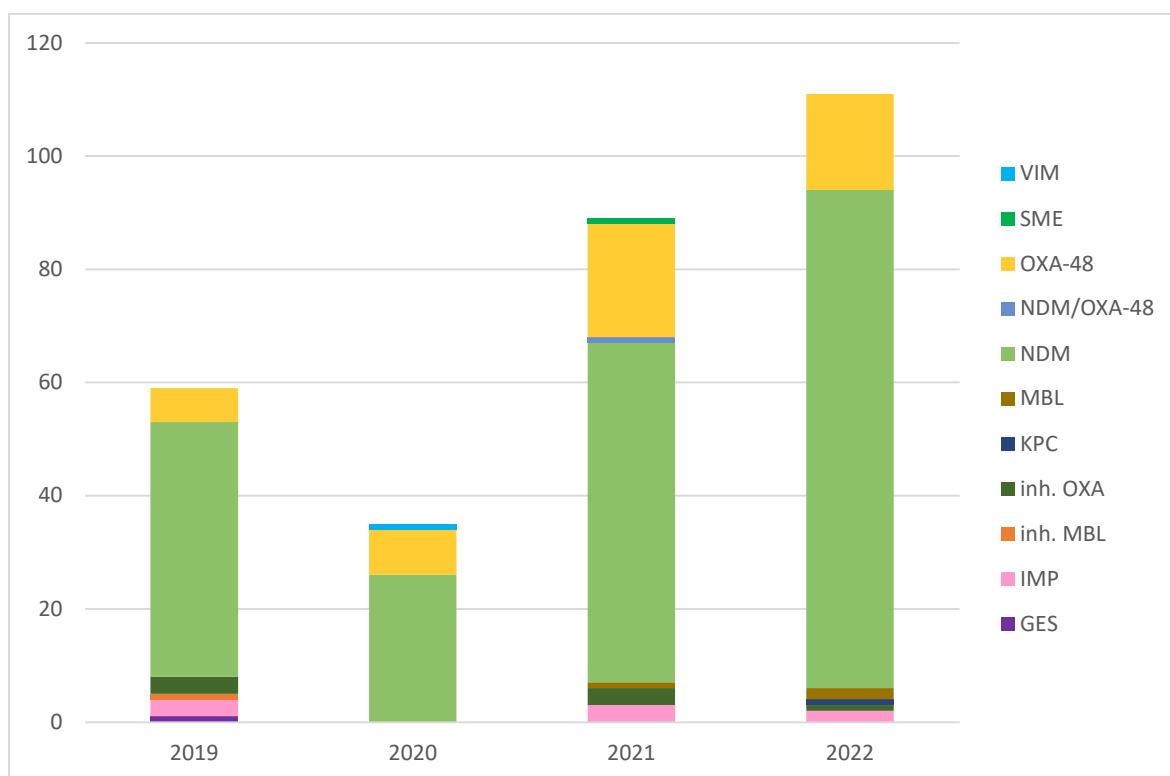
Graf 1 Celkové počty detekovaných karbapenemáz ve FN Plzeň za období 2019-2022



Zdroj: vlastní zpracování dle dat z LIS FN Plzeň

Graf 1 znázorňuje celkové počty detekovaných karbapenemáz na Ústavu mikrobiologie ve FN Plzeň za jednotlivé roky sledovaného období. V roce 2019 bylo zaznamenáno 59 bakteriálních kmenů produkujících karbapenemázu. V roce 2020 je počet výrazně nižší, což můžeme přisuzovat probíhající pandemii onemocnění COVID-19, kdy byly omezeny screeningy pacientů. Počty za roky 2021 a 2022 ukazují, že trend výskytu karbapenemáz neustále narůstá, což je možné vysvětlit vyšším množstvím používaných antibiotik během pandemie, a tedy vyšším selekčním tlakem na rezistentní populace bakterií.

Graf 2 Počty detekovaných typů karbapenemáz za sledované období ve FN Plzeň

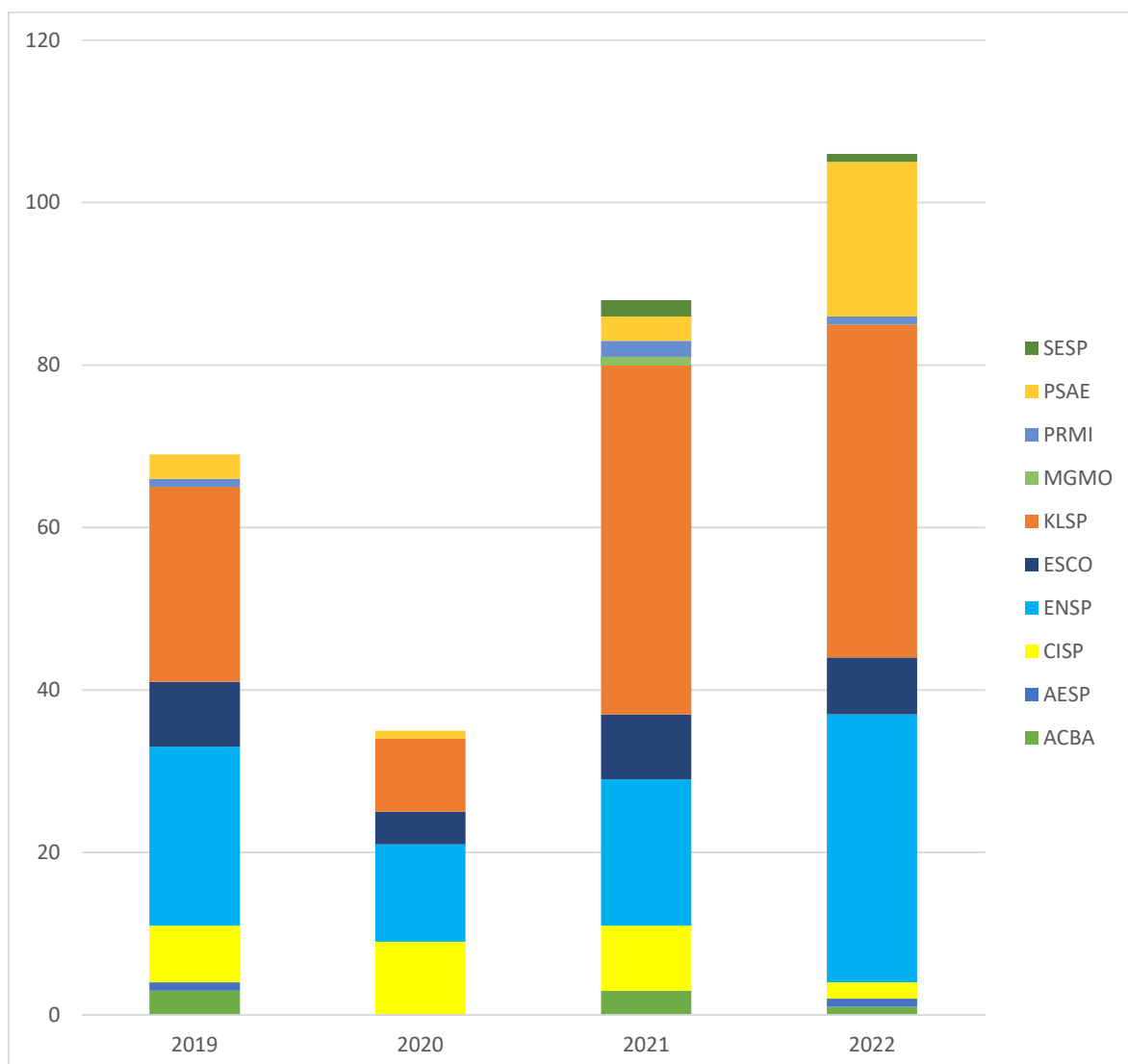


Legenda: inh. MBL – inherentní metallo-beta-laktamáza.; inh. OXA – inherentní karbapenemáza typu OXA.

Zdroj: vlastní zpracování dle dat z LIS FN Plzeň

Graf 2 znázorňuje počty jednotlivých typů karbapenemáz detekovaných za období 2019-2022. Ve všech letech byla nejčastěji detekovanou karbapenemázou karbapenemáza typu NDM, což je také epidemiologicky nejvýznamnější typ. Druhá nejčastěji detekovaná byla karbapenemáza typu OXA-48-like. V roce 2021 byl u jednoho vyšetřovaného izolátu zjištěna koprodukce dvou typů enzymů – NDM a OXA-48-like. Na tomto grafu je opět vidět, že data z roku 2020 jsou díky probíhající pandemii onemocnění COVID-19 lehce zkreslené, díky malému počtu vyšetřovaných kmenů, i tak v tomto roce byla nejvíce detekovaná karbapenemáza typu NDM. Také je zde znázorněno, jak se zvyšuje trend výskytu této karbapenemázy.

Graf 3 Počty a taxonomické zastoupení vyšetřovaných bakteriálních kmenů za sledované období



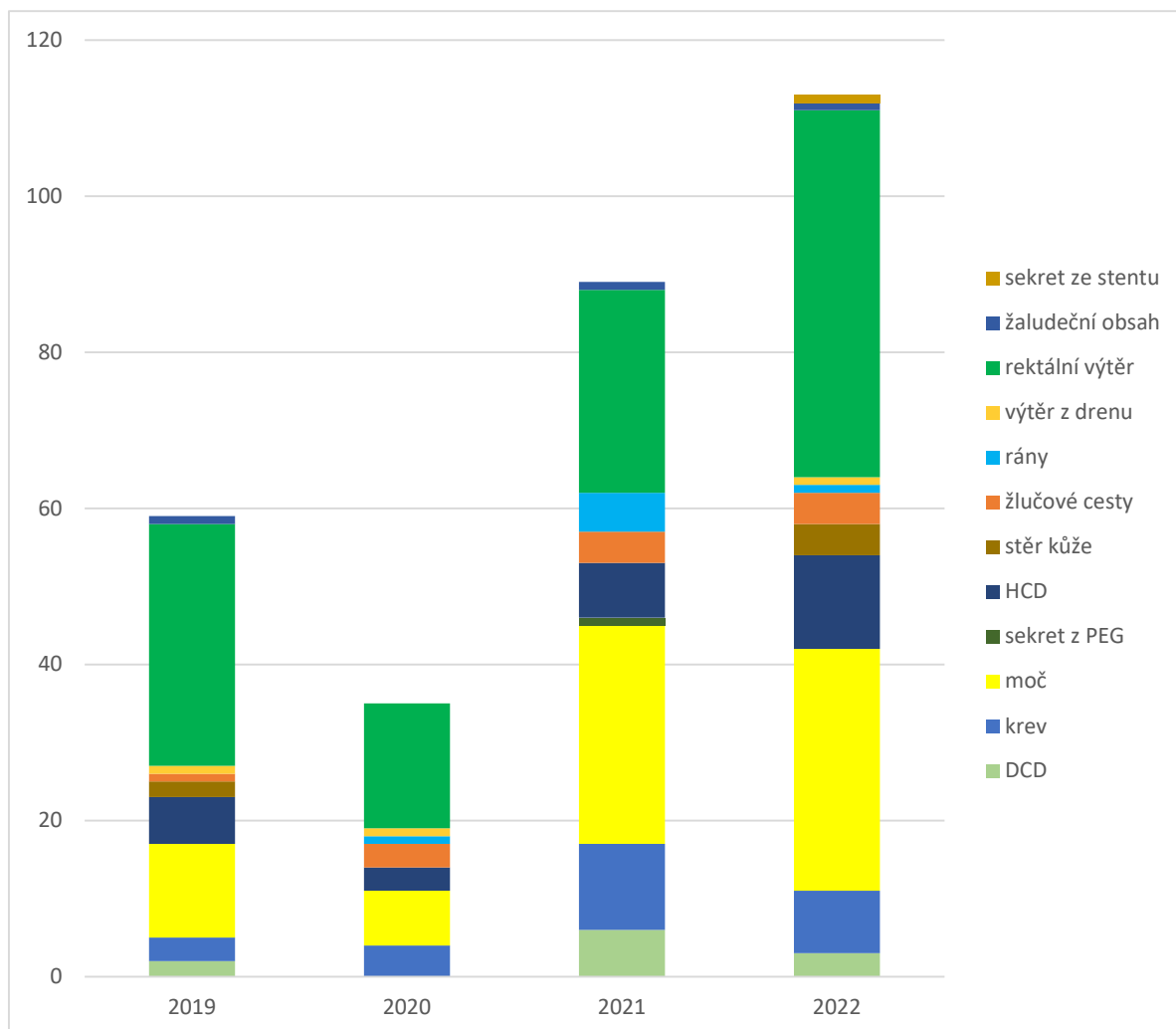
Legenda: ACBA – *Acinetobacter baumannii* komplex; AESP – *Aeromonas* species; CISP – *Citrobacter* species; ENSP – *Enterobacter* species; ESCO – *Escherichia coli*; KLSP – *Klebsiella* species; MGMO – *Morganella morganii*; PRMI – *Proteus mirabilis*; PSAE – *Pseudomonas aeruginosa*; SESP – *Serratia* species

Zdroj: vlastní zpracování dle dat z LIS FN Plzeň

Na **Grafu 3** je znázorněno taxonomické zastoupení producentů karbapenemáz za sledované období. Pro větší přehlednost byly druhy sloučeny do rodů. Ve sledovaném období dominovaly zejména kmeny *Klebsiella pneumoniae* (n = 95) a *Enterobacter cloacae* komplex (n = 81), následované *Escherichia coli* (n = 27) a *Citrobacter freundii* (n = 27). V roce 2022 byl zaznamenán významný nárůst počtu izolátů *Pseudomonas aeruginosa* (n = 26), které se do té doby držely v nižších jednotkách. Znázorněné zvyšující se počty

kmenů produkujících karbapenemázu odpovídá **Grafu 1**, v kterém je přehledně zobrazen neustálý nárůst detekovaných karbapenemáz.

Graf 4 Počty a typy biologických materiálů s diagnostikovanými producenty karbapenemáz za sledované období

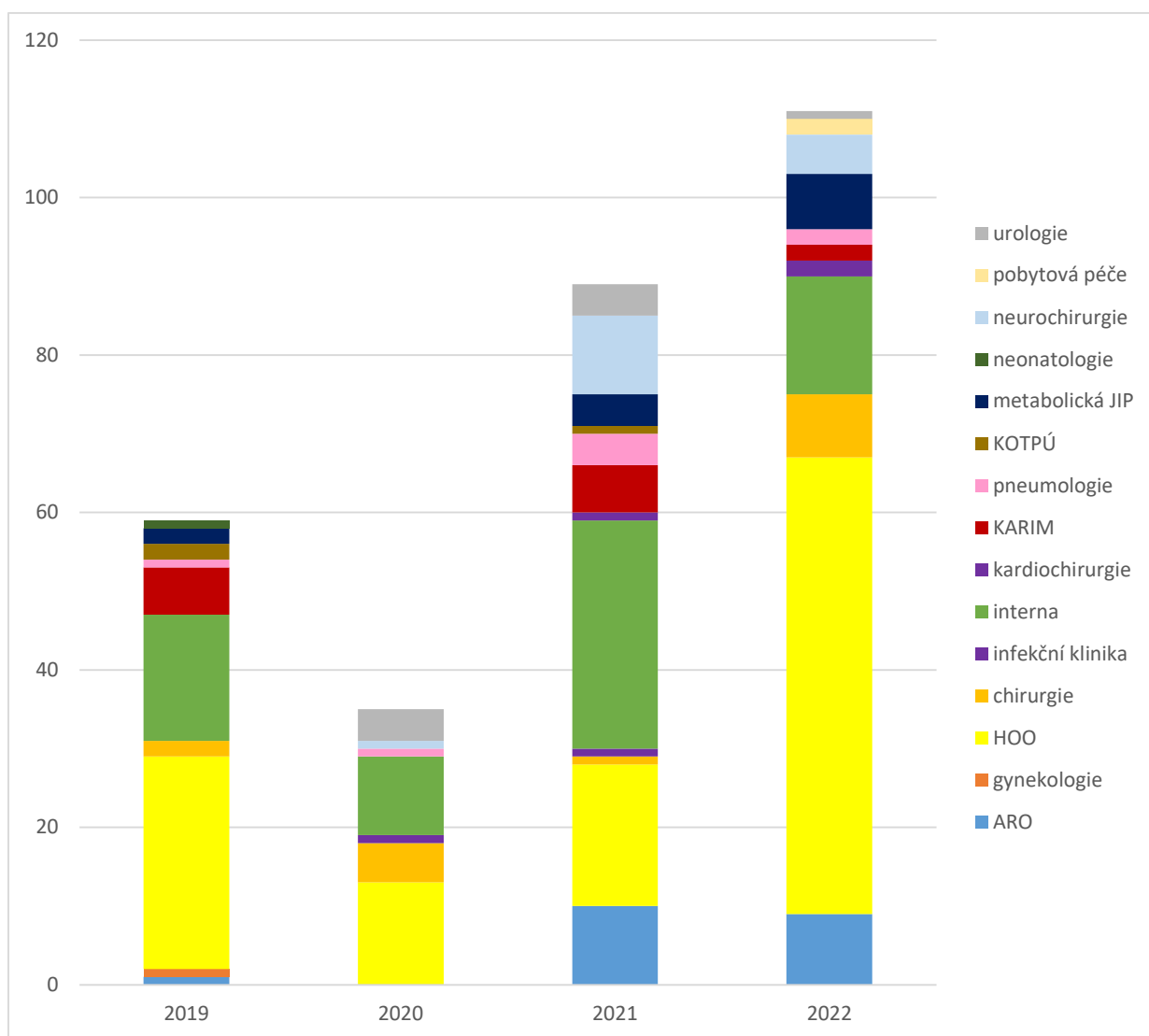


Legenda: DCD – dolní cesty dýchací (bronchoalveolární laváž, tracheální aspirát); HCD – horní cesty dýchací (sputum, výtěr z krku, výtěr z nosu); moč – moč spontánní, cévkovaná, PMK; rány – dekubity, operační rány; žlučové cesty – žluč, výtěry, punktáty

Zdroj: vlastní zpracování dle dat z LIS FN Plzeň

Graf 4 znázorňuje, z jakých materiálů byli producenti karbapenemáz nejčastěji detekováni. Je patrné, že ve sledovaném období to byly nejčastější rektální výtěry, což odpovídá tomu, že rektální výtěry se používají ke screening, a to ať už u hospitalizovaných nebo přijímaných pacientů, zda nejsou kolonizováni a neměli by být izolováni od ostatních pacientů. Dále byly tyto izoláty detekovány často v různých typech močí, následované materiály z respiračního systému, kůže, ran nebo krve.

Graf 5 Znárodnění jednotlivých oddělení a v jakém počtu zasílaly biologické materiály

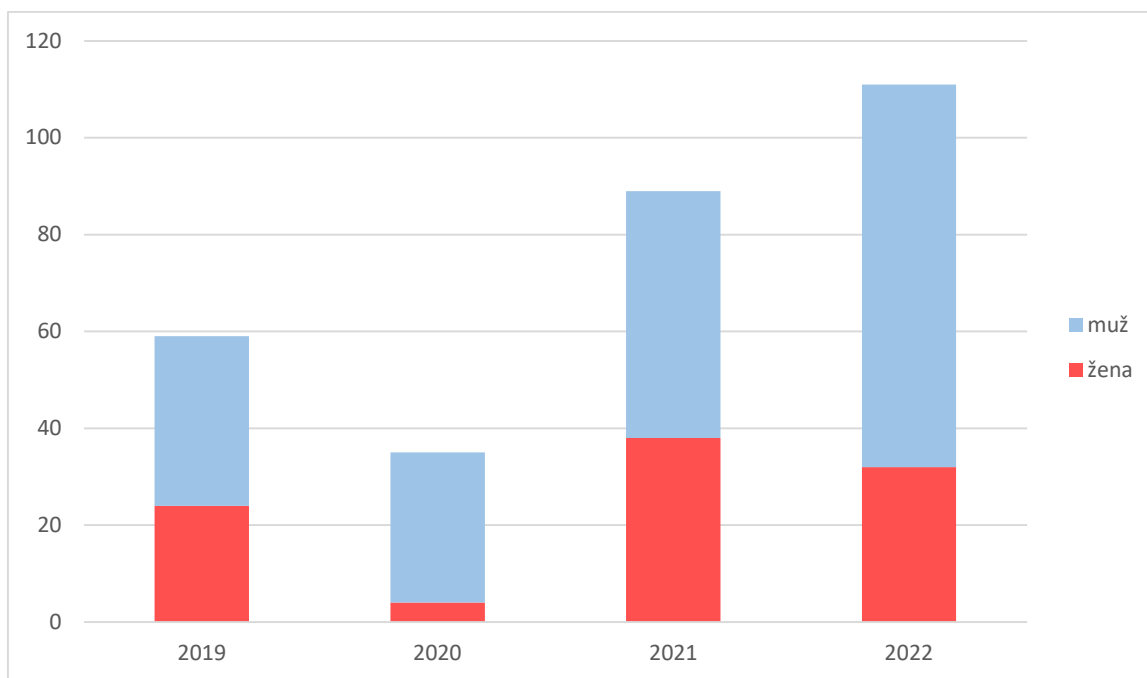


Legenda: ARO – anesteziologicko-resuscitační oddělení; HOO – hemato-onkologické oddělení; KARIM – klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny; KOTPÚ – klinika ortopedie a traumatologie pohybového ústrojí; metabolická JIP – metabolická jednotka intenzivní péče

Zdroj: vlastní zpracování dle dat z LIS FN Plzeň

Graf 5 znázorňuje, jaká oddělení nejčastěji odesílala biologické materiály, v kterých byly detekované karbapenemázy. Z grafického znázornění je patrné, že materiály nejčastěji pocházely z hemato-onkologického oddělení, následované interním, anesteziologicko-resuscitačním oddělením a neurochirurgií.

Graf 6 Znárodnění počtu pohlaví za sledované období



Zdroj: vlastní zpracování dle dat z LIS FN Plzeň

Graf 6 znázorňuje poměr mužů a žen, u kterých byl vyšetřen bakteriální kmen produkující karbapenemázu. Z grafu je patrné, že každý rok bylo více vzorků od mužů než od žen.

DISKUZE

Tato bakalářská práce měla za cíl poukázat na problematiku antibiotické rezistence k beta-laktamovým antibiotikům a statisticky zpracovat výskyt karbapenemáz ve FN Plzeň za období 2019 až 2022. Pro statistické zpracování bylo použito 294 vzorků, které byly testovány pozitivně na tvorbu karbapenemáz.

Tvorba karbapenemáz je v současné době nejvýznamnější typ mechanismu rezistence k antibiotikům a je to považováno za globální zdravotnický problém (79). Enterobakterie produkující karbapenemázu jsou časté ve zdravotnických zařízeních s lůžkovými a akutními odděleními, ale i v zařízeních s dlouhodobou péčí. Odtud se pak mohou šířit mezi pracovníky zařízení nebo i pacienty a poté dál do společnosti. Enterobakterie produkující karbapenemázu se šíří klonálně (vertikálně), a to kvůli nedodržování hygienických předpisů ve zdravotní péči, například nedodržováním správné hygieny rukou. Mimo to k šíření samozřejmě přispívá nesprávné užívání antibiotik. Za zdůraznění stojí fakt, že enterobakterie produkující karbapenemázu mohou jedince kolonizovat (čímž se z něj stává nosič) ale nemusí způsobit infekci. Pokud už ale infekci vyvolá, jedná se o dlouhodobou infekci, často v gastrointestinálním traktu (80).

V roce 2019 bylo v České republice zaznamenáno 270 případů kolonizace nebo infekce bakteriemi rezistentními na karbapenemy, a to konkrétně enterobaktery. Tento údaj pochází ze studie z let 2014 až 2019, který graficky znázorňuje počty případů. Na uvedeném grafu je vidět každoročně velký nárůst pozitivních případů, a to z jednotek případů až do zmíněných dvou set sedmdesáti (79). Pro srovnání pouze ve FN Plzeň bylo v roce 2019 zaznamenáno 59 pozitivních případů. Producenti karbapenemáz se v České republice vyskytují od roku 2011 a od roku 2016 dochází k nárůstu jejich výskytu (79).

Myslím si, že po porovnání výsledků této bakalářské práce například se studií z let 2014 až 2019 (79) lze říci, že výskyt karbapenemáz se v České republice opravdu zvyšuje. Jelikož je tvorba karbapenemáz závažným typem rezistence, mělo by se důkladně zvážit každé použití karbapenemových antibiotik. Posledních 20 let se jejich spotřeba zvyšuje (79), což můžeme dát do souvislosti s rozšiřující se rezistencí na karbapenemy. Tato bakalářská práce ukázala, že karbapenemázy byly často detekované u druhu *Klebsiella* spp., což je bakterie běžně se vyskytující v gastrointestinální mikroflóře, ale zároveň původce nozokomiálních infekcí. Dalším často vyšetřovaným druhem je *Enterobacter* spp., což je za normálních okolností další zástupce běžné gastrointestinální mikroflóry. V roce 2022 byl

pak zaznamenán nárůst u *Pseudomonas aeruginosa*, která se vyskytuje například v odpadních vodách nebo půdě, ale i v nemocničním prostředí, kde také způsobuje nozokomiální infekce. Z **Grafu 4** vyplývá, že nejčastěji zpracovávané biologické materiály byly rektální výtěry, což bylo očekávané vzhledem k tomu, že tento biologický materiál je doporučený materiál pro screeningové vyšetření tvorby karbapenemáz.

Pro tuto bakalářskou práci byly stanoveny následující výzkumné otázky, které byly popsány v kapitole 9 pomocí grafických znázornění:

1) Zvyšoval se výskyt karbapenemáz ve sledovaném období?

Z **Grafu 1** je patrný exponenciální nárůst celkového počtu pozitivně detekovaných karbapenemáz ve FN Plzeň. S výjimkou roku 2020, kdy bylo kvůli pandemii onemocnění COVID-19 omezeno screeningové testování pacientů.

2) Měnilo se ve sledovaném období spektrum detekovaných karbapenemáz?

Ve sledovaném období byl nejčastěji detekovaným typem karbapenemázy typ NDM, následovaný typem OXA-48-like (**Graf 2**). Oba tyto byly nejčastěji detekovány u izolátů enterobakterií – zejména *E. cloacae* komplex, *K. pneumoniae* a *C. freundii*. Ostatní typy karbapenemáz byly detekovány v počtu jednotek případů a výrazně se neměnily.

3) Převažovaly detekované případy na odděleních intenzivní péče (KARIM, ARO, JIP) a odděleních s imunokompromitovanými pacienty?

Po srovnání dat **Grafu 5** je patrné, že izoláty s detekovanými karbapenemázami pocházely zejména z oddělení, kde bývají hospitalizováni zejména pacienti s určitým stupněm imunokompromitace. Drtivá většina těchto izolátů pocházela z hemato-onkologického oddělení, a to v počtu 116 izolátů za celé sledované období – což činí téměř 40 % všech zachycených producentů. Ve většině případů se jednalo o izoláty s produkcí karbapenemázy typu NDM. Druhým oddělením s nejčastějším zachytem bylo interní oddělení s počtem 70 producentů za celé období. Z oddělení s intenzivní péčí převažovaly ARO (n = 20), neurochirurgická JIP (n = 14), KARIM (n = 14), metabolická JIP (n = 13). Z těchto výsledků je patrné, že producenti karbapenemáz jsou častými původci různých nozokomiálních infekcí.

ZÁVĚR

Antibiotická rezistence je v současné době stále se zvětšující se problém a je potřeba o něm mluvit a dodržovat opatření pro snížení nebo zabránění přenosu, a tedy následné rozšiřování rezistentních populací bakterií. Obecně bylo cílem této bakalářské práce seznámit se s beta-laktamovými antibiotiky a mechanismy rezistence, dále pak popsání současných diagnostických metod pro detekci nejzávažnějšího typu rezistence, tedy tvorby karbapenemáz.

V praktické části jsou popsány diagnostické metody pro detekci tvorby karbapenemáz používané ve FN Plzeň. Hlavním cílem praktické části bylo statistické zpracování výskytu karbapenemáz ve FN Plzeň za období 2019 až 2022. Pro statistické zpracování bylo použito 294 vzorků, které byly ve sledovaném období testovány pozitivně na tvorbu karbapenemáz. Statistické zpracování ukázalo, že výskyt karbapenemáz se ve FN Plzeň v letech 2019 až 2020 zvyšoval. Lze předpokládat, že v dalších letech výskyt dál bude růst. Dále analýza ukázala, že spektrum detekovaných karbapenemáz se výrazně neměnilo. Nejčastěji detekovaným typem ve všech letech byl typ NDM a typ OXA-48-like, a dále typy jako například IMP, inherentní typ OXA, MBL nebo inherentní typ MBL se vyskytovaly v počtu jednotek a za sledované období se jejich výskyt střídal, ale spektrum se výrazně neměnilo. Epidemiologicky významný typ karbapenemázy, typ KPC, byl detekován zatím pouze v roce 2022. Bakteriální kmeny s produkcí karbapenemázy byly nejčastěji kmeny *Klebsiella species* a dále *Enterobacter species*.

Závěrem můžeme říci, že tato bakalářská práce poukázala na to, že je problematika antibiotické rezistence závažná. Antimikrobiální léčba by se měla opravdu hodně zvažovat a konzultovat s odborníky, neboť karbapenemázy rozkládají karbapenemy, tedy antibiotika poslední volby a vytvoření nových účinných látek trvá v dnešní době několik let.

SEZNAM LITERATURY

1. **KOLÁŘOVÁ, Zdeňka.** Nárůst antibakteriální rezistence již nelze zastavit, snahou je ji zpomalit. *Medical Tribune*. [Online] Medical Tribune, 10. 4. 2022. [Citace: 3. 12. 2022.] Dostupné z: <https://www.tribune.cz/medicina/narust-antibakterialni-rezistence-jiz-nelze-zastavit-snahou-je-ji-zpomalit/>.
2. **PRINZI, Andrea.** Antimicrobial Resistance: A Review of a Broad-Spectrum Problem and Future Needs. [Online] 27. 4. 2022. [Citace: 13. 12. 2022.] Dostupné z: <https://infectioncontrol.tips/2022/04/27/antimicrobial-resistance-a-review-of-a-broad-spectrum-problem-and-future-needs/>.
3. **JINDRÁK, Vlastimil.** *Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici*. Praha : Mladá fronta, 2014. ISBN 978-80-204-2815-8.
4. **MUNITA, Jose M., a další.** Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*. 25. 3. 2016.
5. **CDC [Centers for Disease Control and Prevention].** Understanding Antibiotic Resistance in Water: A One Health Approach. *Centers for Disease Control and Prevention*. [Online] 28. 11. 2021. [Citace: 13. 12. 2022.] Dostupné z: <https://www.cdc.gov/onehealth/in-action/understanding-antibiotic-resistance-in-water.html>.
6. **ECDC [European Centre for Disease Prevention and Control].** Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data. *European Centre for Disease Prevention and Control*. [Online] 26. 1. 2022. [Citace: 13. 12. 2022.] Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2022-2020-data>.
7. **LARSSON, D. G. Joakim a FLACH, Carl-Fredrik.** Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*. 2021.
8. **ZAMAN, Sojib Bin, a další.** A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*. 28. 6. 2017.
9. **FAIR, Richard J. a TOR, Yitzhak.** Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*. 28. 8. 2014.

10. **CDC [Centers for Disease Control and Prevention]**. CDC's One Health Office: Who We Are. *Centers for Disease Control and Prevention*. [Online] 6. 6. 2020. [Citace: 13. 12. 2022.] Dostupné z: <https://www.cdc.gov/onehealth/who-we-are/index.html>.
11. **WOAH [World Organisation for Animal Health]**. One Health. *World Organisation for Animal Health*. [Online] [Citace: 28. 2. 2023.] Dostupné z: <https://www.woah.org/en/what-we-do/global-initiatives/one-health/>.
12. **MZČR [Ministerstvo zdravotnictví České republiky]**. Téma antibiotické rezistence v České Republice. *Ministerstvo zdravotnictví České republiky*. [Online] 4. 10. 2021. [Citace: 13. 12. 2022.] Dostupné z: <https://www.mzcr.cz/antibioticka-rezistence-v-ceske-republice/>.
13. **SÚKL [Státní ústav pro kontrolu léčiv]**. Antibiotická politika ČR. *Státní ústav pro kontrolu léčiv*. [Online] 25. 11. 2019. [Citace: 13. 12. 2022.] Dostupné z: <https://www.sukl.cz/antibioticka-politika-cr>.
14. **O'NEILL, Jim**. Review on Antimicrobial Resistance. *Review on Antimicrobial Resistance*. [Online] 2014. [Citace: 13. 12. 2022.] Dostupné z: <https://amr-review.org/Publications.html>. ISSN 2165-0497.
15. **WHO [World Health Organization]**. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. *World Health Organization*. [Online] 2014. [Citace: 13. 12. 2022.] Dostupné z: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>. ISBN 978-92-4-156474-8.
16. **LIMA, Lidia Moreira, a další**. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020.
17. **BENEŠ, Jiří**. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha : Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0636-3.
18. **PRESCOTT, John F.** Beta-lactam Antibiotics: Penam Penicillins. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Hoboken : John Wiley & Sons, Ltd, 2013.
19. **TOOKE, Catherine L., a další**. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*. 2019.
20. **HURYCH, Jakub a ŠTÍCHA, Roman**. *Lékařská mikrobiologie: repetitorium*. Praha : Stanislav Juhaňák - Triton, 2021. ISBN 978-80-7553-976-2.

21. **VOTAVA, Miroslav.** *Lékařská mikrobiologie obecná.* Brno : Neptun, 2005. ISBN 978-80-86850-00-9.
22. **BUSH, Karen a BRADFORD, Patricia A.** Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews.* 2020.
23. **MILLER, Elissa Lane.** THE PENICILLINS: A REVIEW AND UPDATE. *Journal of Midwifery & Women's Health.* 2002.
24. **TRIVEDI, Harshal, KSHTRI, Nayan a PATEL, Mukesh.** A Rapid Validated RP-HPLC Method for the Simultaneous Determination of Cleaning Validation and Cross Contamination of 12 Beta-Lactam Compounds. *Scientia pharmaceutica.* 2013.
25. **YIP, Derek W. a GERRIETS, Valerie.** *Penicillin.* Treasure Island : StatPearls Publishing, 2022.
26. **RUSU, Aura a LUNGU, Ioana-Andreea.** The new fifth-generation cephalosporins – a balance between safety and efficacy. *Romanian Journal of Pharmaceutical Practice.* 30. 9. 2020.
27. **BUI, Toai a PREUSS, Charles V.** Cephalosporins. *StatPearls.* [Online] StatPearls Publishing, 2022. [Citace: 13. 12. 2022.] Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551517/>.
28. **LIN, Xuemei a KÜCK, Ulrich.** Cephalosporins as key lead generation beta-lactam antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2022.
29. **SATO, Takafumi a YAMAWAKI, Kenji.** Cefiderocol: Discovery, Chemistry, and In Vivo Profiles of a Novel Siderophore Cephalosporin. *Clinical Infectious Diseases.* 2019.
30. **PAPP-WALLACE, Krisztina M., a další.** Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2011.
31. **FENG, Han, a další.** The mechanism of NDM-1-catalyzed carbapenem hydrolysis is distinct from that of penicillin or cephalosporin hydrolysis. *Nature Communications.* 21. 12. 2017.
32. **ELSHAMY, Ann A. a ABOSHANAB, Khaled M.** A review on bacterial resistance to carbapenems: epidemiology, detection and treatment options. *Future Science OA.* 1. 3. 2020.

33. **ZHANEL, George G., a další.** Comparative Review of the Carbapenems. *Drugs*. 2007.
34. **BUSH, Karen a BRADFORD, Patricia A.** β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2016.
35. **PHILLIPS, Joshua Bryant.** THE USE OF NATURAL PRODUCT SUBSTRATES FOR THE SYNTHESIS OF LIBRARIES OF BIOLOGICALLY ACTIVE, NEW CHEMICAL ENTITIES. *Graduate Student Theses, Dissertations, & Professional Papers, University of Montana*. 1. 6. 2010.
36. **IYER, Ranganathan N.** Beta lactam. *Comprehensive Pharmacology*. 2022.
37. **BETHKE, Jonathan H., a další.** Vertical and horizontal gene transfer tradeoffs direct plasmid fitness. *Molecular Systems Biology*. 2022.
38. **LI, Bing, a další.** Dissecting horizontal and vertical gene transfer of antibiotic resistance plasmid in bacterial community using microfluidics. *Environment International*. 2019.
39. **COLEMAN, J. P. a SMITH, C. J.** Microbial Resistance. *Biomedical Sciences*. Oxford : Elsevier, 2014.
40. **BENCKO, Vladimír a ŠÍMA, Petr.** Horizontální přenos genetické informace a jeho význam pro vznik antibiotické rezistence. *Časopis lékařů českých*. 2018.
41. **ReAct.** Transfer of antibiotic resistance. *ReAct*. [Online] [Citace: 20. 1. 2023.] Dostupné z: <https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/antibiotic-resistance/transfer-of-antibiotic-resistance/>.
42. **PARTRIDGE, Sally R., a další.** Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 2018.
43. **SANSEVERINO, Isabella , a další.** State of the art on the contribution of water to antimicrobial resistance. *Publications Office of the European Union*. [Online] 17. 1. 2019. [Citace: 23. 2. 2023.] Dostupné z: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC114775>. ISBN 978-92-79-98478-5.

44. **NatureEducation.** Conjugation. *Scitable*. [Online] NatureEducation. [Citace: 20. 1. 2023.] Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/definition/conjugation-prokaryotes-290/>.
45. **SOUCY, Shannon M., HUANG , Jinling a GOGARTEN, Johann Peter.** Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics*. 2015.
46. **SMALLA, Kornelia, JECHALKE, Sven a TOP, Eva M.** Plasmid Detection, Characterization, and Ecology. *Microbiology Spectrum*. 2015.
47. **LU, Miao, a další.** Mobile Genetic Elements in Streptococci. *Current Issues in Molecular Biology*. 2019.
48. **LI, Niannian, a další.** Tn5 Transposase Applied in Genomics Research. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020.
49. **PAGANO, Mariana, MARTINS, Andreza Francisco a BARTH, Afonso Luis.** Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016.
50. **CAMBRAY, Guillaume, GUEROUT, Anne-Marie a MAZEL, Didier.** Integrons. *Annual Review of Genetics*. 2010.
51. **SABBAGH, Parisa, a další.** Integron and its role in antimicrobial resistance: A literature review on some bacterial pathogens. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*.
52. **BUSH, Karen.** Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018.
53. **EGOROV, A. M., ULYASHOVA, M. M. a RUBTSOVA, M. Yu.** Antibiotics, Inhibitors of β -Lactamases. New Life of β -Lactam. *Biochemistry (Moscow)*. 2020.
54. **BUSH, Karen a JACOBY, George A.** Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010.
55. **BUSH, Karen a BRADFORD, Patricia A.** Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nature Reviews Microbiology*. 2019.

56. **GHAFOURIAN, Sobhan, SADEGHIFARD, Nourkhoda a SOHEILI, Zamberi.** Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Current Issues in Molecular Biology*. 2015.
57. **BEVAN, Edward R., JONES, Annie M. a HAWKEY, Peter M. Hawkey M.** Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017.
58. **DRAWZ, Sarah M. a BONOMO, Robert A.** Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010.
59. **HRABÁK, Jaroslav, a další.** Detekce karbapenemáz u enterobakterií pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (MS), fenotypových inhibičních testů a molekulárně-mikrobiologickými technikami. *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ)*. 2012.
60. **BOYD, Sara E., a další.** Metallo- β -Lactamases: Structure, Function, Epidemiology, Treatment Options, and the Development Pipeline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020.
61. **PAGE, Malcolm G. P.** A Unified Numbering Scheme for Class C β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020.
62. **PHILIPPON, Alain, a další.** Class C β -Lactamases: Molecular Characteristics. *Clinical Microbiology Reviews*. 2022.
63. **MEINI, Simone, a další.** AmpC β -lactamase-producing Enterobacterales: what a clinician should know. *Infection*. 2019.
64. **HALAT, Dalal Hammoudi a MOUBARECK, Carole Ayoub.** The Current Burden of Carbapenemases: Review of Significant Properties and Dissemination among Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*. 16. 4. 2020.
65. **NEMEC, Alexandr, a další.** Multirezistentní *Acinetobacter baumannii* nesoucí geny pro karbapenemázy NDM-1 a OXA-23 importovaný do České republiky. *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ)*. 2011.
66. **IBRAHIM, Susan, a další.** Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. *Molecular Biology Reports*. 1. 10. 2021.

67. **MUNOZ-PRICE, Silvia L, a další.** Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet. Infectious diseases*. 2013.
68. **NAAS, Thierry, a další.** Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2017.
69. **HAN, Renru, a další.** Dissemination of Carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48, IMP, and VIM) Among Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolated From Adult and Children Patients in China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3. 7. 2020.
70. **RAMIREZ, Maria Soledad, BONOMO, Robert A. a TOLMASKY, Marcelo E.** Carbapenemases: Transforming *Acinetobacter baumannii* into a Yet More Dangerous Menace. *Biomolecules*. 5. 2020.
71. **PITOUT, Johann D. D., a další.** The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clinical Microbiology Reviews*. 13. 11. 2019.
72. **PÉRICHON, B., COURVALIN, P. a STRATTON, C. W.** Antibiotic Resistance. *Biomedical Sciences*. Oxford : Elsevier, 2015.
73. **JAMSHIDI, Shirin, SUTTON, Mark J. a RAHMAN, Khondaker M.** An overview of bacterial efflux pumps and computational approaches to study efflux pump inhibitors. *Future Medicinal Chemistry*. 2016.
74. **GALDIERO, Stefania, a další.** Microbe-Host Interactions: Structure and Role of Gram-Negative Bacterial Porins. *Current Protein and Peptide Science*. 2012.
75. **AURILIO, Caterina, a další.** Mechanisms of Action of Carbapenem Resistance. *Antibiotics*. 2022.
76. **SAUVAGE, Eric, a další.** The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*. 2008.
77. **NORDMANN, Patrice a POIREL, Laurent.** Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*. 13. 11. 2019.
78. **EUCAST [European committee on antimicrobial susceptibility testing].** EUCAST guideline for the detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical

and/or epidemiological importance. *European committee on antimicrobial susceptibility testing*. [Online] 11. 7. 2017. [Citace: 28. 2. 2023.] Dostupné z: https://www.eucast.org/resistance_mechanisms.

79. **ŽEMLIČKOVÁ, Helena, a další.** Výskyt Enterobacterales produkujících karbapenemázy (CPE, Carbapenemase-Producing Enterobacterales) v České republice v letech 2014-2019. *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie*. březen 2020.

80. **MZČR [Ministerstvo zdravotnictví České republiky].** Metodický pokn ke kontrole výskytu importovaných případů kolonizace a/nebo infekce enterobakteriemi produkujícími karbapenemázu. *Věstník Ministerstva zdravotnictví České republiky*. 2012.

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – Povolení sběru informací ve FN Plzeň

PŘÍLOHY

Příloha A – Povolení sběru informací ve FN Plzeň



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro vnější vztahy a spolupráci s LF

Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín
IČO 0069806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní

Andrea Lálová

Studentka oboru Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro vnější vztahy a spolupráci s LF Fakultní nemocnice Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných dat a výsledků laboratorních metod, používaných v *Ústavu mikrobiologie (MIKRO) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Rezistence k beta-laktamovým antibiotikům a její detekce v klinické praxi*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vrchní zdravotní laborantka MIKRO souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb.,** o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe a pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je paní **Chudějová Kateřina, Mgr., Ph. D., odborný pracovník v laboratorních metodách a přípravě léčivých přípravků MIKRO FN Plzeň.**

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová

Manažerka pro vzdělávání nelékařů

Útvar náměstkyně pro vnější vztahy a spolupráci s LF

Fakultní nemocnice Plzeň
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín
Tel: 377 103 204 / 377 402 207
E-mail: chabrovas@fnplzen.cz

15. 8. 2022