

## Klinicky významné $\beta$ -laktamázy gramnegativních bakterií: AmpC

Hrabák J.

Ústav mikrobiologie LF UK a FN v Plzni

### Souhrn

$\beta$ -laktamázy jsou nejčastější příčinou rezistence gramnegativních bakterií k  $\beta$ -laktamům. V souvislosti se zavedením cefalosporinů třetí a čtvrté generace do praxe došlo ke vzniku  $\beta$ -laktamáz schopných hydrolyzovat tato antibiotika. Skupina serinových  $\beta$ -laktamáz označovaných jako AmpC (cefalosporinázy) se vyznačuje schopností hydrolyzovat peniciliny, monobaktamy a cefalosporiny všech generací, včetně cefamycinů. V poslední době došlo k nárůstu výskytu enzymů AmpC kódovaných na plazmidu. Spolu s AmpC bývají na stejném mobilním elementu nesené geny zodpovědné za rezistenci k ostatním skupinám antibiotik. Dosud neexistuje spolehlivá rutinní metoda pro diagnostiku AmpC. Článek shrnuje problematiku AmpC, včetně jejich identifikace, interpretace a doporučené léčby infekcí způsobených producenty AmpC.

**Klíčová slova:** rezistence – cefalosporiny –  $\beta$ -laktamázy – enterobakterie – AmpC.

### Summary

#### Hrabák J.: Clinically Important Beta-Lactamases of Gram-Negative Bacteria: AmpC

Beta-lactamases are the most common cause of beta-lactam resistance in Gram-negative bacteria. With third-generation and fourth-generation cephalosporins being introduced into practice, new beta-lactamases have evolved, able to hydrolyze these antibiotics. AmpC-type beta lactamases (cephalosporinases) are serine enzymes with the ability to hydrolyze penicillins, monobactams and cephalosporins of all generations, including cephamycins. Over the last two decades, transferable plasmid-mediated class C beta-lactamases have been reported with increasing frequency. The genes for resistance to other groups of antibiotics are usually carried on the same mobile element as the AmpC genes. A reliable method for AmpC detection in routine diagnosis has not been available yet. The issue of AmpC-type beta lactamases is summarized, including their identification, interpretation of susceptibility test results and recommended treatment of infection caused by AmpC producers.

**Key words:** resistance – cephalosporins – beta-lactamases – enterobacteria – AmpC.

Nejčastější příčinou rezistence gramnegativních bakterií k  $\beta$ -laktamům je hydrolýza těchto antibiotik  $\beta$ -laktamázami [30, 49, 67, 75]. Protože  $\beta$ -laktamy patří mezi nepostradatelná antibiotika při léčbě nejzávažnějších infekcí [38, 39], je studium mechanismů rezistence k této skupině antibiotik důležitou součástí klinicko-mikrobiologického výzkumu. Díky poznání epidemiologie  $\beta$ -laktamáz lze navrhnout vhodná opatření pro zabránění jejich šíření. Poznatky o základních biochemických vlastnostech a struktuře molekul  $\beta$ -laktamáz je možné použít při návrhu inhibitorů, resp. nových modifikací molekul  $\beta$ -laktamů.

Během posledních dvaceti let byl u druhu *Klebsiella pneumoniae* identifikován nový typ  $\beta$ -laktamáz [2, 6, 13, 15, 31, 43, 59, 60, 65, 69, 70, 87, 88, 90] vázaných na plazmidu. Ty jsou inherentně přítomné u některých gramnegativních bakterií, jako např. *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas* spp., *Morganella morganii*, *Serratia marcescens* [4, 5, 26, 48, 54, 55, 57, 65, 68, 80]. Jedná se o typ označovaný jako AmpC. I když je výskyt AmpC vázaných na plazmidu pravděpodobně klinicky a epidemiologicky nejzávažnější právě u druhu *K. pneumoniae*, lze se s ním setkat i u ostatních bakteriálních druhů, jako např. *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica* serovary Typ-himurium, Paratyphi a Enteritidis, *Shigella flexneri* a *Sh. dysenteriae* [5, 12, 17, 24, 32, 47, 56, 84].

Následující souhrnný článek je pokračováním

článku „Klinicky významné  $\beta$ -laktamázy gramnegativních bakterií: širokospektré  $\beta$ -laktamázy (ESBL)“ [38]. Jsou zde shrnuty současné poznatky o  $\beta$ -laktamázách AmpC, jejich epidemiologii a přístupu k léčbě u producentů těchto enzymů.

## Definice

Podle klasifikace Bushové et al. [20, 21] spadají enzymy AmpC do skupiny 1. Podle Amblerovy klasifikace [2] do skupiny C. Jedná se o  $\beta$ -laktamázy se serinem v aktivním místě, hydrolyzující peniciliny, monobaktamy (aztreonam), cefalosporiny s rozšířeným spektrem účinku (cefotaxim, ceftazidim, atp.) a cefamyciny (cefoxitin, cefotetan). Většinou nejsou inhibovány standardními inhibitory  $\beta$ -laktamáz (kyselinou klavulanovou, tazobaktamem a sulbaktamem) [20, 21]. Díky

svému spektru účinku jsou často označovány jako cefalosporinázy.

Opomeneme-li strukturu molekuly, je z výše zmíněné charakteristiky zřejmé, že se od širokospektrých  $\beta$ -laktamáz (ESBL) liší především schopností hydrolyzovat cefamyciny a necitlivostí k inhibitorům [20, 21, 39].

## Inherentní $\beta$ -laktamázy AmpC

V osmdesátých letech minulého století byly popisovány  $\beta$ -laktamázy AmpC inherentně přítomné u celé řady bakteriálních druhů. Jedná se např. o *Acinetobacter* spp. [11, 73], *Bacteroides* spp. [72], *Citrobacter freundii* [48], *Enterobacter aerogenes* [65, 68], *Escherichia coli* [55], *Chromobacterium violaceum* [27], *Lysobacter enzymogenes* [18, 79], *Morganella morganii* [66, 80], *Ochrobactrum anthropi* [58], *Pseudomonas aeruginosa* [44, 57], *Psychrobacter immobilis* [28, 29], *Rhodobacter sphaeroides* [8], *Yersinia*

**Tab. 1.**  $\beta$ -laktamázy AmpC vázané na plazmidu a jejich pravděpodobný původ

**Table 1.** AmpC beta-lactamases found on the plasmid and their probable origin

Bakteriální druh	Název enzymu	Předpokládaný původ	Literatura
<i>K. pneumoniae</i>	MIR-1	<i>E. cloacae</i>	[65]
	CMY-1	<i>P. aeruginosa</i> ?	[61]
	CMY-2	<i>C. freundii</i>	[65]
	CMY-4	<i>C. freundii</i>	[65]
	CMY-8	<i>Aeromonas sobria</i> ?	[65]
	MOX-1	<i>P. aeruginosa</i> ?	[65]
	MOX-2	<i>A. sobria</i> ?	[70]
	DHA-1	<i>M. morganii</i>	[1, 42, 61, 83, 87, 90]
	DHA-2	<i>M. morganii</i>	[31]
	DHA-3	<i>M. morganii</i>	[88]
	FOX-1	<i>A. salmonicida</i> ?	[46]
	FOX-2	<i>P. aeruginosa</i> ?	[65]
	FOX-5	<i>A. salmonicida</i> ?	[1, 69]
	LAT-1	<i>C. freundii</i>	[65]
	LAT-2	<i>C. freundii</i>	[65]
	ACT-1	<i>E. cloacae</i>	[1]
ACC-1	<i>Hafnia alvei</i>	[6, 13, 60]	
<i>K. oxytoca</i>	FOX-3	<i>P. aeruginosa</i>	[65]
	CMY-5	<i>C. freundii</i>	[65]
<i>E. coli</i>	BIL-1	<i>C. freundii</i>	[65]
	LAT-2	<i>C. freundii</i>	[65]
	LAT-3	<i>C. freundii</i>	[65]
	LAT-4	<i>C. freundii</i>	[65]
	ACT-1	<i>E. cloacae</i>	[1]
	ACC-1	<i>H. alvei</i>	[13]
	CMY-2	<i>C. freundii</i>	[1]
	CMY-4	<i>C. freundii</i>	[76]
	FOX-4	<i>A. salmonicida</i> ?	[1, 19]
	FOX-5	<i>P. aeruginosa</i>	[65]
<i>S. senftenberg</i>	CMY-2	<i>C. freundii</i>	[65]
<i>S. enteritidis</i>	DHA-1	<i>M. morganii</i>	[5, 32, 84]
<i>P. mirabilis</i>	CMY-3	<i>C. freundii</i>	[65]
	CMY-4	<i>C. freundii</i>	[48]
	CMY-12	<i>C. freundii</i>	[48]
	CMY-15	<i>C. freundii</i>	[48]
	CMY-16	<i>C. freundii</i>	[3]
	ACC-1	<i>H. alvei</i>	[65]
	DHA-1	<i>M. morganii</i>	[12]

*enterocolitica* [23, 74, 77], *Y. kristensenii* [10, 77], *Y. ruckeri* [52, 77].

### **Inhibitor citlivé enzymy a další atypické $\beta$ -laktamázy typu AmpC**

I když se většina popsaných enzymů AmpC vyznačuje rezistencí k používaným inhibitorům serinových  $\beta$ -laktamáz (k. klavulanové, tazobaktamu a sulbaktamu), byl v roce 2004 popsán enzym, který je citlivý k tazobaktamu a sulbaktamu, méně ke kyselině klavulanové [25]. Popsaný enzym se lišil od inherentně přítomné AmpC druhu *E. coli* substitucí některých aminokyselin a tripeptidovou delecí. Právě zjištěná tripeptidová delece byla zodpovědná za citlivost k inhibitorům [25]. Byť by se podle členění Bushové et al. a Amblera [2, 20] mělo jednat o enzym skupiny 2, resp. A, původem tato  $\beta$ -laktamáza spadá do skupiny 1, resp. C. Zmíněný příklad ukazuje na vzájemnou prostupnost a prolínání jednotlivých skupin  $\beta$ -laktamáz.

U AmpC inherentně přítomné u druhu *Serratia marcescens* byl pozorován fenomén, kdy delece 4 aminokyselin způsobila změnu substrátové specifity [51]. Původní kmen byl rezistentní k penicilinům a cefalosporinům první a druhé generace (včetně cefoxitinu). Nově vzniklý enzym měl schopnost hydrolyzovat ceftazidim, cefepim a cefpirom. Relativně stabilní zůstal ceftriaxon, cefotaxim a aztreonam. Při vyšetření citlivosti nebyla zjištěna žádná synergie mezi cefalosporiny a kyselinou klavulanovou [51].

### **$\beta$ -laktamázy AmpC kódované na plasmidu**

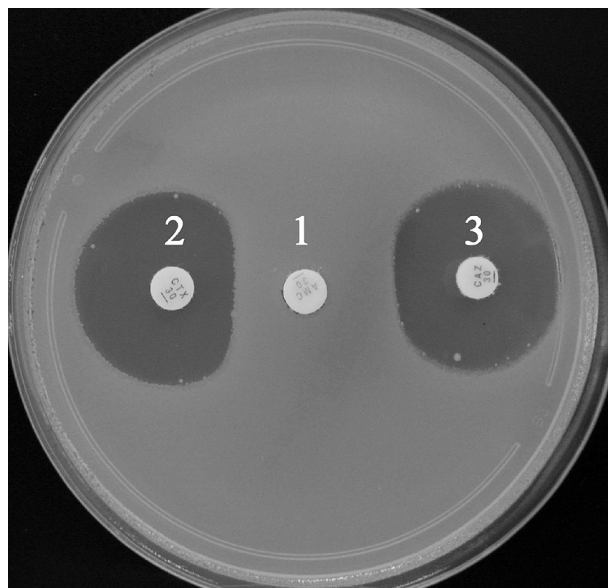
I když byly dlouhou dobu identifikovány pouze inherentní  $\beta$ -laktamázy AmpC, byl poprvé v roce 1976 nalezen u druhu *Proteus mirabilis* enzym vázaný na plasmidu, který byl shodný s AmpC inherentně přítomné u *E. coli* [65]. V roce 1988 byla poprvé u druhu *K. pneumoniae* izolována  $\beta$ -laktamáza nazvaná MIR-1, vykazující 90% shodnost s AmpC popsanou u *E. cloacae* [65]. První průkaz horizontálního přenosu genu kódujícího enzym AmpC na *K. pneumoniae* provedli Bauernfeind et al. v roce 1989 [65]. Jednalo se o enzym označovaný CMY-1 (pro rozšířování zkratk viz [40]).

U některých enzymů AmpC lze jejich původ identifikovat poměrně přesně, neboť vykazují vysoký stupeň podobnosti s inherentními  $\beta$ -laktámázami některých druhů. Jedná se například o enzymy ACT-1 a MIR-1, vykazujícími vysoký stupeň homologie s  $\beta$ -laktámázami druhu *E. cloacae*, CMY-2, CMY-4, CMY-5 a LAT-1 s  $\beta$ -laktámázami druhu *C. freundii*, DHA-1, DHA-2 s  $\beta$ -laktámázami druhu *M. morgani* a ACC-1 s  $\beta$ -laktámázami *Hafnia alvei* [4, 65, 83]. U některých  $\beta$ -laktamáz je však určení jejich fylogeneze

obtížné, neboť vykazují se známými enzymy nízký stupeň homologie. Jedná se např. o MOX-1, CMY-1 a FOX-typy, které mohou mít původ u *A. sobria*, *P. aeruginosa*, resp. u *Serratia marcescens* [7, 65].

### **Inducibilní enzymy a molekulární mechanismy indukce**

Většina enzymů AmpC je inducibilních, tzn. nejsou bez přítomnosti induktorů exprimovány. Jako induktory byly zjištěny subinhibiční koncentrace některých  $\beta$ -laktamů – např. imipenemu, k. klavulanové a cefoxitinu (viz obr. 1) [26, 71]. Mutace v regulačním systému AmpC vedou ke konstitutivní produkci  $\beta$ -laktamáz. Tato změna bývá ireverzibilní [65]. Proces indukce  $\beta$ -laktamáz



**Obr. 1.** Expres  $\beta$ -laktamázy AmpC za přítomnosti induktoru (1 – kyselina klavulanová) – kmen *K. pneumoniae* produkující enzym DHA-1. Dochází k vytvoření typické „D“ zóny v místech, kde je dostatečná koncentrace induktoru – cefalosporin (2 – cefotaxim, 3 – ceftazidim) je v těchto místech hydrolyzován  $\beta$ -laktámázou

**Fig. 1.** Expression of AmpC beta lactamase in the presence of the inducitor (1 - clavulanic acid) in a strain of *K. pneumoniae* producing DHA-1 enzyme. A D zone typically forms where the inducitor is sufficiently concentrated. In this zone, cephalosporin (2 - cefotaxime, 3 - ceftazidime) is hydrolyzed by beta-lactamase

máz AmpC je studován již delší dobu [41, 44, 64, 71]. U druhu *P. aeruginosa* a u příslušníků čeledi *Enterobacteriaceae* byly identifikovány geny zodpovědné za indukci (*AmpD*, *AmpR*, *AmpG*) [44]. Mutace genu *AmpD*, který kóduje negativní regulátor genu *AmpC*, způsobuje hyperprodukcí AmpC u druhu *P. aeruginosa* [44]. Stejný efekt mají i mutace genu *AmpR*. U druhu *P. aeruginosa* jsou mutace genu *AmpR* zodpovědné rovněž za expresi některých faktorů virulence – proteáz,

pyocyaninu, quorum sensing systému, atp. [44].

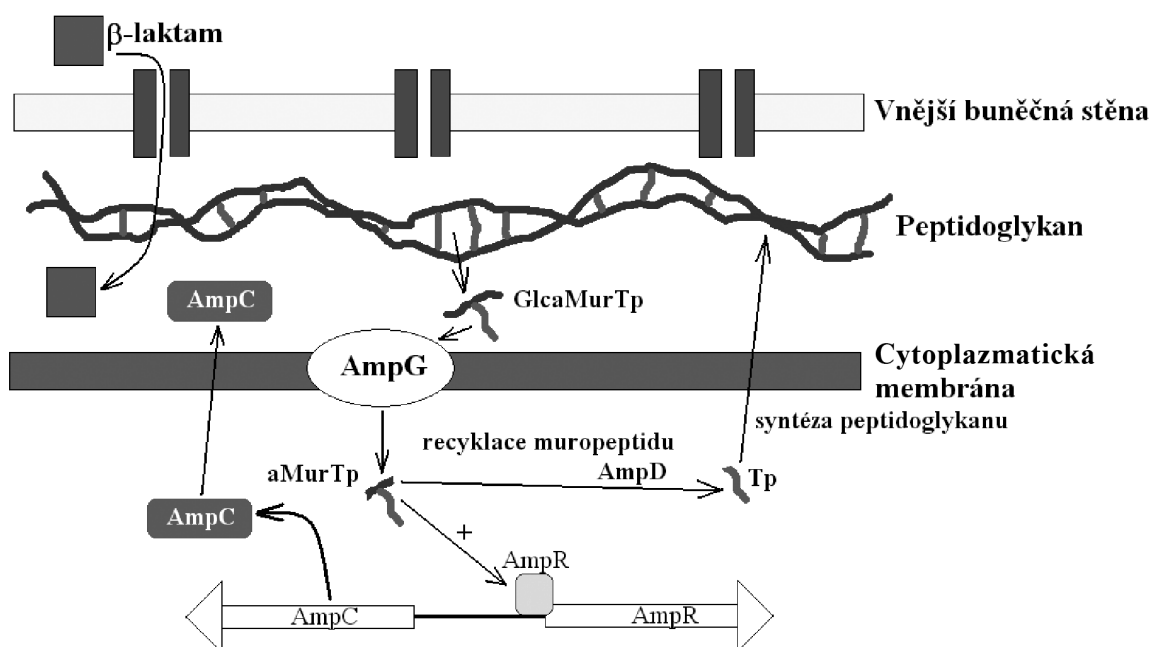
Molekulární mechanismy regulace nejsou dosud plně objasněny [41], ale je předpokládáno, že jako iniciační faktor fungují proteiny vážící penicilin (PBP) [41, 64, 71]. Během působení některých induktorů, např. imipenemu, dochází v periplazmovém prostoru bakteriální buňky k akumulaci určitých částí molekul peptidoglykanu, které spouští signální cestu vedoucí k expresi genu *AmpC* [41].

Úlohu hrají PBP 4, 5 a 6, které jsou zodpovědné za degradaci pentapeptidového řetězce peptidoglykanového prekursoru na tripeptidový. Inhibice zmíněných PBP vede k akumulaci 1,6-anhydromuramyl-pentapeptidu v periplazmovém prostoru. Tato molekula je zodpovědná za konverzi AmpR z represoru na aktivátor (viz obr. 2) [41].

v letech 1998-2003 popsáno jedenáct různých izolátů *K. pneumoniae* (srovnáno pulzní elektroforézou) produkujících enzym DHA-1 a jeden izolát *K. oxytoca* produkující tutéž  $\beta$ -laktamázu. U žádného případu nebyla pozorována konstitutivní produkce [84].

Rozsáhlá epidemiologická studie zabývající se  $\beta$ -laktamázi AmpC byla zpracována v USA [1]. Bylo vyšetřeno celkem 752 kmenů *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* a *E. coli*. AmpC kódované na plasmidu byly detekovány u 8,5 % kmenů *K. pneumoniae*, 6,9 % *K. oxytoca* a 4 % *E. coli*. U zmíněných izolátů byly identifikovány enzymy ACT-1, FOX-5, CMY-2 a DHA-1.

Retrospektivní studie provedená u kmenů *K. pneumoniae* izolovaných z krve v letech 1998-2002 v Jižní Koreji prokázala výskyt AmpC u 7,2 % kmenů (n = 389). Dominantním typem byl



**Obr. 2.** Mechanismus indukce  $\beta$ -laktamázy AmpC (podle [41]). GlcMurTp – GlcNAc-anhMurNAc-tripeptid, aMurTp – anhMurNAc-tripeptid, Tp – tripeptid

**Fig. 2.** Mechanism of AmpC beta lactamase induction (according to [41]) GlcMurTp – GlcNAc-anhMurNAc-tripeptide, aMurTp – anhMurNAc-tripeptide, Tp – tripeptide

### Epidemiologie AmpC

Z popisovaných případů je zřejmé, že celosvětově přibývá případů výskytu AmpC u druhů, u nichž nejsou přítomné inherentně. Jedná se především o *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella* spp. a *P. mirabilis* [1, 65]. Stejně jako v případě producentů ESBL je hlavním rizikovým faktorem dlouhodobá hospitalizace a pobyt pacienta na jednotkách intenzivní péče [65].

Ve většině případů jsou u producentů AmpC popisovány izolované výskyty. V Paříži bylo

enzym DHA-1, dále byl identifikován enzym CMY-1 [61].

V České republice (ČR) je u invazivních izolátů *K. pneumoniae* sledována rezistence k cefalosporinům v rámci projektu Evropské surveillace antibiotické rezistence – EARSS. Aktuální informace lze získat na webové stránce <http://www.earss.rivm.nl>. V roce 2005 byl podíl kmenů rezistentních k cefalosporinů třetí generace 32 %. Dvacet procent kmenů produkovalo ESBL. U 10 % izolátů se jednalo o jiný mechanis-

mus rezistence [82]. Na základě předběžných údajů lze předpokládat, že se v mnoha případech jedná o rezistenci danou produkcí AmpC.

Ve Fakultní nemocnici Plzeň je prováděn průkaz enzymů AmpC u všech gramnegativních tyčiek současně s ESBL (viz metodika [39]). U 72 izolátů *K. pneumoniae* z krve v roce 2006 bylo prokázáno 12,5 % producentů ESBL a 18 % producentů AmpC (Bergerová a Hrabák, nepublikovaná data).

Z výše zmíněných údajů je zřejmé, že se  $\beta$ -laktamázy AmpC stávají důležitým mechanismem rezistence gramnegativních tyčinek k  $\beta$ -laktámům.

Z hlediska prevence šíření AmpC v rámci zdravotnických zařízení lze vycházet z blíže popsané situace u producentů enzymů ESBL [38]. Proto je možné se domnívat, že i u AmpC je bariérový přístup obtížně proveditelný. Důraz je potřeba klást na dodržování zvýšených hygienických opatření [42, 45]. Jako účinné mohou být, stejně jako u producentů ESBL [38], i přísnější pravidla preskripce cefalosporinů vyšších generací a časté cyklování antibiotik.

### Identifikace AmpC v podmínkách rutinní mikrobiologické diagnostiky

Pro základní screening lze použít výsledky vyšetření citlivosti k cefamycinům (cefoxitin). Je-li kmen hodnocen jako rezistentní k cefamycinům, lze předpokládat, že produkuje AmpC. Pro správnou identifikaci je však potřeba vyloučit ostatní možné mechanismy rezistence (např. snížení permeability buněčné stěny, eflux [30, 50]) některou z metod uvedených dále.

V případě inducibilních enzymů AmpC lze využít stejný test jako v případě ESBL – DDST (Double Disk Synergy Test) [26, 39]. Jako pozitivní výsledek je hodnoceno vytvoření charakteristické zóny typu „D“ u cefalosporinů, resp. aztreonamu (viz obr. 1) [26, 39]. Jako induktor je možné použít disk s kyselinou klavulanovou (kombinace amoxicilin/k. klavulanová), popř. disk s imipenemem nebo cefoxitinem [26, 39].

Jestliže je vyšetřovaný kmen konstitutivním producentem AmpC, není možné tímto testem typ rezistence vyhodnotit. Proto byly vyvinuty další metody. Ty jsou založené na průkazu enzymatické degradace cefamycinů (cefoxitin), nebo na specifické inhibici těchto  $\beta$ -laktamáz.

Pro průkaz hydrolýzy cefoxitinu je použitelná metoda, již popsali Black et al. [14]. Při ní je plotna s Muellerovým-Hintonovým (MH) agarem standardně inokulována [22, 81] kmenem *E. coli* dobře citlivým k cefalosporinům. Následně je na plotnu umístěn disk s cefoxitinem (30  $\mu$ g). Těsně vedle něho jsou položeny disky vyrobené z filtračního papíru napuštěné Tris-EDTA pufrem. Na

tyto disky je přímo kličkou inokulována kultura testovaného kmene (viz obr. 3). V pozitivním případě dochází k deformaci inhibiční zóny okolo disku s cefoxitinem [14].

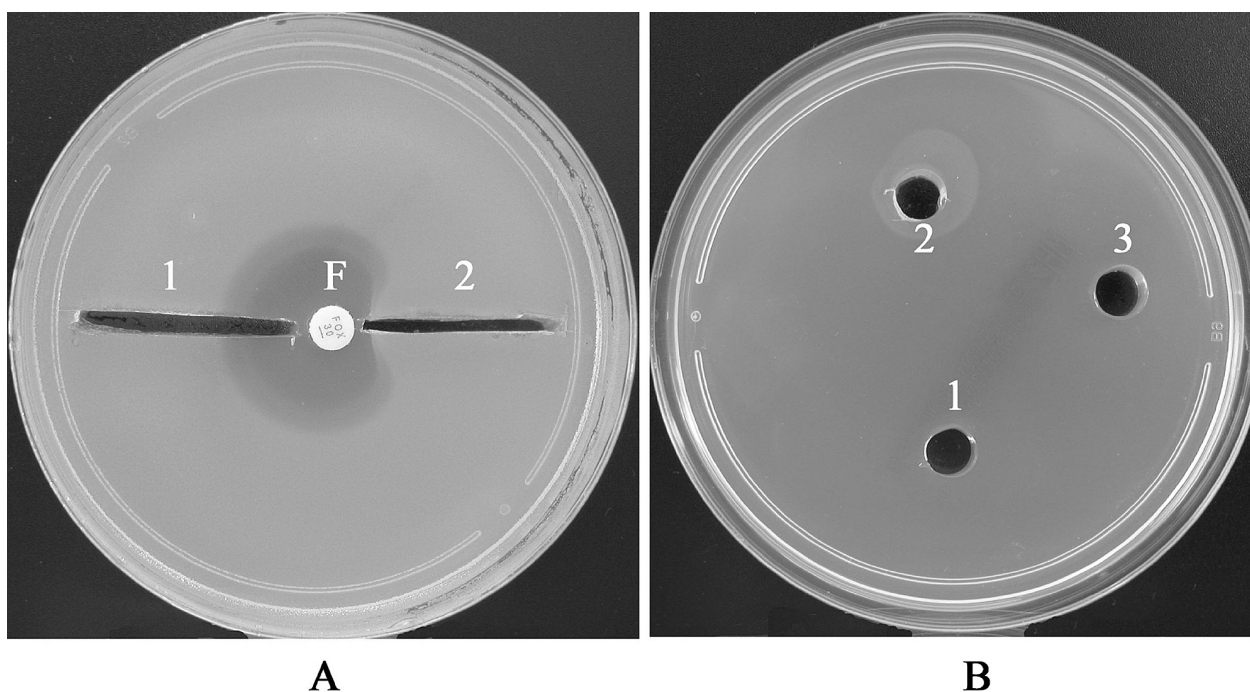


**Obr. 3.** Diskový test pro průkaz  $\beta$ -laktamázy AmpC. F – disk s cefoxitinem (30  $\mu$ g), 1 – disk napuštěný Tris-EDTA pufrem s kontrolním kmenem, 2 – disk s kmenem *K. pneumoniae* produkující  $\beta$ -laktamázu DHA-1 (deformovaná inhibiční zóna okolo disku s cefoxitinem)

**Fig. 3.** Disc test for AmpC beta lactamase detection. F – disc with cefoxitin (30  $\mu$ g), 1 – disc impregnated with tris EDTA buffer with a control strain, 2 – disc with *K. pneumoniae* strain producing DHA-1 beta lactamase (deformed inhibitory zone around the cefoxitin disc)

Další metodou založenou na stejném principu je metoda 3D [59]. Při ní je do středu plotny s MH agarem, standardně inokulované kmenem *E. coli* dobře citlivým k cefalosporinům umístěn disk s cefoxitinem (30  $\mu$ g). Následně je do žlábků směřujících od okraje plotny k cefoxitinovému disku aplikován extrakt připravený z testovaného kmene (viz obr. 4A). Deformace inhibiční zóny okolo disku s cefoxitinem znamená pozitivní výsledek [59]. Obdobnou metodou je použití MH agaru napuštěného cefoxitinem v koncentraci 4 mg/l [59]. Do takto připravené plotny jsou vytvořeny jamky o průměru cca 5–6 mm, a do nich aplikován extrakt z testovaného kmene. Následně je povrch plotny naočkován kmenem *E. coli* dobře citlivým k cefalosporinům (viz obr. 4B). Pozitivním výsledkem je nárůst kmene *E. coli* okolo jamky s extraktem [59].

Problémem obou výše uvedených metod je relativně složitá příprava extraktu z bakteriálních buněk. Ten může být připraven sonikací nebo opakovaným zamrazováním a rozmrazováním [3, 5, 6, 59]. Proto je využití těchto metod v podmínkách rutinní mikrobiologické diagnostiky obtížné.



**Obr. 4.** Průkaz AmpC metodou 3D (A) a na Muellerovu-Hintonovu agaru s cefoxitinem (4 mg/l) (B). F – disk s cefoxitinem (30  $\mu$ g), 1 – kontrolní kmen (negativní kontrola), 2 – kmen *K. pneumoniae* produkující  $\beta$ -laktamázu DHA-1 (deformovaná inhibiční zóna okolo disku s cefoxitinem – A, nárůst citlivého kmene *E. coli* okolo jamky s extraktem – B), 3 – kmen neprodukující AmpC

**Fig. 4.** AmpC detection by the 3D method (A) on Mueller-Hinton (MH) agar with cefoxitin (4mg/l) (B). F – cefoxitin disc (30  $\mu$ g), 1 – control strain (negative control), 2 – a *K. pneumoniae* strain producing DHA-1 beta lactamase (deformed inhibitory zone around the cefoxitin disc. – A, growth of a susceptible *E. coli* strain around the well with the extract – B), 3 – a strain non-producing AmpC

Metody založené na inhibici využívají schopnost některých látek (např. kyselina boritá, kloxacilin) reverzibilně inhibovat enzymy typu AmpC. Test je možné provádět jako obdobu metody DDST pro průkaz produkce ESBL. Místo disku s kombinací amoxicilin/k. klavulanová se použije disk s kyselinou boritou, resp. jejími deriváty (300  $\mu$ g) [89]. Komerčně dostupným je E-test, který využívá srovnání MIC cefalosporinu a kombinace cefalosporin/kyselina boritá [16]. Obdobně lze použít srovnání průměru inhibičních zón u disku s některým cefalosporinem a kombinací cefalosporin/k. boritá (30/400  $\mu$ g) [89]. Je-li rozdíl průměru inhibičních zón ve prospěch disku s kombinací větší nebo roven 5 mm, je kmen hodnocen jako producent AmpC [89]. Metodu lze uplatnit i v mikrodilučním provedení [89]. Zde je srovnávána hodnota MIC u cefalosporinu a kombinace cefalosporin/k. boritá (doporučená koncentrace kyseliny borité je 400 mg/l). Je-li hodnota MIC u cefalosporinu 8 x MIC u kombinace, je kmen hodnocen jako producent AmpC.

Obdobná je i metoda založená na použití specifických inhibitorů  $\beta$ -laktamáz AmpC [15].

Další možností může být použití MH agaru se 128 mg/l kloxacilinu (resp. oxacilinu). Zde se srovnávají průměry inhibičních zón u disků s cefalosporiny na MH agaru s kloxacilinem a MH agaru

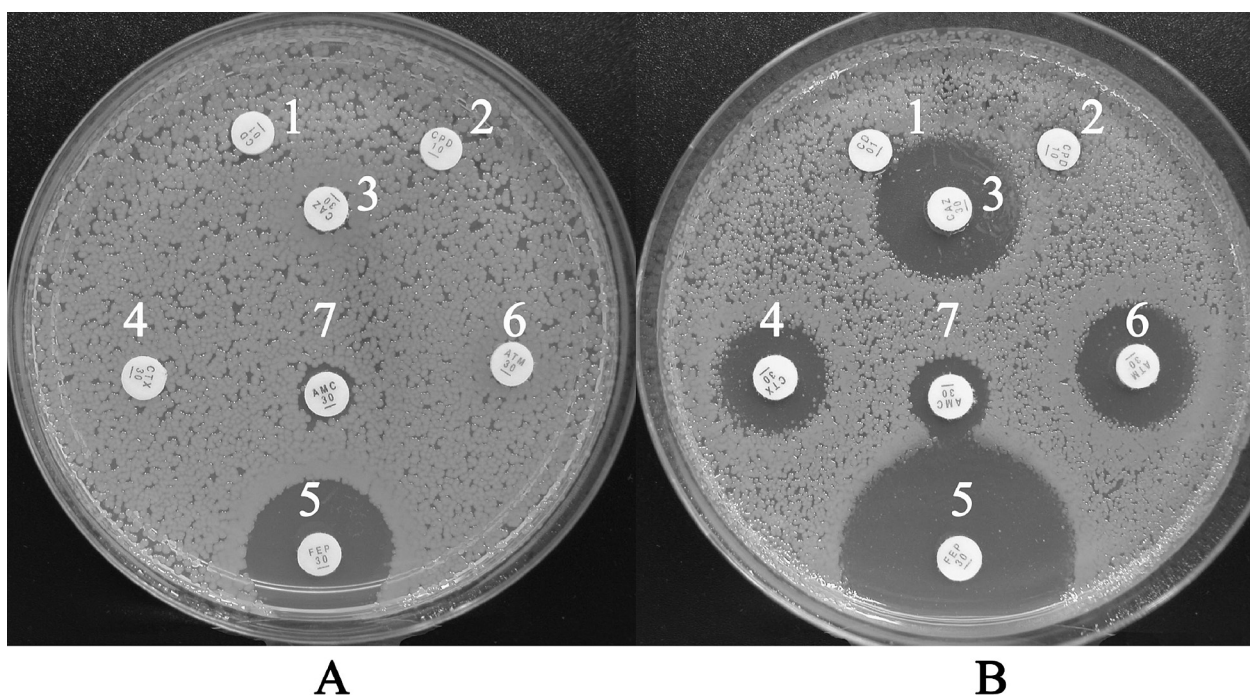
bez kloxacilinu. Výhodou této metody je snadná identifikace ESBL, která může být produkcí AmpC maskována [39].

#### Identifikace AmpC molekulárně-biologickými metodami

Stejně jako při molekulární identifikaci širokospektrých  $\beta$ -laktamáz, patří izoelektrická fokusační metoda mezi základní metody [3, 5, 6, 19, 48, 61]. Charakter AmpC je zjišťován detekcí  $\beta$ -laktamázové aktivity nitrocefinem a směsí nitrocefinu s inhibitorem, obvykle kloxacilinem [48]. Na základě zjištěného izoelektrického bodu lze vybrat vhodné primery pro PCR. Enzym lze identifikovat sekvenací výsledného PCR produktu (produktů).

Vzhledem k dosud popsanému množství enzymů a nižšímu počtu variant než v případě ESBL, lze použít multiplex-PCR [63]. Metoda, kterou navrhli Pérez-Pérez a Hanson [63], umožňuje průkaz AmpC typů MOX-1,2, CMY-1, CMY-2, CMY-7 – CMY-11, LAT-1 – LAT-4, BIL-1, DHA-1, DHA-2, ACC, MIR-1T, ACT-1, FOX-1 – FOX-5b. Jedná se tedy o většinu klinicky významných AmpC.

I přesto nelze podceňovat klasické biochemické metody, neboť ty mohou odhalit přítomnost nových typů  $\beta$ -laktamáz, jejich počet u konkrétního kmene, přítomnost ESBL, atp.



**Obr. 5.** Hyperproducent AmpC – průkaz s využitím srovnání inhibičních zón (IZ) na Muellerovu-Hintonovu (MH) agaru (A) a MH agaru se 128 mg/l oxacilinu (B). 1 – cefpodoxim/k. klavulanová, 2 – cefpodoxim, 3 – ceftazidim, 4 – cefotaxim, 5 – cefepim, 6 – aztreonam, 7 – amoxicilin/k. klavulanová. IZ u cefalosporinů a aztreonamu na MH agaru s oxacilinem signifikantně větší

**Fig. 5.** AmpC hyperproducer – detection based on the comparison of inhibitory zones (IZ) on MH agar (A) and on MH agar with 128 mg/l oxacillin (B). 1 – cefpodoxime/clavulanic acid, 2 – cefpodoxime, 3 – ceftazidime, 4 – cefotaxime, 5 – cefepime, 6 – aztreonam, 7 – amoxicillin/clavulanic acid. Significantly larger IZ observed for cephalosporins and aztreonam on MH agar with oxacillin

Pro molekulárně-epidemiologické srovnání producentů AmpC lze kmeny typizovat dalšími molekulárně-genetickými metodami, jako jsou PFGE a RAPD. Je možné použít veškerou buněčnou i plazmidovou DNA. Metoda RAPD se v bakteriologii považuje spíše za nevhodnou, neboť jediná bodová mutace může změnit kompletní profil fragmentů DNA. Bylo však dokázáno, že v případě gramnegativních tyčků dává relevantní výsledky [36].

Pro stanovení teoretického rizika přenosu genů rezistence lze použít metodu testování horizontálního přenosu DNA konjugací [48].

#### Klinický význam bakterií produkujících AmpC

Klinický význam  $\beta$ -laktamáz AmpC je pravděpodobně zcela srovnatelný s ESBL. U producentů AmpC se výběr vhodných antibiotik jednoznačně omezuje o kombinaci  $\beta$ -laktam/inhibitor, resp. o cefamyciny. Některé inhibitory mohou v případě inducibilních enzymů fungovat jako induktory a cefamyciny jsou hydrolyzovány.

V případě producentů ESBL jsou tyto z definice považovány za rezistentní ke všem  $\beta$ -laktamům kromě karbapenemů, bez ohledu na výsledky vyšetření citlivosti [35]. U producentů AmpC podobný konsenzus dosud neexistuje [78], avšak celá řada studií zabývajících se jejich klinickým významem naznačuje, že by obdobná definice

mohla platit i v těchto případech.

Rozsáhlou prací zabývající se producenty ESBL a AmpC izolovaných z krve publikovali Pai et al. [61]. V souboru se nacházelo 27 pacientů u nichž byla identifikována *K. pneumoniae* produkující AmpC (26 hodnoceno jako nozokomiální infekce) a 25 pacientů s infekcí *K. pneumoniae* produkující ESBL. Obě skupiny byly homogenní z hlediska věku, pohlaví, APACHE II skóre, a primární infekce. Ve skupině producentů AmpC došlo k selhání léčby v 51,9 % případů, v případě ESBL 56 %. Rozdíl nebyl statisticky významný. Bohužel v této práci není přesně definován pojem „selhání léčby“. Ve skupině producentů AmpC, u třinácti případů infekce způsobenými producenty enzymu DHA-1, byl empiricky podán cefalosporin třetí generace (v některých případech v kombinaci s amikacinem), u jednoho případu ciprofloxacín. Následně byla u devíti případů změněna terapie na imipenem. Všichni čtyři pacienti léčení cefalosporinem zemřeli (tři před identifikací patogenu a výsledků vyšetření citlivosti). Ve skupině pacientů, jimž byl podán imipenem zemřeli dva pacienti (n = 9). Ve skupině čtrnácti pacientů u nichž byl izolován kmen *K. pneumoniae* produkující  $\beta$ -laktamázu typu CMY-1 byl empiricky podán v devíti případech cefalosporin třetí generace, v pěti ciprofloxacín nebo imipenem. Jako definitivní terapie byl volen u jedenácti případů cipro-

floxacin nebo imipenem, zbývající pacienti byli léčeni cefalosporinem třetí generace. V každé skupině zemřel jeden pacient.

I když nebyl ve skupině AmpC dosud popsán žádný enzym, který by měl schopnost hydrolyzovat karbapenemy, je rezistence k této skupině  $\beta$ -laktamů u producentů AmpC popisována relativně často [13, 62, 76]. Ta je obvykle dána snížením permeability vnější buněčné stěny [62]. Dále je u producentů AmpC popisována rezistence k ostatním skupinám antibiotik, např. fluorochinolonům, rifampicinu, aminoglykosidům atp., kódovaná pravděpodobně geny nesenými na stejném mobilním elementu jako *AmpC* [65].

Zajímavý případ přenosu genů *AmpC in vivo* a vzniku adaptivní rezistence ke karbapenemům popsal Bidet et al. [13]. Jednalo se o jednoroční dítě, u něhož byla izolována *K. pneumoniae* produkující enzym ACC-1. Pod selekčním tlakem imipenemu došlo ke vzniku rezistence tohoto kmene ke karbapenemům (snížením exprese pórů). Následně byl enzym ACC-1 *in vivo* přenesen na přítomný kmen *E. coli*.

Padilla et al. [62] testovali terapeutickou úspěšnost imipenemu, meropenemu a cefepimu u pneumonií způsobených *K. pneumoniae* produkujících enzym ACT-1 na zvířecím modelu. Všechna tři antibiotika se v modelové situaci jevila jako vhodná a účinně infekci vyléčila.

Další nebezpečí selhání léčby u producentů AmpC spočívá v projevu účinku inokula [43]. Jedná se o jev, kdy minimální inhibiční koncentrace (MIC) není konstantou, ale je závislá na množství přítomných bakterií. Při standardním vyšetření citlivosti je používáno inokulum  $10^5$  CFU/ml [22, 81]. V organismu však může být při infekci koncentrace bakterií i o několik řádů vyšší, a tak přítomná koncentrace antibiotika, byť je kmen hodnocen jako citlivý, nemusí být účinná.

Nebezpečí producentů AmpC lze tedy shrnout v následujících bodech:

1. vznik a šíření  $\beta$ -laktamázy s novým spektrem účinku,
2. šíření rezistence k ostatním skupinám antibiotik vázaných na stejném mobilním elementu jako AmpC,
3. snížení permeability vnější buněčné stěny – vznik rezistence k ostatním skupinám antibiotik, především karbapenemům,
4. projevující se efekt inokula.

Tyto důvody mohou vést k selhání léčby, v krátkodobém pohledu, resp. k šíření nových typů rezistence v prostředí z hlediska dlouhodobého pohledu.

### Terapeutická doporučení

U producentů AmpC se lze velmi často setkat s rezistencí k chinolonům. Ta může být podmíně-

na přítomností genů způsobujících rezistenci k chinolonům [53] na stejném mobilním elementu jako *AmpC*. Proto antibiotika této skupiny nelze považovat za léky volby.

U producentů inducibilních enzymů je diskutována možnost podání  $\beta$ -laktamu, který je sice  $\beta$ -laktamázu hydrolyzován, ale kmen se při standardním vyšetření citlivosti jeví jako citlivý. Při podání takového antibiotika však může s vysokou pravděpodobností dojít k derepresi genu *AmpC*, a tedy konstitutivní produkci enzymu a následně možnému selhání léčby [61, 90]. Proto tuto alternativu nelze při těžších infekcích doporučit.

Otázkou je podání cefalosporinů čtvrté generace (cefepimu, cefpiromu). V řadě případů jsou producenti AmpC hodnoceni jako citliví k této skupině cefalosporinů, což potvrzují i četné biochemické studie zabývající se kinetikou enzymů AmpC [9, 33, 34, 57]. I v případě cefepimu byl však prokázán efekt inokula [43]. Proto je při této alternativě nutno posuzovat každý případ individuálně.

U producentů inducibilních enzymů lze zvážit podání cefalosporinů 3. a 4. generace pouze u kmenů izolovaných z močových cest. V ostatních případech se podání těchto antibiotik nedoporučuje [49]. Zde lze jako léky volby použít karbapenemy, popř. fluorochinolony (je-li kmen podle standardních kritérií hodnocen jako citlivý). V krajních případech, při rezistenci ke karbapenemům a jiným antibiotikům, lze použít polymyxiny (polymyxin B, kolistin) [86]. Je potřeba vyhýbat se kombinacím s inhibitory (především k. klavulanové). V případě podání karbapenemů je nutné během léčby monitorovat vznik adaptivní rezistence pravidelnými screeny.

Další možností při léčbě závažných infekcí způsobených producenty ESBL a AmpC by mohlo být použití parenterálního glycylycyklinového antibiotika – tigecyklinu. Hawkey a Finch [37] jej doporučují k použití proti problematickým gramnegativním nozokomiálním patogenům (producenti ESBL, AmpC, multirezistentní pseudomonády, atp.).

Stejně tak jsou i vyvíjeny inhibitory, popř.  $\beta$ -laktamy, které by specificky inhibovaly enzymy skupiny AmpC [14, 85]. Jejich využití v klinické praxi však nelze v blízké budoucnosti očekávat.

### Závěr

Dlouhou dobu nebyly  $\beta$ -laktamázy skupiny AmpC pokládány za klinicky závažný typ rezistence gramnegativních bakterií k  $\beta$ -laktamům. I když v této skupině nebyl zatím popsán enzym, který by byl schopný hydrolyzovat karbapenemy, je rezistence k těmto antibiotikům relativně častá, daná sníženou permeabilitou vnější buněčné stěny (sní-



žením exprese porů). U infekcí způsobených takovými kmeny je léčba krajně obtížná, obvykle odkázaná pouze na polymyxiny [86]. V České republice pravděpodobně poměr  $\beta$ -laktamáz typu AmpC a ESBL u gramnegativních tyčinek narůstá ve prospěch AmpC. V některých případech je již produkce AmpC stejně závažným problémem jako ESBL. Je proto nutné se na tento typ rezistence zaměřit, sledovat evoluční vztahy mezi jednotlivými enzymy, dodržovat správné zásady antibiotické politiky a navrhnout vhodná hygienická opatření ve zdravotnických zařízeních tak, aby nedocházelo k dalšímu šíření tohoto nebezpečného typu rezistence.

### Poděkování

Děkuji prim. MUDr. Tamaře Bergerové a RNDr. Pavle Urbáškové, CSc. za pomoc a cenné připomínky k rukopisu.

### Literatura

1. Alvarez, M., Tran, J.H., Chow, N., Jacoby, G.A. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48, 533-537.
2. Ambler, R.P. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Phil Trans R Soc Lond Biol*, 1980, 289, 321-331.
3. Andrea, M.M.D., Nucleo, E., Luzzaro, F., Giani, T. et al. CMY-16, a novel acquired AmpC-type  $\beta$ -lactamase of the CMY/LAT lineage in multifocal monophyletic isolates of *Proteus mirabilis* from Northern Italy. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50, 618-624.
4. Barlow, M., Hall, B.G. Origin and evolution of the AmpC  $\beta$ -lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46, 1190-1198.
5. Barnaud, G., Arlet, G., Verdet, Gh., Gaillot, O. et al. *Salmonella enteritidis*: AmpC plasmid-mediated inducible  $\beta$ -lactamase (DHA-1) with an *ampR* gene from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42, 2352-2358.
6. Bauernfeind, A., Schneider, I., Jungwirth, R., Sahly, H. et al. Novel type of AmpC  $\beta$ -lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43, 1924-1931.
7. Bauernfeind, A., Stemmlinger, I., Jungwirth, R., Wilhelm, R. et al. Comparative characterization of the cephamycinase *bla*<sub>CMY-1</sub> gene and its relationship with other  $\beta$ -lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40, 1926-1930.
8. Baumann, M., Simon, H., Schneider, K.-H., Danneel, H.-J. et al. Susceptibility of *Rhodobacter sphaeroides* to  $\beta$ -lactam antibiotics: isolation and characterization of a periplasmic  $\beta$ -lactamase (cephalosporinase). *J Bacteriol* 1989, 171, 308-313.
9. Bauvois, C., Ibuka, A.S., Celso, A., Alba, J. et al. Kinetic properties of four plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49, 4240-4246.
10. Bejar, V., Calvo, C., Ramos Cormenzana, A. In vitro susceptibility of *Yersinia kristensenii* strains to beta-lactam antibiotics. *Ann Inst Pasteur Microbiol*, 1986, 137, 169-177.
11. Beceiro, A., Dominguez, L., Ribera, A., Vila, J. et al. Molecular characterization of the gene encoding a new AmpC  $\beta$ -lactamase in a clinical strain of *Acinetobacter genomic species 3*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48, 1374-1378.
12. Bidet, P., Verdet, C., Gautier, V., Bingen, E. et al. First description of DHA-1 AmpC beta-lactamase in *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Infect*, 2005, 11, 591-592.
13. Bidet, P., Burghoffer, B., Gautier, V., Brahimi, N. et al. In Vivo transfer of plasmid-encoded ACC-1 AmpC from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in an infant and selection of impermeability to imipenem in *K. pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49, 3562-3565.
14. Black, J.A., Moland, E.S., Thomson, K.S. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC  $\beta$ -lactamases. *J Clin Microbiol*, 2005, 43, 3110-3113.
15. Black, J.A., Thomson, K.S., Buynak, J.D., Pitout, J.D.D. Evaluation of  $\beta$ -lactamase inhibitors in disk tests for detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in well-characterized clinical strains of *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol*, 2005, 43, 4168-4171.
16. Bolmström, A., Engelhardt, A., Bylund, L., Ho, P. et al. Evaluation of two new E-test strips for AmpC detection. *ICAAC*, 2006, D-0451.
17. Bonnet, R., Chanal, C., Ageron, E., Sirot, D. et al. Inducible AmpC  $\beta$ -lactamase of a new member *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46, 3316-3319.
18. Boras, G.J., Au, S., Roy, K.L., von Tigerstrom, R.G. Beta-lactamase of *Lysobacter enzymogenes*: cloning, characterization and expression of the gene and comparison of the enzyme to other lactamases. *J Gen Microbiol*, 1993, 139, 1245-1252.
19. Bou, G., Oliver, A., Ojeda, M., Monzón, C. et al. Molecular characterization of FOX-4, a new AmpC-type plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase from an *Escherichia coli* strain isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44, 2549-2553.
20. Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39, 1211-1233.
21. Bush, K., Singer, S.B. Biochemical characteristics of extended broad spectrum  $\beta$ -lactamases. *Infection*, 1989, 17, 429-433.
22. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth informational supplement. CLSI Document M100-S-16, PA, USA, 2006.
23. Cornelis, G. Distribution of beta-lactamases A and B in some groups of *Yersinia enterocolitica* and their role in resistance. *J Gen Microbiol*, 1975, 91, 391-402.
24. Coudron, P.E. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol*, 2005, 43, 4163-4167.
25. Doi, Y., Wachino, J., Ishiguro, M., Kurokawa, H. et al. Inhibitor-sensitive AmpC  $\beta$ -lactamase variant produced by an *Escherichia coli* clinical isolate resistant to oxyiminocephalosporins and cephamycins. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48, 2652-2658.
26. Dunne, W.M., Hardin, D.J. Use of several inducer and substrate antibiotic combinations in a disk

- approximation assay format to screen for AmpC induction in patient isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., and *Serratia* spp. *J Clin Microbiol*, 2005, 43, 5945-5949.
27. **Farrar, W.E., O'Dell, N.M.** Beta-lactamase activity in *Chromobacterium violaceum*. *J Infect Dis*, 1976, 134, 290-293.
  28. **Feller, G., Sonnet, P., Gerday, Ch.** The  $\beta$ -lactamase secreted by the antarctic psychrophile *Psychrobacter immobilis* A8. *Appl Environment Microbiol*, 1995, 61, 4474-4476.
  29. **Feller, G., Zekhnini, Z., Lamotte-Brasseur, J., Gerday, C.** Enzymes from cold-adapted microorganisms. The class C beta-lactamase from the antarctic psychrophile *Psychrobacter immobilis* A5. *Eur J Biochem*, 1997, 244, 186-191.
  30. **Finch, R.G.** Antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*, 1998, 42, 125-128.
  31. **Fortineau, N., Poirel, L., Nordmann, P.** Plasmid-mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 from *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 47, 207-210.
  32. **Gaillot, O., Clément, C., Simonet, M., Philippon, A.** Novel transferable  $\beta$ -lactam resistance with cephalosporinase characteristics in *Salmonella enteritidis*. *J Antimicrob Chemother*, 1997, 39, 85-87.
  33. **Galleni, M., Amicosante, G., Frère, J.-M.** A survey of the kinetic parameters of class C  $\beta$ -lactamases. Cephalosporins and other  $\beta$ -lactam compounds. *Biochem J*, 1998, 255, 123-129.
  34. **Galleni, M., Frère, J.-M.** A survey of the kinetic parameters of class C  $\beta$ -lactamases. *Penicillins Biochem J*, 1998, 255, 119-122.
  35. **Gniadkowski, M.** Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microb Infect*, 2001, 7, 597-608.
  36. **Gori, A., Espinase, F., Deplano, A., Nonhoff, C. et al.** Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified DNA polymorphism analysis for typing extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol*, 1996, 34, 2448-2453.
  37. **Hawkey, P., Finch, R.** Tigecycline: in-vitro performance as a predictor of clinical efficacy. *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13, 354-362.
  38. **Hrabák, J.** Klinicky významné  $\beta$ -laktamázy gramnegativních bakterií: širokospektré  $\beta$ -laktamázy (ESBL). *Epid mikrob imunol*, 2007, 56, 3, 103-111.
  39. **Hrabák, J., Vaniš, V., Bergerová, T., Urbášková, P.** Průkaz  $\beta$ -laktamáz širokého spektra (ESBL) a typu AmpC u enterobakterií. *Zprávy CEM*, 2007, 16, 31-36.
  40. **Jacoby, G.A.**  $\beta$ -lactamase nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50, 1123-1129.
  41. **Jacobs, Ch., Frère, J.-M., Normark, S.** Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible  $\beta$ -lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell* 1997, 88, 823-832.
  42. **Kang, C.I., Kim, S.H., Park, W.B., Lee K.D. et al.** Bloodstream infections due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for mortality and treatment outcome, with special emphasis on antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48, 4574-4581.
  43. **Kang, Ch.-I., Pai, H., Kim, S.-H., Kim, H.-B. et al.** Cefepime and the inoculum effect in tests with *Klebsiella pneumoniae* producing plasmid-mediated AmpC-type  $\beta$ -lactamase. *J Antimicrob Chemother*, 2004, 54, 1130-1133.
  44. **Kong, K.-F., Jayawardena, S.R., Indulkar, S.D., del Puerto, A. et al.** *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB  $\beta$ -lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49, 4567-4575.
  45. **Lautenbach, E., Patel, J.B., Bilker, W.B., Edelstein, P.H. et al.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis*, 2001, 32, 1162-1171.
  46. **Leiza, M.G., Perez-Diaz, J.C., Ayala, J., Casellas, J.M. et al.** Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase with two molecular variants. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 38, 2150-2157.
  47. **Liebana, E., Batchelor, M., Clifton-Hadley, F.A., Davis, R.H. et al.** First report of *Salmonella* isolates with the DHA-1 AmpC  $\beta$ -lactamase in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48, 4492.
  48. **Literacka, E., Empel, J., Baraniak, A., Sadowy, E. et al.** Four variants of the *Citrobacter freundii* AmpC-type cephalosporinases, including novel enzymes CMY-14 and CMY-15, in a *Proteus mirabilis* clone widespread in Poland. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48, 4136-4143.
  49. **Livermore, D.M.**  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microb Rev*, 1995, 8, 557-584.
  50. **Livermore, D.M., Winstanley, T.G., Shannon, K.P.** Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48, 87-102.
  51. **Mammeri, H., Poirel, L., Bemer, P., Drugeon, H. et al.** Resistance to cefepime and ceftiprome due to a 4-amino-acid deletion in the chromosome-encoded AmpC  $\beta$ -lactamase of a *Serratia marcescens* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48, 716-720.
  52. **Mammeri, H., Poirel, L., Nazik, H., Nordmann, P.** Cloning and functional characterization of the ambler class C beta-lactamase of *Yersinia ruckeri*. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 257, 57-62.
  53. **Martinez-Martinez, L., Pascal, A., Jacoby, G.A.** Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 1998, 351, 797-799.
  54. **Massidda, O., Rossolini, G.M., Satta, G.** The *Aeromonas hydrophila* *cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo- $\beta$ -lactamases. *J Bacteriol*, 1991, 173, 4611-4617.
  55. **Minami, S., Inoue, M., Mitsuhashi, S.** Purification and properties of cephalosporinase in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1980, 18, 77-80.
  56. **Morosini, M.I., Ayala, J.A., Baquero, F., Martínez, J.L. et al.** Biological cost of AmpC production for *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44, 3137-3143.
  57. **Murata, T., Minami, S., Yasuda, K., Iyobe, S. et al.** Purification and properties of cephalosporinase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antibiot*, 1981, 34, 1167-1170.
  58. **Nadjar, D., Labia, R., Cerceau, C., Bizet, Ch. et al.** Molecular characterization of chromosomal class C  $\beta$ -lactamase and its regulatory gene in *Ochrobactrum anthropi*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45, 2324-2330.
  59. **Nasim, K., Elsayed, S., Pitout, J.D.D., Conly, J. et al.** New method for laboratory detection of AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol*, 2004, 42, 4799-4802.

60. **Ohana, S., Leflon, V., Ronco, E., Rottman, M. et al.** Spread of a *Klebsiella pneumoniae* strain producing a plasmid-mediated ACC-1 AmpC  $\beta$ -lactamase in a teaching hospital admitting disabled patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49, 2095-2097.
61. **Pai, H., Kang, Ch.-I., Byeon, J.-H., Lee, K.-D. et al.** Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 3720-3728.
62. **Padilla, E., Alonso, D., Doménech-Sánchez, A., Gomez, C. et al.** Effect of porins and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases on the efficacy of  $\beta$ -lactams in rat pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50, 2258-2260.
63. **Pérez-Pérez, F.J., Hanson, N.D.** Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 2002, 40, 2153-2162.
64. **Pfeifle, D., Janas, E., Wiedemann, B.** Role of penicillin-binding proteins in the initiation of the AmpC  $\beta$ -lactamase expression in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44, 169-172.
65. **Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G.A.** Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46, 1-11.
66. **Poirel, L., Guibert, M., Girlich, D., Naas, T. et al.** Cloning, sequence analysis, expression, and distribution of *ampC-ampR* from *Morganella morganii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43, 769-776.
67. **Poole, K.** Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *CMLS*, 2004, 61, 2200-2223.
68. **Preston, K.E., Radomski, Ch.C.A., Venezia, R.A.** Nucleotide sequence of the chromosomal *ampC* gene of *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44, 3158-3162.
69. **Queenan, A.M., Jenkins, S., Bush, K.** Cloning and biochemical characterization of FOX-5, an AmpC-type plasmid-encoded  $\beta$ -Lactamase from a New York City *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45, 3189-3194.
70. **Raskine, L., Borrel, I., Barnaud, G., Boyer, S. et al.** Novel plasmid-encoded class C  $\beta$ -lactamase (MOX-2) in *Klebsiella pneumoniae* from Greece. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46, 2262-2265.
71. **Sanders, Ch.C., Bradford, P.A., Ehrhardt, A.F., Bush, K. et al.** Penicillin-binding proteins and induction of AmpC  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41, 2013-2015.
72. **Sato, K., Matsuura, Y., Miyata, K., Inoue, M. et al.** Characterization of cephalosporinases from *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Bacteroides vulgatus*. *J Antibiot*, 1983, 36, 76-85.
73. **Segal, H., Nelson, E.C., Elisha, B.G.** Genetic environment and transcription of *ampC* in an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48, 612-614.
74. **Seoane, A., Francia, M.V., Lobo, J.M.G.** Nucleotide sequence of the *ampC-ampR* region from the chromosome of *Yersinia enterocolitica*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, 36, 1049-1052.
75. **Siu, L.K.** Antibiotics: action and resistance in gram-negative bacteria. *J Microbiol Immunol Infect*, 2002, 35, 1-11.
76. **Stapleton, P.D., Shannon, K.P., French, G.L.** Carbapenem resistance in *Escherichia coli* associated with plasmid-determined CMY-4  $\beta$ -lactamase production and loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43, 1206-1210.
77. **Stock, I., Henrichfreise, B., Wiedemann, B.** Natural antibiotic susceptibility and biochemical profiles of *Yersinia enterocolitica*-like strains: *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. aldovae* and *Y. ruckeri*. *J Med Microbiol*, 2002, 51, 56-69.
78. **Thomson, K.S.** Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7, 333-336.
79. **von Tigerstrom, R.G., Boras, G.J.** Beta-lactamase of *Lysobacter enzymogenes*: induction, purification and characterization. *J Gen Microbiol*, 1990, 136, 521-527.
80. **Toda, M., Inoue, M., Mitsuhashi, S.** Properties of cephalosporinase from *Pseudomonas morganii*. *J Antibiot*, 1981, 34, 1469-1475.
81. **Urbášková, P.** Rezistence bakterií k antibiotikům. Vybrané metody. Praha: Trios, 1998.
82. **Urbášková, P., Jakubů, V., Žemličková, H., Macková, B. a CZ-EARSS.** Rezistence k antibiotikům u sedmi druhů invazivních bakterií, sledovaných v rámci EARSS v České republice v letech 2000 – 2006. *Prakt Lék*, 2007, 87, 32-39.
83. **Verdet, Ch., Benzerara, Y., Gautier, V., Adam, O. et al.** Emergence of DHA-1-producing *Klebsiella* spp. in the Parisian region: genetic organization of the *ampC* and *ampR* genes originating from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50, 607-617.
84. **Verdet, Ch., Arlet, G., Barnaud, G., Lagrange, P.H. et al.** A novel integron in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, carrying the *bla*<sub>DHA-1</sub> gene and its regulator gene *ampR*, originated from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44, 222-225.
85. **Vilar, M., Galleni, M., Solmajer, T., Turk, B. et al.** Kinetic study of two novel enantiomeric tricyclic  $\beta$ -lactams which efficiently inactivate class C  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45, 2215-2223.
86. **Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L., Nordmann, P.** Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microb Rev*, 2005, 18, 306-325.
87. **Wei, Z.-Q., Chen, Y.-G., Yu, Y.-S., Lu, W.-X. et al.** Nosocomial spread of multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* containing a plasmid encoding multiple  $\beta$ -lactamases. *J Med Microbiol*, 2005, 54, 885-888.
88. **Wu, L.-T., Hung, S.-W., Chuang, Y.-C., Chen, H.-E. et al.** Identification of a novel cephalosporinase (DHA-3) in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Taiwan. *Clin Microb Infect*, 2005, 11, 893-897.
89. **Yagi, T., Wachino, J., Kurokawa, H., Suzuki, S. et al.** Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, 2005, 43, 2551-2558.
90. **Yan, J.-J., Ko, W.-Ch., Jung, Y.-Ch., Chuang, Ch.-L. et al.** Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Isolates producing inducible DHA-1  $\beta$ -lactamase in University Hospital in Taiwan. *J Clin Microbiol*, 2002, 40, 3121-3126.

Do redakce došlo 26. 6. 2007

Ing. J. Hrabák  
Ústav mikrobiologie LF UK a FN  
Dr. E. Beneše 13  
305 99 Plzeň  
e-mail: Jaroslav.Hrabak@lfp.cuni.cz