

Fakultní nemocnice Královské Vinohrady
Ústav laboratorní diagnostiky



ATESTAČNÍ PRÁCE

Bakterie rodu *Acinetobacter* u popáleninových pacientů ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady

Vypracovala: MUDr. Marta Fridrichová

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Alexandr Nemeč, Ph.D. et Ph.D.

Vzdělávací program: Lékařská mikrobiologie

Datum: 30. 1. 2019

Prohlášení autora:

Prohlašuji, že jsem atestační práci „Bakterie rodu *Acinetobacter* u popáleninových pacientů ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady“ vypracovala samostatně s využitím zdrojů uvedených v seznamu použité literatury.

V Praze dne 30. 1. 2019

.....

MUDr. Marta Fridrichová

Prohlášení školitele:

Potvrzuji, že tato práce splňuje věcné i formální náležitosti atestační práce v oboru lékařské mikrobiologie a že ji autorka vypracovala samostatně. Souhlasím se zněním atestační práce a doporučuji ji k obhajobě.

V Praze dne 30. 1. 2019

.....

Prof. RNDr. Alexandr Nemeč, Ph.D. et Ph.D.

OBSAH

1. SOUHRN	6
2. ÚVOD	7
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
3.1. Rod <i>Acinetobacter</i>	8
3.1.1. Vlastnosti a výskyt	8
3.1.2. Taxonomie a identifikace	8
3.1.3. Lékařský význam	9
3.1.4. Rezistence k antibiotikům a epidemické klony	10
3.1.5. Mechanizmy rezistence k antibiotikům	11
3.2. Problematika popálenin	13
3.2.1. Kůže a kožní mikroflóra	13
3.2.2. Popáleninové trauma a osídlování popálených ploch	13
3.2.3. Druh infekce popálené plochy dle kritérií American Burn Association ..	14
4. CÍLE	15
5. MATERIÁL A METODIKA	16
5.1. Soubory bakterií	16
5.2. Odběr materiálu	16
5.2.1. Stěry a výtěry	16
5.2.2. Otisková metoda	16
5.3. Kultivace	17
5.4. Identifikace mikroorganismů	17
5.4.1. MALDI-TOF MS	17
5.4.2. Identifikace <i>A. baumannii</i> průkazem genu pro OXA-51	18
5.4.3. Metabolická profilace	18
5.5. Stanovení citlivosti k antibiotikům	19
5.5.1. Diskový difúzní test	19
5.5.2. Mikrodiluční metoda (kolistin)	20
5.6. Genotypizace	20
5.6.1. Identifikace epidemických klonů ECI a ECII pomocí multiplexové PCR	20

5.6.2. Epidemiologická genotypizace pomocí makrorestrikční analýzy	21
5.6.3. Průkaz genů rezistence pomocí PCR	21
6. VÝSLEDKY	22
6.1. Přehled mikroorganismů izolovaných u popálených pacientů	22
6.2. Analýza izolátů <i>Acinetobacter</i> spp.	23
6.2.1. Epidemiologické údaje	23
6.2.2. Druhová identifikace	23
6.2.3. Citlivost na antibiotika	27
6.2.4. Epidemiologická typizace a epidemické klony	28
6.2.5. Klinický význam izolátů	30
6.3. Analýza epidemické epizody z roku 2012	31
6.3.1. Popis případu	31
6.3.2. Mikrobiologická analýza	32
7. DISKUZE	34
8. ZÁVĚR	39
9. LITERATURA	40

Seznam použitých zkratk

ABA	<i>American Burn Association</i>
ACB	<i>Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standart Institute</i>
ECI	Epidemický klon I (<i>Epidemic Clone I</i>)
ECII	Epidemický klon II (<i>Epidemic Clone II</i>)
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FNKV	Fakultní nemocnice Královské Vinohrady
JIP	Jednotka intenzivní péče
KPM	Klinika popáleninové medicíny
LBG	Laboratoř bakteriální genetiky
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of-Flight Mass Spectrometry</i>)
MBL	Metalo- β -laktamáza (<i>Metallo-β-Lactamase</i>)
MDR	Multirezistentní (<i>MultiDrug-Resistant</i>)
MIC	Minimální inhibiční koncentrace (<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>)
MLST	Multilokusová sekvenční typizace (<i>Multilocus sequence Typing</i>)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> rezistentní k meticilinu (<i>Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus</i>)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFGE	Gelová elektroforéza v pulzním poli (<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>)
SZÚ	Státní zdravotní ústav
WHO	Světová zdravotnická organizace (<i>World Health Organization</i>)
XDR	Extenzivně rezistentní (<i>Extensively Drug-Resistant</i>)

1. SOUHRN

Cílem práce bylo definovat populaci bakterií rodu *Acinetobacter* izolovaných na Klinice popáleninové medicíny (KPM) Fakultní nemocnice Královské Vinohrady (FNKV) s ohledem na druhovou identitu, citlivost na antibiotika, klinický význam a epidemiologické souvislosti.

Prospektivní sběr probíhal od 1. 2. do 15. 12. 2018; studovány byly navíc izoláty zachycené při epidemické epizodě v roce 2012. Druhová identifikace byla založena na MALDI-TOF MS s identifikační databází zahrnující všechny druhy rodu, průkazu genu specifického pro *A. baumannii* a metabolické profilaci. Pro epidemiologickou genotypizaci byla využita multiplexová PCR a makrorestrikční analýza. Konvenční vyšetření citlivosti bylo doplněno o průkaz genů rezistence. Práce byly realizovány na Ústavu laboratorní diagnostiky FNKV a v Laboratoři bakteriální genetiky ve Státním zdravotním ústavu.

V roce 2018 bylo izolováno 52 acinetobakterů, tj. 2,56 % z celkového počtu izolovaných mikroorganismů a 10 % z gramnegativních bakterií. Tyto izoláty byly zařazeny do *A. pittii* (15 izolátů), *A. baumannii* (11), *A. lwoffii* (9), *A. ursingii* (6), *A. courvalinii* (3) a *A. junii* (2); po jednom izolátu zahrnovaly *A. haemolyticus*, *A. indicus*, *A. radioresistens*, *A. schindleri*, *A. seifertii* a *A. townneri*. Kauzální role acinetobakterů na manifestní infekci ani jejich epidemické šíření na KPM nebyly prokázány. Vyjma tří extenzivně rezistentních (XDR) a dvou multirezistentních (MDR) *A. baumannii*, byly všechny izoláty dobře citlivé na antibiotika. XDR izoláty nesly geny pro karbapenemázu OXA-23 a metylázu ArmA a patřily ke globálnímu epidemickému klonu ECII. Epidemickou epizodu z roku 2012 způsobil MDR kmen *A. baumannii* introdukovaný na KPM repatriovaným pacientem, který posléze infikoval dalších šest pacientů.

Lze shrnout, že i navzdory relativně nízkému výskytu na KPM v roce 2018 představují bakterie rodu *Acinetobacter* riziko pro hospitalizované pacienty s popáleninami, jak dokládá výskyt XDR kmenů i epidemická epizoda v roce 2012.

2. ÚVOD

Infekce postižených tkání jsou závažnou překážkou bránící v zotavení pacientů s popáleninami, jež se podílejí až 75 % na jejich úmrtí. Poškození funkce kůže jako ochranné bariéry a narušení humorální a buněčné imunity vede k rychlé kolonizaci mikroorganismy. Invasivní diagnostické a léčebné výkony včetně postupů umožňující přenos mikrobů z gastrointestinálního traktu přispívají ke zvyšování incidence infekcí u pacientů s popáleninovým traumatem.

Těžce popáleného pacienta čeká každodenní konfrontace s řadou mikrobiálních patogenů. Historicky původně nejobávanější a nejčastější *Staphylococcus aureus* později doplnily gramnegativní bakterie, které dnes představují hlavní hrozbu pro pacienty. Významnou roli v infekcích popálených pacientů mají dnes gramnegativní bakterie rodu *Acinetobacter*, zejména pak druh *Acinetobacter baumannii*. Tyto mikroorganismy byly ještě v 70. letech minulého století považovány za součást neškodné kmenzálí flóry. V 80. letech se však jejich lékařský význam mění a acinetobaktery se postupně stávají jedněmi z nejvýznamnějších původců nemocničních infekcí. Vděčí za to především své schopnosti vyvíjet rezistenci ke všem klinicky využitelným antibiotikům a přežívat i šířit se v nemocničním prostředí. Obtíže s léčbou infekcí vyvolaných multirezistentními kmeny a absence možných léčebných alternativ dnes řadí acinetobaktery mezi nejproblematictější mikroby ve smyslu obav ze selhání konvenční antibiotické terapie (WHO 2017).

Tato atestační práce je součástí dlouhodobého zaměření společnického pracoviště, Laboratoře bakteriální genetiky (Státní zdravotní ústav v Praze), na problematiku rodu *Acinetobacter*. Ta se již počátkem 90. let začala systematicky věnovat identifikaci a epidemiologické typizaci multirezistentních nemocničních kmenů acinetobakterů. Prvotním impulzem pro toto téma přitom byly závažné infekční komplikace u dětského pacienta hospitalizovaného na Klinice popáleninové medicíny (KPM) Fakultní nemocnice Královské Vinohrady (FNKV), z jehož krve byl izolován kmen *A. baumannii* rezistentní ke většině tehdy používaných antibiotik (Nemec 2004).

Předložená práce se věnuje dosud nedostatečně prostudované otázce ohledně významu bakterií rodu *Acinetobacter* u popáleninových pacientů. Jejím cílem bylo definovat populaci bakterií rodu *Acinetobacter* izolovaných během roku 2018 od pacientů hospitalizovaných na KPM FNKV s ohledem na jejich druhovou identitu, citlivost na antibiotika a příslušnost k hlavním epidemickým klonům *A. baumannii*. Dále pak posoudit klinický význam zachycených izolátů a jejich případnou epidemiologickou souvislost.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Rod *Acinetobacter*

3.1.1. Vlastnosti a výskyt

Rod *Acinetobacter* zahrnuje striktně aerobní, gramnegativní bakterie s negativním testem na cytochromoxidázu C, které nemají bičíky a jsou v konvenčních laboratorních testech nepohyblivé. V mikroskopických preparátech připravených z agarových kultur mají obvykle vzhled jednotlivých nebo ve dvojici spojených kokobacilů, které často obklopuje pouzdro. Rostou na běžných agarových půdách, kde tvoří symetrické, hladké a neprůhledné kolonie. Kolonie některých kmenů na krevním agaru obklopuje zóna úplné hemolýzy. Sacharolytická aktivita acinetobakterů je nízká, neboť pouze některé kmeny štěpí pentózy nebo hexózy (Murray, 1999; Votava et al., 2003).

Acinetobaktery se běžně vyskytují v různých přírodních ekosystémech (Baumann et al., 1968; Krizova et al., 2015; Yoon et al., 2014) a lze je izolovat z kůže a sliznic zdravých lidí (Buxton et al., 1978). Významně se uplatňují se jako původci nozokomiálních infekcí u hospitalizovaných pacientů, zvláště osob v intenzivní léčebné péči. Vyznačují se pozoruhodnou schopností kolonizovat různé povrchy a oproti jiným gramnegativním bakteriím jsou značně odolné vůči vysychání (Jawad et al., 1998). U některých lékařsky významných druhů byly identifikovány geny, které se uplatňují při adhezenci, kolonizaci, tvorbě biofilmu, vazbě železa, cytotoxicitě nebo koagulaci lidské plazmy (Wong et al., 2017).

3.1.2. Taxonomie a identifikace

Spolu s rody *Moraxella* a *Psychrobacter* patří rod *Acinetobacter* do čeledi *Moraxellaceae*, náležející do třídy *Gammaproteobacteria* (Rossau et al., 1991).

Klasifikaci rodu *Acinetobacter* na druhové úrovni iniciovala studie Bouveta a Grimonta (Bouvet a Grimont, 1986), na níž navázaly další práce založené na robustních a citlivých postupech taxonomické analýzy. Rod *Acinetobacter* k dnešnímu datu zahrnuje 60 platně publikovaných druhových jmen včetně čtyř párů synonym a řadu provizorních taxonů, které čekají na přesnou taxonomickou charakterizaci a případné nomenklaturní návrhy (<http://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf>). Rod obsahuje několik fylogeneticky a taxonomicky zřetelně oddělených uskupení (Touchon et al., 2014), z nichž jedním je komplex *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* (ACB). Tento komplex zahrnuje šest druhů: *A. baumannii*, který je klinicko-epidemiologicky nejvýznamnější druh rodu, *Acinetobacter*

pittii, jenž je nejčastěji izolovaným druhem u ambulantních pacientů a pacientů v nemocnicích, kde nedominují MDR epidemické klony *A. baumannii* (A. Nemeč, osobní sdělení), dále z lidí příležitostně izolované *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter seifertii* a *Acinetobacter dijkschoorniae* a nakonec primárně půdní druh *A. calcoaceticus* (Cosgaya et al., 2016; Nemeč et al., 2011, 2015).

Pro druhovou identifikaci se využívá široká škála fenotypových a genotypových metod. Většinu z těchto metod nicméně omezuje nedostatečná schopnost rozlišit fylogeneticky příbuzné druhy. Zlatým standardem se díky technologickému pokroku posledních let stává porovnání celogenomových sekvencí bakteriálních izolátů (Touchon et al., 2014), byť tato metoda se zatím používá především pro výzkumné a referenční cíle. V současnosti je standardem pro rutinní rodovou a druhovou identifikaci metoda založená na hmotnostní spektrometrii (MS, Mass Spectrometry) typu MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight). Princip identifikace MALDI-TOF MS spočívá v porovnání naměřených celobuněčných hmotnostních spekter s identifikační databází, která obsahuje referenční spektra pro známé druhy bakterií (Freiwald a Sauer 2009). Molekulárně genetické metody používané především pro epidemiologické účely budou probrány v příslušných kapitolách.

3.1.3. Lékařský význam

S používáním širokospektrých antibiotik a s rozvojem intenzivní nemocniční péče v posledních desetiletích došlo k postupnému zvyšování významu acinetobakterů jakožto původců nozokomiálních infekcí. Je to dáno hospitalizací pacientů se základním závažným onemocněním či oslabenou imunitou umístěných na jednotkách intenzivní péče. Bakterie rodu *Acinetobacter* vyvolávají pneumonie, které mívají těžký průběh spojený s vysokou smrtností. Dále se uplatňují jako vyvolavatelé sepsí, infekcí močového traktu, meningitid, endokarditid, infekcí ran a popálených ploch, osteomyelitid a peritonitid. Mimo nemocnici se jako etiologická agens uplatňují ojedinele. Ke vzniku komunitních infekcí (především pneumonie), dochází vesměs u osob s rizikovými faktory (např. kouření, alkoholismus, chronická obstrukční plicní nemoc nebo diabetes mellitus), u nichž prognóza onemocnění bývá fatální (Dijkshoorn et al., 2007).

Lékařsky nejvýznamnější *A. baumannii* zahrnuje převážnou většinu multirezistentních (MDR) a epidemických kmenů. Klíčovou vlastností *A. baumannii* je schopnost efektivně vyvíjet a integrovat rezistenci ke všem léčebně využitelným antibiotikům. Americký Národní institut pro alergie a infekční nemoci (NIAID, National Institute of Allergy and Infectious

Diseases) jej v roce 2008 zařadil do skupiny ESKAPE, kterou tvoří bakterie *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a rod *Enterobacter*, tedy patogeny, které jsou častými původci nemocničních infekcí, jejichž léčbu komplikuje rezistence těchto bakterií ke většině používaných antimikrobiálních preparátů (Rice et al., 2008). Světová zdravotnická organizace (WHO) pak v roce 2017 *A. baumannii* uvedla jako druhý (po *Mycobacterium tuberculosis*) nejproblematictější mikroorganismus ve smyslu selhávání konvenční antimikrobní terapie a potřeby vývoje nových antimikrobních látek (Tacconelli et al., 2018; WHO 2017).

3.1.4. Rezistence k antibiotikům a epidemické klony

A. baumannii a další druhy komplexu ACB jsou primárně rezistentní k řadě antibiotik, např. k aminopenicilinům, cefalosporinům I. a II. generace nebo chloramfenikolu (Seifert et al., 1993). Karbapenemy, sulbaktam, aminoglykosidy, fluorochinolony, polymyxiny, doxycyklin, protipseudomonádové cefalosporiny a tigecyklin jsou na tyto organizmy primárně účinné (Magiorakos et al., 2012), *A. baumannii* však může získat rezistenci ke všem těmto látkám. Od počátku milénia se zvyšuje výskyt izolátů rezistentních ke karbapenemům a objevují se i kmeny rezistentní ke kolistinu a tigecyklinu. Konvenční antibiotická léčba infekcí vyvolaných těmito izoláty je tak obtížně řešitelná (Nemec et al., 2008).

Epidemický klon je fenotypově a genotypově relativně homogenní skupina bakteriálních kmenů, které sdílejí klonální původ a vyskytují se v různém čase na různých místech (Dijkshoorn et al., 1996). Existenci epidemických klonů u *A. baumannii* jako první doložila studie Dijkshoorn et al. (1996), v níž byly na základě porovnání nemocničních kmenů z různých zemí severozápadní Evropy definovány dvě MDR skupiny, jež se genotypově a fenotypově odlišovaly od ostatních převážně citlivých izolátů. Tyto skupiny, označené jako evropské epidemické klony (EC) I a II, byly izolovány ve Velké Británii, Holandsku, Belgii a Dánsku (Dijkshoorn et al., 1996). Výskyt ECI a ECII byl posléze zjištěn i v České republice a v dalších evropských a mimoevropských zemích (Nemec et al., 2004). Pro tyto klony je charakteristické epidemické šíření mezi hospitalizovanými pacienty a vyšší kvalitativní rezistence oproti sporadicky zachyceným izolátům *A. baumannii*. Nizozemskými a francouzskými autory byl v roce 2004 popsán epidemický MDR klon III, který byl zjištěn zejména ve Španělsku a Francii (Van Dessel et al., 2004).

Obě zmíněné studie metodicky vycházely především z kombinace celogenomového fingerprintingu AFLP a ribotypizace založené na restrikním polymorfizmu úseků DNA ne-

soucích geny pro ribozomální RNA. Zavedení metody multilokusové sekvenční typizace (MLST) poté umožnilo spolehlivou identifikaci epidemických klonů. MLST je založena na porovnání sedmi provozních genů, kdy každý izolát je charakterizován alelickým profilem (unikátní kombinací genových sekvencí) označeným jako sekvenční typ (ST). Metoda má vysoké rozlišení a umožňuje mezilaboratorní sdílení údajů, proto se stala zlatým standardem při populačně-genetických studiích (Maiden et al., 2013). Dvě alternativní schémata pro typizaci *A. baumannii* (Bartual et al., 2005; Diancourt et al., 2010) jsou integrována na webové stránce PubMLST (<https://pub-mlst.org/abaumannii>). Metodicky jednodušší postup, který umožňuje identifikaci ECI a ECII, je metoda založená na multiplexové PCR tří chromozomálních genů (Turton et al., 2007).

Studie založené na výše jmenovaných metodách umožnily charakterizovat distribuci epidemických klonů v jednotlivých zemích. V 80. a 90. letech převažoval v evropských zemích klon ECI (Dijkshoorn et al., 1996; Nemeč et al., 1999, 2004), zatímco po přelomu tisíciletí začíná dominovat klon ECII (Da Silva et al., 2007; Di Popolo et al., 2011; Nemeč et al., 2008)

3.1.5. Mechanizmy rezistence k antibiotikům

Rezistenci acinetobakterů k antimikrobním látkám způsobují všechny obecné mechanismy bakteriální rezistence (Dijkshoorn et al., 2007). Jde o enzymatickou inaktivaci antibiotika (tabulka 1), změnu cílového místa, aktivní eflux nebo snížený influx. Tyto mechanismy se mohou vyskytovat v různých kombinacích.

β -laktamázy jsou nejpočetnější skupinou mechanismů rezistence s více než 20 různými enzymy zjištěnými u *A. baumannii* (Dijkshoorn et al., 2007). Rezistenci k aminoglykosidům způsobuje skupina modifikujících enzymů. Za rezistenci k fluorochinolonům zodpovídají bodové mutace v genech kódujících topoizomerázy, zatímco na rezistenci k tetracyklinům se podílejí specifické efluxové pumpy. Většina genů kódujících inaktivující enzymy nebo specifické pumpy je přítomna pouze u některých kmenů rodu *Acinetobacter*, bývají obvykle součástí mobilních nebo mobilizujících genetických elementů (plazmidy, transpozony, integrony), což umožňuje jejich horizontální šíření (Dijkshoorn et al., 2007; Nemeč et al., 2008).

Tabulka 1. Mechanizmy enzymatické rezistence ke karbapenemům a aminoglykosidům u acinetobakterů.

Mechanismus	Skupinové zařazení mechanismu	Původ	Typický substrát
Hydrolýza β-laktamů*			
OXA-51	β -laktamáza třídy D	Vlastní	Karbapenemy
OXA-23	β -laktamáza třídy D	Získaná	Karbapenemy
OXA-24/40	β -laktamáza třídy D	Získaná	Karbapenemy
OXA-58	β -laktamáza třídy D	Získaná	Karbapenemy
OXA-143	β -laktamáza třídy D	Získaná	Karbapenemy
OXA-235	β -laktamáza třídy D	Získaná	Karbapenemy
IMP	Metallo- β -laktamáza	Získaná	Karbapenemy
SIM	Metallo- β -laktamáza	Získaná	Karbapenemy
VIM	Metallo- β -laktamáza	Získaná	Karbapenemy
NDM	Metallo- β -laktamáza	Získaná	Karbapenemy
Modifikace aminoglykosidů			
AAC(3)-Ia	Acetyltransferáza	Získaná	Gentamicin
AAC(3)-IIa	Acetyltransferáza	Získaná	Gentamicin, tobramycin
AAC(6')-Ib	Acetyltransferáza	Získaná	Tobramycin, amikacin
APH(3')-I	Fosfotransferáza	Získaná	Kanamycin
APH(3')-VI	Fosfotransferáza	Získaná	Kanamycin, amikacin
ANT(2'')-Ia	Nukleotidyltransferáza	Získaná	Gentamicin, tobramycin
ANT(3'')-Ia	Nukleotidyltransferáza	Získaná	Streptomycin
Modifikace zásahového místa			
ArmA	Metyláza 16S rRNA	Získaná	Aminoglykosidy

* U všech uvedených mechanismů rezistence k β -laktamům existuje více alelických variant.

Významné jsou i mechanismy rezistence, jejichž geny jsou součástí druhového genu a jsou umístěny na chromozomu u všech nebo většiny kmenů příslušného druhu (Dijkshoorn et al., 2007; Nemeč et al., 2008). Expze těchto genů bývá nízká, zvyšuje se zpravidla až v důsledku genetických změn. Jde o geny kódující β -laktamázu typu AmpC (ADC) nebo β -laktamázu typu OXA-51, které jsou druhově specifické pro *A. baumannii*. Zvýšení expze těchto genů obvykle způsobuje integrace mobilní inzerční sekvence *ISAbal* nesoucí silný promotor do jejich promotorové oblasti. Zatímco nadprodukce ADC vede k rezistenci k cefalosporinům 3. generace, OXA-51 se podílí na snížení citlivosti ke karbapenemům. AdeABC je efluxový systém kódovaný třemi chromozomálními strukturními geny, k jehož

nadprodukcí dochází mutacemi v regulačních genech. Tato nadprodukce vede ke snížené citlivosti k aminoglykosidům, chinolonům, tetracyklinům a některým β -laktamům.

3.2. Problematika popálenin

3.2.1. Kůže a kožní mikroflóra

Kůže je největším orgánem lidského těla a tvoří jeho souvislý povrch. U dospělého člověka zaujímá povrch 1,5–2 m² a váží mezi 6–10 kg, u novorozence představuje plochu asi 0,2 m². Kůže tvoří ochranný obal pro vnitřní orgány, zabraňuje ztrátám tekutin, zajišťuje termoregulaci, funguje jako ochranný mechanismus proti mikrobiální invazi, působí jako senzitivní orgán, je rezervní orgán a v neposlední řadě tvoří estetický obal pro lidské tělo (Königová et al., 2010).

Lidskou kůži přirozeně kolonizuje široká škála mikrobů. Díky bakteriální interferenci zajišťuje řada z nich odolnost vůči patogenním mikroorganismům. Fyziologickou mikrobiální flóru rozdělujeme na rezidentní a tranzientní. Rezidentní flóra jsou bakterie, které trvale osídlují kůži daného jedince. Oproti tomu tranzientní flóra je získávána dočasně, většinou během kontaktu s jinými osobami či pobytem v kontaminovaném prostředí. K typickým představitelům fyziologické flóry patří rody *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Neisseria*, *Peptococcus*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* nebo *Streptococcus* (Schommer et al., 2013).

3.2.2. Popáleninové trauma a osídlování popálených ploch

Porušení integrity kožního krytu vede k porušení jeho funkce. Především pak omezení role kůže jako mechanické bariéry umožňuje vstup infekčních organizmů. Při popálení kůže dochází k porušení lokálního a posléze se přidávají i faktory celkové, jako je hypotermie, ztráta tekutin, snížení objemu plazmatických bílkovin nebo porušení homeostázy (Königová et al., 2010). Zejména rozvoj nespecifické a specifické imunosuprese vede ke zvýšenému riziku rozšíření infekce a sepse (Erol et al., 2004; Lipový et al., 2012a, 2012b). Popáleniny se tak řadí mezi nejzávažnější traumata vyžadující komplexní péči a mezioborovou spolupráci.

Bezprostředně po popáleninovém traumatu je plocha sterilní, bakterie patřící k běžné kožní flóře vykazují podobnou odolnost k tepelnému poškození jako kožní buňky. Primárně sterilní plochy se následně rychle kontaminují, posléze kolonizují (během 3–4 dní). Při překročení kritické hranice kolonizace hrozí vysoké riziko rozvoje infekce popálené plochy (Church et al., 2006; Lipový et al., 2010). Jako infekční agens se mohou uplatnit bakterie,

kvasinky či plísně, pro které představuje nekrotická kůže a podkoží vhodné kultivační medium. Jako patogeny se může uplatnit rezidentní flóra postižené osoby nebo mikroorganismy získané z vnějšího prostředí. Během pobytu ve zdravotnickém zařízení dochází ke konverzi bakteriálního spektra; grampozitivní bakterie (především endogenního původu) jsou postupně nahrazovány gramnegativními bakteriemi převážně exogenního původu (Erol et al., 2004; Rezaei et al., 2011; Lipový et al., 2010)

3.2.3. Druh infekce popálené plochy dle kritérií American Burn Association

Greenhalgh et al. (2007) rozlišuje infekce popálených ploch následovně:

Kolonizace kožního defektu: bakterie jsou na povrchu defektu v malém množství (< 10^5 bakterií/gram tkáně); nejsou známky tkáňové invaze.

Infekce kožního defektu: bakterie jsou přítomny ve vysoké koncentraci (> 10^5 bakterií/gram tkáně); nejsou známky tkáňové invaze; nejsou přítomny systémové příznaky.

Invazivní infekce: bakterie jsou přítomny v takovém množství, že se šíří nejen po povrchu, ale také vertikálně do hloubky, postihují primárně nepopálenou tkáň. Příznaky sepse mohou a nemusí být přítomny.

Flegmona: bakterie jsou přítomny ve vysoké koncentraci, prostupují do hlubších tkáňových struktur. Je postižena okolní tkáň, která se klinicky projevuje zarudnutím a indurací. Známky sepse jsou vždy přítomny.

Nekrotizující infekce/fascitida: agresivní invaze, rychle se šířící v podkoží a způsobující nekrózy.

4. CÍLE

Předložená práce se na příkladu pacientů hospitalizovaných na KPM FNKV věnuje dosud málo prostudované problematice bakterií rodu *Acinetobacter* u osob s popáleninami. Její cíle byly:

- Určit proporci izolátů rodu *Acinetobacter* ve vztahu k ostatním mikroorganismům zachycených od pacientů hospitalizovaných na KPM během mikrobiologického rutinního vyšetřování v roce 2018 (1. 2. – 15. 12. 2018).
- Definovat zachycené izoláty acinetobakterů s ohledem na jejich druhovou příslušnost a citlivost na antibiotika. Posoudit klinický význam jejich záchytu.
- Určit příslušnost MDR a XDR izolátů k hlavním epidemickým klonům *A. baumannii* a identifikovat u nich epidemiologický významné mechanismy rezistence.
- Provést retrospektivní mikrobiologicko-epidemiologickou analýzu izolátů MDR *A. baumannii* zachycených u sedmi pacientů na KPM v období od 10. 9. do 5. 10. 2012 s cílem posoudit předpoklad, že šlo o monoklonální epidemickou epizodu danou šířením kmene introdukovaného na KPM repatriovaným pacientem.

5. MATERIÁL A METODIKA

5.1. Soubory bakterií

Prospektivní sběr bakteriálních izolátů probíhal v období od 1. 2. 2018 do 15. 12. 2018 od pacientů hospitalizovaných na KPM FNKV. Tutu kliniku tvoří oddělení JIP pro dospělé pacienty (9 lůžek); oddělení JIP pro dětské pacienty (6 lůžek), dětské oddělení (15 lůžek), standardní oddělení (21 lůžek), ambulance pro dospělé a ambulance pro dětské pacienty. Od jednoho pacienta byl použit jediný izolát vyjma případů, kdy zachycené izoláty patřily k jiným druhům. Do práce byly navíc zahrnuty retrospektivní klinické izoláty zachycené v souvislosti s pravděpodobnou epidemickou epizodou, ke které došlo na KPM v roce 2012.

5.2. Odběr materiálu

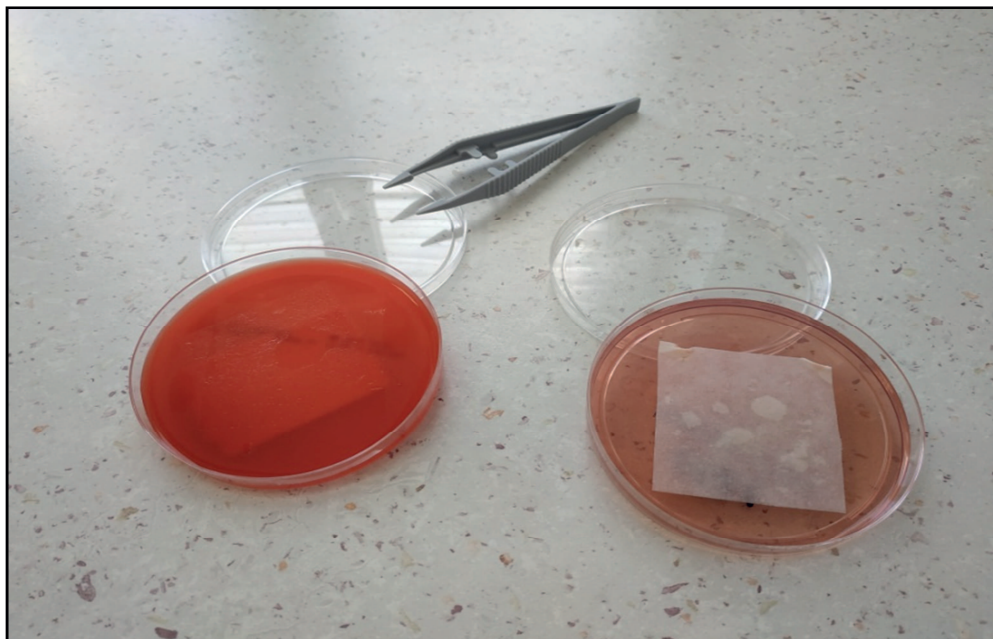
Vzorky byly rutinně odebírány v rámci screeningového vyšetření z nosu, krku a popálených ran, a to formou výtěrů, stěrů nebo otiskové metody. V případě cílené klinické indikace se rutinním postupem vyšetřoval i jiný materiál (např. aspirát, sputum nebo moč).

5.2.1. Stěry a výtěry

Nejčastěji se použily transportní odběrové systémy (např. Amies Charcoal, MED LAB Trade). Prováděl se výtěr nebo stěr popálené plochy, nosu či krku vatovým tampónem na tyčince, který byl následně zanořen do transportní půdy. V laboratoři byl materiál očkovan na následující kultivační média: krevní agar Columbia (s 5 % ovčích erytrocytů), McConkey agar, selektivní půda s 10% NaCl pro stafylokoky, URiselect (chromogenní kultivační půda pro záchyt grampozitivních i gramnegativních mikrobů s barevným odlišením růstu) a Sabouraudův agar. Jako pomnožovací medium byl použit masopeptonový bujón (vše BIO-RAD).

5.2.2. Otisková metoda

Tato metoda se používá ke kvantifikaci množství mikroorganismů na popálené ploše, která umožňuje i případné hodnocení účinnosti antibiotické terapie. Sterilní čtverec filtračního papíru (5 × 5 cm) přiložený na krevní agar (obr. 1) byl poskytnut oddělení, kde proběhl odběr. Papír byl pinzetou přiložen na ránu, zde byl ponechán 10 vteřin a poté přenesen zpět na krevní agar. V laboratoři byl sejmut a přenesen na další kultivační medium, zpravidla McConkey



Obr. 1. **Otisková metoda.**

agar, a zde byl ponechán opět 10 vteřin. Takto připravené plotny byly kultivovány za stanovených podmínek (viz kapitola 5.3.).

5.3. Kultivace

Naočkované půdy byly inkubovány 18–24 hodin při teplotě 35–37 °C v termostatu při zvýšené tenzi CO₂. V případě negativního kultivačního nálezu se inkubace u otiskové metody prodloužila na 48 hodin.

5.4. Identifikace mikroorganismů

Jako první krok pro rodovou a druhovou identifikaci bakteriálních izolátů byla použita metoda založená na hmotnostní spektrometrii typu MALDI-TOF MS. Kmeny zařazené touto metodou do rodu *Acinetobacter* byly dále taxonomicky vyšetřeny (viz kapitoly 5.4.2 a 5.4.3) v Laboratoři bakteriální genetiky (LBG) ve Státním zdravotním ústavu (SZÚ).

5.4.1. MALDI-TOF MS

Principem metody je porovnání naměřených celobuněčných hmotnostních spekter s identifikační databází, která obsahuje referenční spektra pro známé druhy bakterií (Freiwald a

Sauer 2009). Použili jsme přístrojové (Microflex LT) a programové (Flex Analysis 3.4, BioTyper verze 3.1) vybavení firmy Bruker Daltonics a postupovali podle instrukcí výrobce. Vybranou kolonii jsme nanесли na ocelovou analytickou destičku a převrstvili 1 μ l roztoku matrice (saturovaný roztok kyseliny α -kyano-4-hydroxyskořicové, Bruker Daltonics). Po zaschnutí roztoku jsme destičku umístili do komory analyzátoru Microflex LT a postupovali podle protokolu pro automatické měření. Naměřená spektra jsme porovnali s identifikačními maticemi obsahujícími referenční spektra pomocí programu BioTyper. Použita byla firemní matice verze č. 7.0.0.0 doplněná o spektra typových kmenů druhů rodu *Acinetobacter*, které nejsou ve firemní matici obsaženy. Tato spektra byla vytvořena ze sbírkových typových kmenů příslušných druhů uložených ve sbírce LBG postupem doporučeným výrobcem. Identifikační skóre získaná pro studované izoláty jsme interpretovali pomocí kritérií doporučenými výrobcem.

5.4.2. Identifikace *A. baumannii* průkazem genu pro OXA-51

Metoda je založená na faktu, že *A. baumannii* nese chromozomální β -laktamázu typu OXA-51 (Turton et al., 2007), která se nevyskytuje u jiných druhů. K průkazu genu pro OXA-51 (*bla_{OXA-51}*) jsme použili konvenční PCR s templátovou DNA připravenou alkalickou lýzí bakteriálních buněk a primery OXA-51F (5' TAATGCTTTGATCGGCCTTG 3') a OXA-51R (5' TGGATTGCACTTCATCTTGG 3'). Výsledek PCR byl analyzován konvenční elektroforetickou separací při použití jednosměrného konstantního napětí. Postup přípravy templátové DNA, reakční směsi, program PCR s následnou elektroforetickou separací a závěrečnou vizualizací je podrobně popsána v diplomové práci realizované na řešitelském pracovišti (Švandová, 2018).

5.4.3. Metabolická profilace

Jde o taxonomickou referenční metodu používanou v LBG pro fenotypovou charakterizaci izolátů acinetobakterů, která je založena na 44 in-house laboratorních, převážně asimilačních testech (Krizova et al., 2015; <https://apps.szu.cz/anemec/Phenotype.pdf>). Metoda umožňuje rozlišit některé fylogeneticky příbuzné druhy acinetobakterů, které nelze pomocí MALDI-TOF MS spolehlivě odlišit. Vyšetření vybraných izolátů provedl pro účely této práce tým LBG.

5.5. Stanovení citlivosti k antibiotikům

5.5.1. Diskový difuzní test

Je založen na difuzi molekul antibiotika z disků v agarové půdě a následné inhibici růstu současně inokulované bakteriální kultury. Vyšetření se realizovala v laboratoři ve FNKV a vycházela z metodiky EUCAST (2019). Z dvacetihodinové bakteriální kultury narostlé na krevním agaru (BIO-RAD) při 30 °C jsme sterilní kličkou odebrali dvě nebo tři morfologicky typické kolonie a připravili z nich suspenzi ve 4,5 ml fyziologického roztoku odpovídající hodnotě 0,5 podle McFarlandovy zákalové stupnice. Připravené plotny s Mueller-Hintonovým agarem (BIO-RAD) jsme inokulovali sterilním vatovým tampónem namočeným v připravené suspenzi. Po několika minutách jsme pomocí dispenzoru (BIO-RAD) umístili na plotny antibiotické disky (Oxoid, BIO-RAD). Plotny jsme inkubovali 20 h při 35 °C a výsledné inhibiční zóny změřili posuvným pravítkem. Jako kontrolní byly použity kmeny *Escherichia coli* CCM 3954 a *P. aeruginosa* CCM 3955. Použitá antibiotika a hraniční koncentrace pro kvalitativní interpretaci citlivosti a rezistence uvádí tabulka 2.

Tabulka 2. Antibiotika použitá v diskovém difuzním testu.

Antibiotikum [zkratka]	Obsah antibiotika v disku (μg)	Průměr inhibiční zóny v mm	
		Citlivost	Rezistence
Amikacin [AMI]*	30	≥ 19	< 17
Ampicilin/sulbaktam [AMS]†	10/10	≥ 15	≤ 11
Ciprofloxacín [CIP]†	5	≥ 21	≤ 15
Ceftazidim [CTZ]†	30	≥ 18	≤ 14
Doxycyklin [DOX]†	30	≥ 13	≤ 9
Gentamicin [GEN]*	10	≥ 17	< 17
Imipenem [IMI]†	10	≥ 22	≤ 18
Meropenem [MER]*	10	≥ 21	< 15
Netilmicin [NET]*	10	≥ 16	< 16
Ofloxacin [OFL]†	5	≥ 16	≤ 12
Piperacilin/tazobaktam [PPT]†	100/10	≥ 21	≤ 17
Tobramycin [TOB]†	10	≥ 15	≤ 12
Trimethoprim/sulfamethoxazol [COT]*	1,25/23,75	≥ 14	< 11

* Zařazení do kategorie citlivý, intermediárně citlivý a rezistentní podle EUCAST (2019).

† Zařazení do kategorie citlivý, intermediárně citlivý a rezistentní podle CLSI (2015).

5.5.2. Mikrodiluční metoda (kolistin)

Jde o referenční metodu pro kolistin, a to z důvodu jeho nedostatečné difuze v agaru a tudíž nespolehlivosti diskového testu. Vyšetření se provádělo v mikrotitračních destičkách, jejichž jamky obsahují 100 µl Mueller-Hintonova bujónu (Oxoid) s dvojnásobně rostoucí koncentrací kolistinu (v rozmezí 0,125–16 mg/l). Kontrolní jamky bez kolistinu slouží pro kontrolu růstu. Při -20°C skladované destičky jsme temperovali při laboratorní teplotě a poté očkovali bakteriální suspenzí. Destičky se poté inkubovaly 20 h při 35 °C. Hodnotu MIC jsme odečetli jako nejnižší koncentraci antibiotika, při které nedošlo k viditelnému růstu. Za citlivé byly považovány kmeny s hodnotou MIC ≤ 2 mg/l (CLSI 2015).

5.6. Genotypizace

5.6.1. Identifikace epidemických klonů ECI a ECII pomocí multiplexové PCR

Jde o metodu identifikace dvou hlavních epidemických klonů *A. baumannii*, ECI a ECII (Turton et al., 2007). Tvoří ji dvě sestavy primerů pro detekci tří chromozomálních genů (*ompA*, *csuE* a *bla_{OXA-51}*), které jsou specifické pro alelické varianty těchto genů pro příslušný epidemický klon (tabulka 3). Použitý metodický postup je podrobně popsán v práci Švandové (2018).

Tabulka 3. Primery pro detekci epidemických klonů ECI a ECII pomocí multiplexové PCR.*

Klon	Gen	Sekvence (5' → 3')	Orientace	Amplikon	Pozitivní kontrola
ECI	<i>ompA</i>	GATGGCGTAAATCGTGGTA	F	355 bp	<i>A. baumannii</i> ANC 4097
		CAACTTTAGCGATTTCTGG	R		
	<i>csuE</i>	CAACTTTAGCGATTTCTGG	F	702 bp	
		TACACCCGGGTTAATCGT	R		
	<i>bla_{OXA-51}</i>	GCGCTTCAAAATCTGATGTA	F	559 bp	
		GCGTATATTTTGTTCATTC	R		
ECII	<i>ompA</i>	GACCTTTCTTATCACAACGA	F	343 bp	<i>A. baumannii</i> ANC 4355
		CAACTTTAGCGATTTCTGG	R		
	<i>csuE</i>	GGCGAACATGACCTATTT	F	580 bp	
		CTTCATGGCTCGTTGGTT	R		
	<i>bla_{OXA-51}</i>	CATCAAGGTCAAACCTCAA	F	162 bp	
		TAGCCTTTTTTCCCCATC	R		

* Podle Švandové (2018)

5.6.2. Epidemiologická genotypizace pomocí makrorestrikční analýzy

Tato metoda je založená na porovnání elektroforetických profilů genomové DNA vzniklých štěpením restriktivními endonukleázami, jež rozeznávají malý počet cílových sekvencí v bakteriálním chromozomu. Výsledkem jsou restriktivní profily (tzv. pulzotypy), jež jsou tvořeny malým počtem fragmentů DNA o vysoké molekulové hmotnosti (> 20 kb) a jejichž podobnost odráží genetickou příbuznost porovnávaných bakteriálních izolátů. Metoda zahrnuje přípravu intaktní genomové DNA v agarózových bločcích, její štěpení restriktivní endonukleázou ApaI a separaci vzniklých fragmentů DNA pomocí elektroforézy v pulzním elektrickém poli. Metoda byla provedena podle protokolu Švandové (2018).

5.6.3. Průkaz genů rezistence pomocí PCR

Izoláty *A. baumannii* rezistentní ke karbapenemům a aminoglykosidům jsme vyšetřili na přítomnost v současnosti epidemiologicky nejvýznamnějších genů pro rezistenci k těmto skupinám antibiotik (Švandová 2018). Šlo o gen kódující metylázu 16S rRNA typu ArmA (*armA*) a gen pro karbapenemázu typu OXA-23 (*bla_{OXA-23}*). Vyšetření jsme provedli pomocí konvenční (end-point) PCR podle postupu Švandové (2018) s primery a podmínkami uvedenými v tabulce 4.

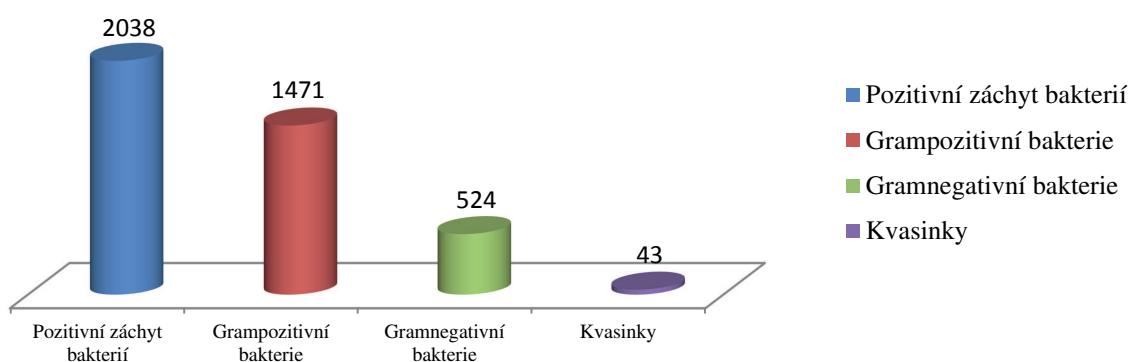
Tabulka 4. Primery a podmínky PCR pro detekci genů *armA* a *bla_{OXA-23}*.

Gen	Sekvence primeru (5' → 3')	Orientace	Amplikon	Annealing (°C)	Pozitivní kontrola (kmen <i>A. baumannii</i>)
<i>bla_{OXA-23}</i>	GATCGGATTGGAGAACCAGA	F	501 bp	53	NIPH 2522
	ATTTCTGACCGCATTTCAT	R			
<i>armA</i>	AGGTTGTTTCCATTTCTGAG	F	590 bp	44	ANC 5452
	TCTCTTCCATTCCCTTCTCC	R			

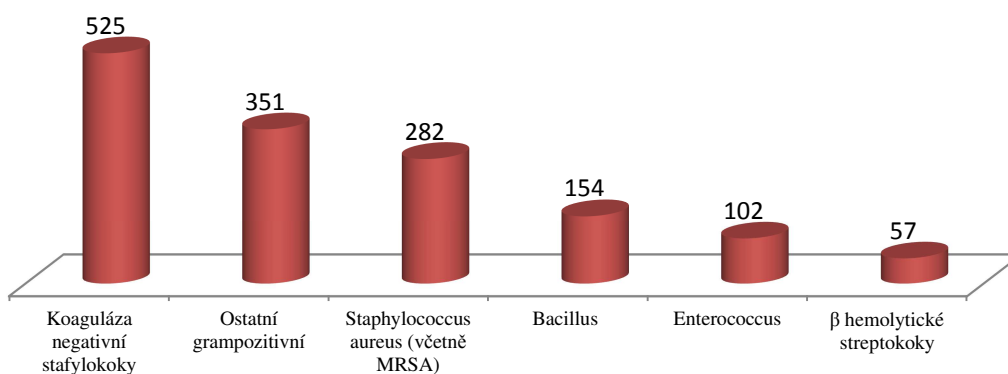
6. VÝSLEDKY

6.1. Přehled mikroorganismů izolovaných u popálených pacientů

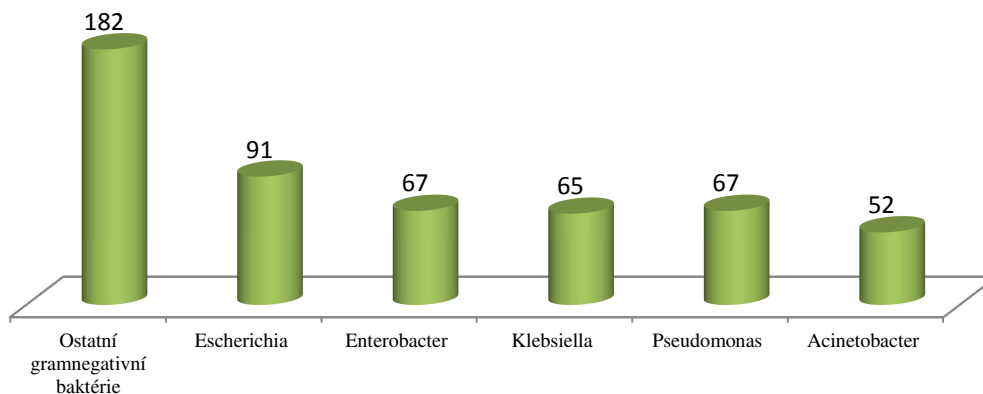
V období od 1. 2. do 15. 12. 2018 bylo od 556 pacientů hospitalizovaných na KPM FNKV zachyceno celkem 2038 mikrobiálních izolátů. Z nich 1471 (72 %) připadlo na gram-pozitivní a 524 (26 %) na gramnegativní bakterie (obr. 2). Grampozitivní bakterie zahrnovaly koaguláza negativní stafylokoky (n = 525; 36 %), *S. aureus* (n = 282; 19 %) včetně osmi kmenů MRSA (*S. aureus* rezistentní k meticilinu), *Bacillus* spp. (n = 154; 10%), *Enterococcus* spp. (n = 102; 7 %) a β -hemolytické streptokoky (n = 57; 4 %) (obr. 3). Gramnegativní bakterie zahrnovaly *Escherichia* spp. (n = 91; 7 %), *Enterobacter* spp. (n = 67; 13 %), *Pseudomonas* spp. (n = 67; 13 %), *Klebsiella* spp. (n = 65; 12 %), *Acinetobacter* spp. (n = 52; 10 %) a ostatní taxony (n = 182, 35 %) (obr. 4).



Obr. 2. Počty izolátů z KPM podle příslušnosti do hlavních skupin mikroorganismů.



Obr. 3. Identifikace 1471 gram-pozitivních izolátů z KPM.



Obr. 4. Identifikace 524 gramnegativních izolátů z KPM.

6.2. Analýza izolátů *Acinetobacter* spp.

6.2.1. Epidemiologické údaje

Epidemiologické údaje o 52 izolátech rodu *Acinetobacter* zachycených od 1. 2. do 15. 12. 2018 shrnuje tabulka 5. Z nich bylo 48 z popálených ran či ploch a čtyři z nosní sliznice. Průměrný věk pacientů v souboru byl 30,3 let (0–89 let) a průměrný rozsah popálené plochy byl 11,7 % (1–50 %) z celkového tělesného povrchu pacienta. Průměrná délka hospitalizace činila 25,6 dnů (1–140 dnů); tento údaj je vztažen ke dni 15. 12. 2018, kdy nebyla hospitalizace dvou pacientů ještě ukončena.

6.2.2. Druhová identifikace

Výsledky druhové identifikace jednotlivých izolátů uvádí tabulka 6. Identifikace byla primárně založena na MALDI-TOF MS s rozšířenou identifikační databází pro rod *Acinetobacter* (kapitola 5.4.1), kterou v případě omezené spolehlivosti dosažené identifikace MALDI-TOF MS (interpretace výsledku jiná než „vysoce pravděpodobná“ nebo „pravděpodobná“ druhová identifikace a „druhová konzistence“) doplnily další metody. U komplexu ACB šlo o průkaz genu pro OXA-51 (kapitola 5.4.2), jehož přítomnost je specifická pro *A. baumannii*, u druhů náležejících do tzv. hemolytické fyloskupiny (*Acinetobacter courvalinii*, *Acinetobacter haemolyticus* a *Acinetobacter junii*) a *Acinetobacter indicus* o metabolickou profilaci (kapitola 5.4.3). Výsledky těchto konfirmačních metod ve všech případech potvrdily identifikaci navrženou MALDI-TOF MS v první volbě (tabulka 6).

Tabulka 5. Epidemiologické údaje o studovaných izolátech rodu *Acinetobacter*.

Izolát č.*	LBG č.	Pohlaví/Věk	Stupeň popálení†	Počet dnů hospitalizace	Materiál	Oddělení‡	Datum odběru
1	ANC 5801	F/1	15 %, IIa	26	Výtěr rány	POPDEO	5. 2. 2018
2	ANC 5802	M/32	9 %, III	33	Otisk	POP1	7. 2. 2018
3	ANC 5803	F/3	1 %, IIa	1	Výtěr rány	PODJIP	7. 2. 2018
4	ANC 5807	F/2	11,5 %, IIa–IIb	13	Otisk	POPDEO	16. 2. 2018
5	ANC 5814	M/24	4 %, III	14	Výtěr rány	POP1	14. 2. 2018
6	ANC 5816	F/1	7 %, I–IIa	2	Výtěr rány	PODJIP	5. 3. 2018
7	ANC 5817	F/80	6 %, IIb–III	41	Výtěr rány	POP1	9. 3. 2018
8	ANC 5827	M/42	2 %, II–III	34	Otisk	POP1	20. 3. 2018
9	ANC 5832	M/63	5 %, IIa–IIb	27	Výtěr rány	POPJIP	24. 3. 2018
10	ANC 5834	M/41	15 %, II–III	54	Výtěr rány	POPJIP	1. 4. 2018
11	ANC 5836	M/1	15 %, IIa	17	Otisk	PODJIP	11. 4. 2018
12	ANC 5837	F/84	2 %, III	53	Otisk	POP1	16. 4. 2018
13	ANC 5846	M/1	3 %, II	4	Výtěr rány	PODJIP	23. 4. 2018
14	ANC 5847	M/1	1 %, III	12	Výtěr rány	PODJIP	25. 4. 2018
15	ANC 5848	F/35	10 %, IIb–III	24	Výtěr rány	POP1	24. 4. 2018
16	ANC 5851	M/73	15 %, IIb–III	23	Otisk	POPJIP	3. 5. 2018
17	ANC 5866	M/45	50 %, III	140	Výtěr rány	POP1	3. 5. 2018
18	ANC 5871	F/1	12 %, II	7	Výtěr rány	PODJIP	18. 5. 2018
19	ANC 5876	F/89	12 %, IIb–III	56	Výtěr rány	POPJIP	1. 6. 2018
20	ANC 5887	M/32	10 %, IIb– III	22	Výtěr rány	POP1	12. 6. 2018
21	ANC 5895	M/4	20 %, IIb–III	26	Výtěr rány	PODJIP	20. 6. 2018
22	ANC 5910	M/60	30 %, IIb–III	68	Otisk	POPJIP	29. 6. 2018
23	ANC 5911	M/73	7 %, IIb–III	23	Výtěr rány	POP1	4. 7. 2018
24	ANC 5912	F/1	20 %, IIa–b	12	Výtěr rány	PODJIP	6. 7. 2018
25	ANC 5933	M/72	2 %, IIb–III	58	Výtěr rány	POP1	11. 7. 2018
26	ANC 5939	F/50	18 %, IIb–III	12	Otisk	POPJIP	31. 7. 2018
27	ANC 5946	F/50	4 %, IIb	23	Výtěr rány	POP1	6. 8. 2018
28	ANC 5948	M/65	10 %, I	1	Výtěr nosu	POP1	7. 8. 2018
29 (A)	ANC 5958	M/63	31 %, IIb–III	68	Výtěr rány	ARO/JIP	26. 8. 2018
30	ANC 5965	M/1	1 %, IIa	5	Výtěr nosu	POPDEO	2. 9. 2018
31	ANC 5985	M/33	10 %, IIa–b	17	Výtěr rány	POPJIP	9. 9. 2018
32	ANC 5991	F/9	4 %, IIb– III	21	Výtěr rány	POPDEO	12. 9. 2018
33	ANC 5992	M/1	5 %, II	5	Výtěr rány	POPDEO	13. 9. 2018
34 (A)	ANC 5993	M/63	31 %, IIb–III	68	Otisk	POPJIP	12. 9. 2018
35	ANC 5996	M/31	41 %, IIb–III	Trvá	Otisk	POPJIP	16. 9. 2018
36	ANC 5999	M/46	3 %, IIb–III	18	Výtěr rány	POP1	29. 9. 2018
37	ANC 6000	F/1	6 %, I–IIa	2	Výtěr rány	POPDEO	3. 10. 2018
38	ANC 6001	M/81	2 %, III	21	Výtěr rány	POP1	2. 10. 2018
39	ANC 6003	F/0	1 %, IIa	1	Výtěr rány	POPDEO	5. 10. 2018
40	ANC 6004	M/1	16 %, IIa	8	Výtěr rány	PODJIP	9. 10. 2018
41	ANC 6005	F/1	6 %, IIa	7	Výtěr nosu	PODJIP	10. 10. 2018
42	ANC 6016	F/58	45 %, IIb–III	41	Výtěr rány	POPJIP	18. 10. 2018
43	ANC 6023	F/1	5 %, IIa	9	Výtěr rány	POPDEO	29. 10. 2018
44	ANC 6024	M/1	4 %, IIa	8	Výtěr nosu	POPDEO	30. 10. 2018
45	ANC 6025	F/1	12 %, II	19	Výtěr rány	PODJIP	4. 11. 2018
46	ANC 6027	M/33	14 %, IIb–III	Trvá	Výtěr rány	POPJIP	8. 11. 2018
47	ANC 6030	M/1	3 %, II	1	Výtěr rány	POPDEO	8. 11. 2018
48	ANC 6031	M/1	6 %, II	10	Výtěr rány	POPDEO	11. 11. 2018
49	ANC 6032	M/61	22 %, III	21×	Výtěr rány	POPJIP	17. 11. 2018
50 (B)	ANC 6048	M/1	10 %, IIa	8	Výtěr rány	PODJIP	2. 12. 2018
51	ANC 6049	M/31	6 %, II	5	Výtěr rány	POP1	30. 11. 2018
52 (B)	ANC 6051	M/1	10 % IIa	8	Otisk	PODJIP	5. 12. 2018

* Izoláty od téhož pacienta jsou označeny shodným písmenem.

† %, Rozsah popálené plochy; I, postižení epidermis; IIa, postižení epidermis a povrchové části dermis; IIb, postižení zasahuje do retikulární vrstvy dermis; III, ireverzibilní poškození dermis a epidermis, zničení kapilární sítě dermis; IV, kromě kůže zasahují i hlubší struktury (Königová et al., 2010).

‡ POPDEO, dětské standardní lůžkové oddělení KPM; POP1, standardní lůžkové oddělení KPM; PODJIP, dětská jednotka intenzivní péče KPM; POPJIP, jednotka intenzivní péče KPM; ARO/JIP, anesteziologicko-resuscitační oddělení FNKV.

× Pacient zemřel.

Tabulka 6. Genotypové a fenotypové vlastnosti studovaných izolátů rodu *Acinetobacter*.

Izolát č. *	LBG č.	Species	Identifikace MALDI-TOF MS	Skóre MALDI- TOF MS	Metabolická profilace	Gen pro OXA-51	Epidе- mický klon	Průměr inhibiční zóny v difuzním diskovém testu (mm)†												
								AMI	ASM	CIP	CTZ	DOX	GEN	IMI	MER	NET	OFL	PTZ	TOB	COT
1	ANC 5801	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	2.6 (B)	-	-	-	23	27	30	22	27	22	28	20	24	25	21	22	22
2	ANC 5802	<i>A. seifertii</i>	<i>A. seifertii</i>	2.5 (B)	-	-	-	23	24	27	18	24	22	30	25	24	22	10	22	23
3	ANC 5803	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	2.5 (B)	-	-	-	23	29	31	20	29	23	31	29	24	31	20	22	30
4	ANC 5807	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	2.4 (B)	-	-	-	23	27	28	23	22	23	31	30	23	27	21	22	24
5	ANC 5814	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. lwoffii</i>	2.2 (A)	-	-	-	27	33	23	30	31	25	32	34	20	30	24	25	30
6	ANC 5816	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	2.5 (B)	-	-	-	23	29	31	20	31	21	32	30	23	27	19	21	30
7	ANC 5817	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	2.5 (B)	-	-	-	23	29	29	25	30	22	33	29	25	28	18	21	20
8	ANC 5827	<i>A. indicus</i>	<i>A. indicus</i>	2.4 (B)	<i>A. indicus</i>	-	-	23	29	25	23	30	23	35	34	20	30	22	22	30
9	ANC 5832	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. lwoffii</i>	2.3 (A)	-	-	-	>30	>30	33	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	22	>30	>30
10	ANC 5834	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	2.4 (B)	-	-	-	20	29	27	24	29	20	31	29	20	30	18	24	21
11	ANC 5836	<i>A. junii</i>	<i>A. junii</i>	2.3 (B)	<i>A. junii</i>	-	-	29	>30	30	>30	29	29	>30	>30	29	30	30	27	>30
12	ANC 5837	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	2.5 (B)	-	+	-	21	33	34	30	25	23	31	31	24	29	27	21	20
13	ANC 5846	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	2.4 (B)	-	-	-	24	29	30	22	20	22	27	20	24	29	20	22	20
14	ANC 5847	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	2.5 (B)	-	+	ECII	0	0	0	0	7	0	7	7	0	0	0	0	0
15	ANC 5848	<i>A. ursingii</i>	<i>A. ursingii</i>	2.1 (A)	-	-	-	28	32	31	19	14	27	33	30	28	24	20	25	0
16	ANC 5851	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	2.4 (B)	-	+	ECII	21	11	13	7	0	8	24	23	10	11	10	21	0
17	ANC 5866	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	2.4 (B)	-	+	-	22	27	20	23	23	21	29	28	22	25	20	20	24
18	ANC 5871	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	2.6 (B)	-	-	-	24	27	29	21	25	23	30	27	24	28	19	21	20
19	ANC 5876	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. lwoffii</i>	2.1 (A)	-	-	-	27	33	25	20	25	20	32	30	27	28	23	20	30
20	ANC 5887	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. lwoffii</i>	2.0 (A)	-	-	-	24	29	20	21	30	23	29	30	25	28	25	23	32
21	ANC 5895	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. lwoffii</i>	2.2 (A)	-	-	-	20	>30	30	>30	29	24	>30	>30	25	20	30	24	>30
22	ANC 5910	<i>A. radioresistens</i>	<i>A. radioresistens</i>	2.2 (A)	-	-	-	25	28	30	27	29	24	31	33	20	28	21	23	30
23	ANC 5911	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	2.1 (A)	-	-	-	25	28	30	23	29	23	31	29	24	28	10	23	28
24	ANC 5912	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. lwoffii</i>	2.1 (A)	-	-	-	>30	>30	28	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	22	>30	>30
25	ANC 5933	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	2.6 (B)	-	+	ECII-like	22	0	0	0	0	17	7	7	15	0	0	20	0
26	ANC 5939	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	2.6 (B)	-	+	ECII	0	12	0	0	0	0	8	8	0	7	0	0	0
27	ANC 5946	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	2.4 (A)	-	-	-	20	30	30	23	29	24	33	29	25	27	18	23	23
28	ANC 5948	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. lwoffii</i>	2.2 (A)	-	-	-	25	>30	20	>30	28	22	>30	>30	24	20	20	23	>30
29 (A)	ANC 5958	<i>A. courvalinii</i>	<i>A. courvalinii</i>	2.3 (B)	<i>A. courvalinii</i>	-	-	22	30	25	23	23	21	27	25	23	20	21	19	22
30	ANC 5965	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. lwoffii</i>	2.2 (A)	-	-	-	23	27	32	21	20	19	28	20	21	23	27	20	27

Tabulka 6. Genotypové a fenotypové vlastnosti studovaných izolátů rodu *Acinetobacter* – pokračování.

Izolát č. *	LBG č.	Species	Identifikace MALDI-TOF MS	Skóre MALDI- TOF MS	Metabolická profilace	Gen pro OXA-51	Epi- demický klon	Průměr inhibiční zóny v difuzním diskovém testu (mm)†												
								AMI	ASM	CIP	CTZ	DOX	GEN	IMI	MER	NET	OFL	PTZ	TOB	COT
31	ANC 5985	<i>A. schindleri</i>	<i>A. schindleri</i>	2.0 (A)				22	27	39	18	22	21	27	25	21	20	33	19	0
32	ANC 5991	<i>A. courvalinii</i>	<i>A. courvalinii</i>	2.4 (B)	<i>A. courvalinii</i>			22	31	28	23	23	21	29	28	20	20	20	18	24
33	ANC 5992	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	2.5 (B)		+		21	27	29	23	20	20	28	28	21	25	19	19	22
34 (A)	ANC 5993	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. lwoffii</i>	2.1 (A)				18	10	28	14	22	19	22	22	18	20	22	19	0
35	ANC 5996	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	2.4 (B)		+		24	24	30	22	27	23	29	28	23	20	21	21	28
36	ANC 5999	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	2.0 (A)		-		25	25	29	20	24	23	32	20	24	25	21	22	23
37	ANC 6000	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	2.5 (A)		-		25	27	29	23	20	22	28	28	24	20	18	23	29
38	ANC 6001	<i>A. junii</i>	<i>A. junii</i>	2.3 (B)	<i>A. junii</i>			27	>30	29	>30	24	20	>30	>30	24	20	20	24	>30
39	ANC 6003	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	2.5 (B)		+		22	27	30	24	20	19	27	27	21	20	24	20	21
40	ANC 6004	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	2.5 (B)		-		24	28	28	23	27	22	28	28	23	25	23	23	29
41	ANC 6005	<i>A. ursingii</i>	<i>A. ursingii</i>	2.3 (A)				20	20	30	18	27	20	27	28	29	25	23	24	28
42	ANC 6016	<i>A. ursingii</i>	<i>A. ursingii</i>	2.0 (A)				29	>30	27	>30	27	25	>30	>30	29	23	27	27	>30
43	ANC 6023	<i>A. ursingii</i>	<i>A. ursingii</i>	2.5 (A)				28	30	30	22	27	24	>30	>30	25	24	20	20	>30
44	ANC 6024	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	2.5 (B)		-		22	28	30	20	30	22	33	31	25	27	20	21	25
45	ANC 6025	<i>A. towneri</i>	<i>A. towneri</i>	2.2 (A)	<i>A. towneri</i>			17	25	30	23	32	20	24	20	21	17	30	20	20
46	ANC 6027	<i>A. haemolyticus</i>	<i>A. haemolyticus</i>	2.5 (B)	<i>A. haemolyticus</i>			17	30	20	23	21	21	32	29	13	27	24	14	23
47	ANC 6030	<i>A. ursingii</i>	<i>A. ursingii</i>	2.5 (A)				27	33	25	23	28	0	20	20	10	23	22	10	0
48	ANC 6031	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	2.5 (B)		+	ECII	0	0	7	0	0	0	8	8	0	0	7	0	0
49	ANC 6032	<i>A. courvalinii</i>	<i>A. courvalinii</i>	2.5 (B)	<i>A. courvalinii</i>			25	28	29	22	27	23	31	28	24	28	24	22	27
50 (B)	ANC 6048	<i>A. ursingii</i>	<i>A. ursingii</i>	2.3 (A)				27	24	30	19	24	25	20	27	28	25	21	20	25
51	ANC 6049	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	2.4 (B)		+		20	29	31	20	28	21	28	27	22	20	23	19	24
52 (B)	ANC 6051	<i>A. pittii</i>	<i>A. pittii</i>	2.6 (B)		-		22	27	27	24	28	22	29	28	24	27	23	22	20

* Izoláty od téhož pacienta jsou označeny shodným písmenem.

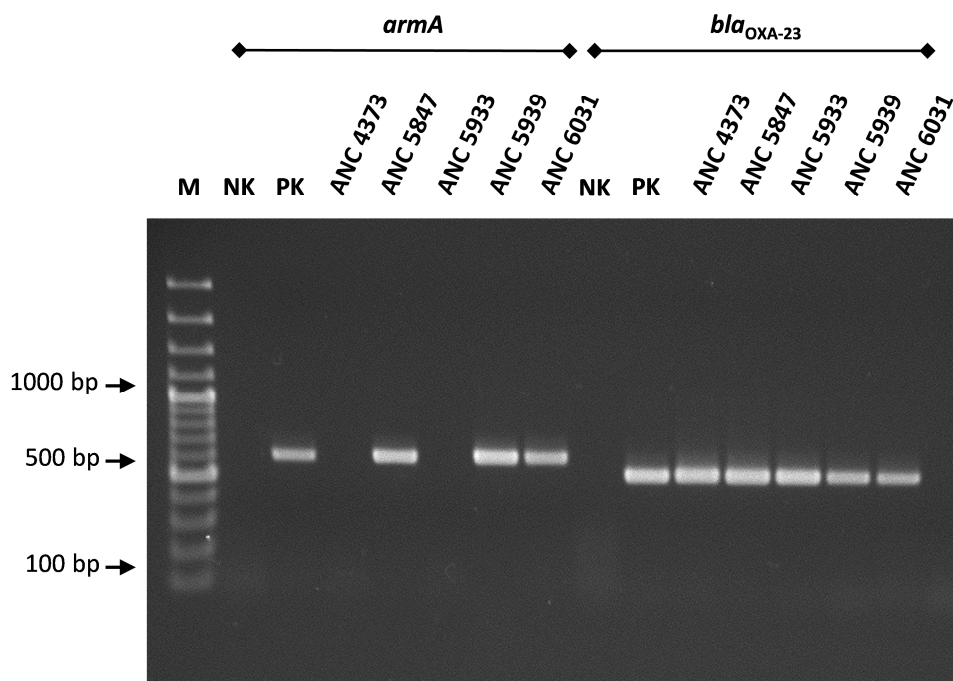
† Zkratky názvů antibiotik a kategorizace citlivosti na rezistentní (šedé pozadí), intermediárně citlivé (tučně) a citlivé (ostatní) - viz tabulka 2.

Souhrnné výsledky identifikace 52 izolátů acinetobakterů jsou následující. Do komplexu ACB bylo zařazeno 27 (52 %) izolátů, z toho 15 (29 %) jako *A. pittii*, 11 (21 %) jako *A. baumannii* (potvrzeno pozitivním výsledkem testu na přítomnost *bla*_{OXA-51}) a jeden jako *A. seifertii*. K hemolytické fyloskupině patřilo šest (12 %) izolátů, z nichž tři byly zařazeny do *A. courvalinii*, dva do *A. junii* a jeden jako *A. haemolyticus*. Devět (17 %) izolátů bylo identifikováno jako *Acinetobacter lwoffii* a šest (12 %) jako *Acinetobacter ursingii*, zatímco po jednom izolátu připadlo na *A. indicus*, *Acinetobacter radioresistens*, *Acinetobacter schindleri* a *Acinetobacter towneri*. Nejčastěji izolovanými druhy tak byly *A. pittii* (n = 15), *A. baumannii* (n = 11), *A. lwoffii* (n = 9) a *A. ursingii* (n = 6), které dohromady představovaly 79 % všech izolátů.

6.2.3. Citlivost na antibiotika

Výsledky citlivosti na antibiotika a jejich kvalitativní interpretaci podle klinických hraničních koncentrací uvádí tabulka 6. Tyto údaje ukazují kompletní citlivost na klíčová antibiotika používaná v léčbě acinetobakterových infekcí u izolátů patřících k druhům jiným než *A. baumannii*. Výjimkou je pouze rezistence k trimethoprimu-sulfamethoxazolu u pěti izolátů, rezistence k aminoglykosidům u *A. ursingii* ANC 6030, ceftazidimu u *A. lwoffii* ANC 5993 a snížená citlivost k tobramycinu u *A. haemolyticus* ANC 6027 (pravděpodobný důsledek produkce acetyltransferázy AAC(6')-I_g specifické pro *A. haemolyticus*).

Z 11 izolátů *A. baumannii*, bylo šest plně citlivých, zatímco dva izoláty (ANC 5851 a ANC 5933) byly MDR a tři (ANC 5847, ANC 5939 a ANC 6031) extenzivně rezistentní (XDR) podle klasifikace Magiorakose et al. (2012). ANC 5851 a ANC 5933 byly citlivé pouze na kolistin a aminoglykosidy, ANC 5851 byl navíc intermediárně citlivý na karbapenemy. Tři XDR izoláty byly citlivé na kolistin a vysoce rezistentní ke všem ostatním antibiotikům. U MDR izolátu ANC 5933 a všech tří XDR izolátů jsme provedli vyšetření na průkaz genů pro OXA-23 a ArmA (kapitola 5.6.3). Jak ukazuje obr. 5, všechny tyto izoláty nesly gen pro karbapenemázu OXA-23, zatímco gen pro metylázu 16S rRNA typu ArmA byl zjištěn pouze u XDR izolátů. Tyto výsledky jsou v souladu s fenotypem rezistence izolátů (tabulka 6).



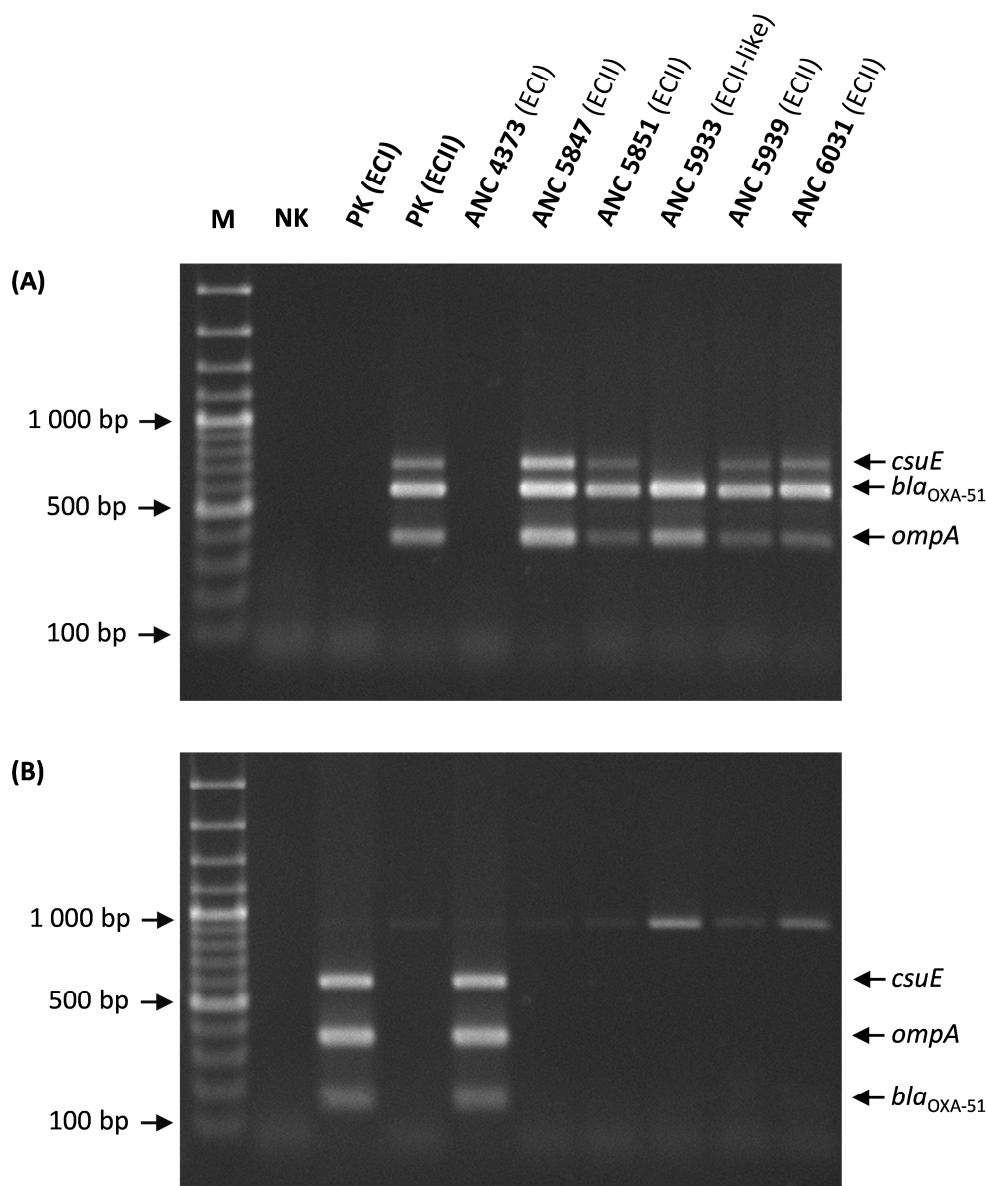
Obr. 5. Detekce genů rezistence pro ArmA (*armA*) a OXA-23 (*bla_{OXA-23}*) pomocí PCR a konvenční agaróзовé elektroforézy u izolátů *A. baumannii* z KPM s kvantitativně vysokou rezistencí ke karbapenemům. Provedeno podle postupu v kapitole 4.6.3. Amplikony byly separovány v 1,8% (w/v) agaróзовém gelu 90 min při 110 V a vizualizovány pomocí ethidium bromidu. M, standard molekulových hmotností (GeneRuler 100 bp Plus, Fermentas); NK, negativní kontrola; PK, pozitivní kontrola (*A. baumannii* ANC 5452).

6.2.4. Epidemiologická typizace a epidemické klony

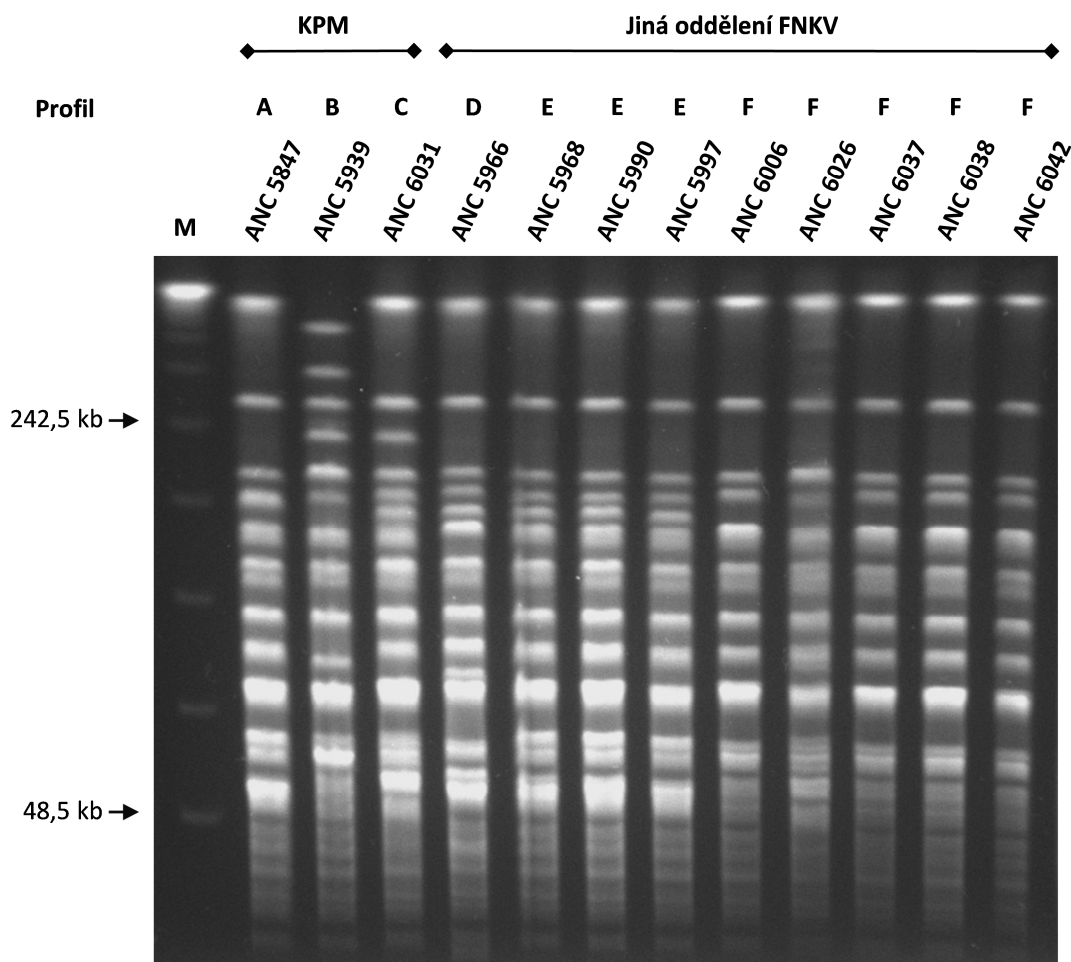
Zařazení do epidemických klonů (kapitola 5.6.1) bylo provedeno u dvou MDR (ANC 5851 a ANC 5933) a tří XDR (ANC 5847, ANC 5939 a ANC 6031) izolátů. Pomocí multiplexové PCR byly tři XDR izoláty a MDR izolát ANC 5851 identifikován jako ECII, MDR izolát měl profil odpovídající ECII s výjimkou chybějícího amplikonu pro gen *csuE* (obr. 6). MDR izoláty s tímto profilem (označené jako ECII-like) byly nedávno zjištěny v jiné pražské nemocnici; pravděpodobně jde o variantu klonu ECII (Švandová 2018).

Epidemiologická genotypizace pomocí makrorestrikční analýzy (kapitola 5.6.2) zahrnovala tři XDR izoláty (ANC 5847, ANC 5939 a ANC 6031) nesoucí geny pro OXA-23 a ArmA s cílem posoudit jejich příbuznost na kmenové úrovni. Makrorestrikční analýza odhalila vysoce podobné, byť neidentické profily (obr. 7). Za účelem posouzení příbuznosti těchto izolátů v kontextu současné populace *A. baumannii* celé FNKV jsme jejich profily porovnali s profily devíti XDR izolátů, které byly v roce 2018 zachyceny na jiných odděleních FNKV a

jež nesly geny pro OXA-23 a ArmA. Jak ukazuje obr. 7, těchto devět izolátů mělo profily lišící se vzájemně nejvýše polohou čtyř fragmentů, a tyto profily podobaly profilům izolátů z KPM. Byť na základě této informace nelze spolehlivě vyloučit epidemiologickou vazbu mezi izoláty, je pravděpodobné, že izoláty z KPM představují sporadické záchyty bez přímé vazby.



Obr. 6. Výsledky multiplexové PCR pro identifikaci epidemických klonů ECI a ECII u MDR a XDR izolátů *A. baumannii* z KPM. (A) Kombinace primerů specifických pro epidemický klon ECII, (B) kombinace primerů specifických pro epidemický klon ECI. Provedeno podle postupu popsánému v kapitole 4.6.1. Amplikony byly separovány v 1,8% (w/v) agarózovém gelu 90 min při 110 V a vizualizovány pomocí ethidium bromidu. NK, negativní kontrola; PK, referenční kmeny pro ECI (ANC 4097) a ECII (ANC 4355); M, standard molekulových hmotností (GeneRuler 100 bp Plus, Fermentas).



Obr. 7. Makrorestrikční profily (ApaI) genomové DNA u XDR izolátů *A. baumannii* nesoucích geny pro ArmA a OXA-23 zachycených na KPM a jiných lůžkových odděleních FNKV v roce 2018. Provedeno postupem popsáným v kapitole 5.6.2. Nad profily je klasifikace do typů podle vizuálně posouzené podobnosti (A–F) a čísla, pod nimiž jsou izoláty uloženy v LBG. M, standard molekulových hmotností (Bio-Rad CHEF DNA Size Standard Ladder 48,5 kb).

6.2.5. Klinický význam izolátů

Dostupné klinické údaje naznačují, že zachycené izoláty acinetobakterů souvisely s kolonizací, nikoliv manifestní infekcí postižených tkání. Infekce akutní popálené plochy s nutností antibiotické terapie se vyskytla u 30 pacientů, u nichž však byly kromě acinetobaktera izolovány další agens (polymikrobní infekce). Invazivní infekce ve smyslu pozitivní hemokultury s odpovídajícími klinickými a laboratorními parametry nebyla prokázána u žádného ze sledovaných pacientů. U pacientů, u nichž byly zachyceny MDR (pacienti č. 16 a 25) a

XDR (č. 14, 26 a 48) izoláty *A. baumannii*, nebylo potřeba zajistit adekvátní antibiotickou terapii a nález byl interpretován jako kolonizace popálené plochy. Ze sledovaného souboru pacientů zemřel jeden pacient (č. 49), a to v důsledku protražovaného septického stavu.

6.3. Analýza epidemické epizody z roku 2012

6.3.1. Popis případu

V roce 2012 byl na KPM z nemocnice v řeckých Athénách repatriován 60letý pacient, který se na ostrově Lefkada vážně popálil při manipulaci s propanbutanovou lahví. Po přijetí na KPM (6. srpna) u něj byla provedena hemokultivace, jež prokázala polymikrobní infekci krevního řečiště vyvolanou *K. pneumoniae* a *E. coli* produkujícími ESBL (β -laktamázy s rozšířeným substrátovým spektrem) a MDR *A. baumannii*. Navzdory následným epidemiologickým opatřením byly během září a října 2012 zachyceny MDR izoláty *A. baumannii* z klinických vzorků od dalších šesti pacientů hospitalizovaných na KPM (tabulka 7), které měly s původním izolátem shodný profil rezistence k antibiotikům. U tří z těchto pacientů (včetně u pacienta 1, od něhož byly získány izoláty z krve a otisku) byla prokázána invazivní infekce (hemokultury pozitivní na MDR *A. baumannii*) s odpovídajícími klinickými projevy i biochemických laboratorním nálezem. Následná antibiotická terapie se setkala u dvou pacientů s příznivou klinickou odezvou (pacient 1 léčen tigecyklinem, pacient 2 kolistinem a posléze tigecyklinem), třetí pacient však umírá v důsledku multiorgánového selhání. U ostatních čtyř pacientů byl záchyt *A. baumannii* vyhodnocen jako kolonizace popálené plochy. Izoláty ze všech pacientů byly archivovány a pro účely této práce analyzovány v LBG.

Tabulka 7. Údaje o izolátech MDR *A. baumannii* z epidemické epizody z roku 2012.*

Pacient	Izolát č.	Pohlaví/ Věk	Stupeň popálení	Počet dnů hospitalizace	Materiál	Oddělení	Datum odběru
1	ANC 4373	M/60	64 %, II–III	97	Otisk	POPJIP	10. 8. 2012
2	ANC 4382	M/27	20 %, II–III	66	Hemokultura	POPJIP	10. 9. 2012
3	ANC 4383	F/78	23 %, III	26†	Hemokultura	POPJIP	10. 9. 2012
4	ANC 4416	M/12	15 %, II	8	Výtěr rány	POPDEO	5. 10. 2012
5	ANC 4417	F/9	4 %, II–III	22	Výtěr rány	POPDEO	5. 10. 2012
6	ANC 4418	M/0	2 %, II	2	Výtěr rány	POPDEO	5. 10. 2012
7	ANC 4419	M/28	25 %, IIa–IIb	23	Výtěr rány	POPJIP	5. 10. 2012

* Vysvětlivky viz tabulka 5.

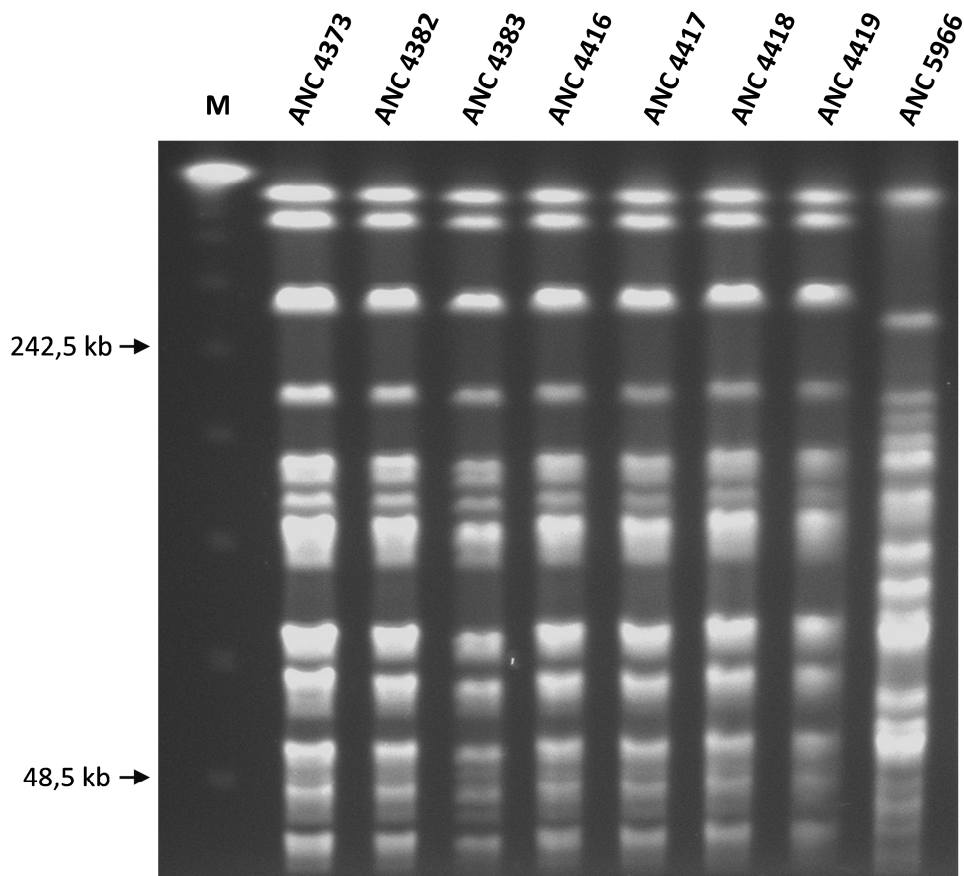
† Pacient zemřel

6.3.2. Mikrobiologická analýza

Izoláty jsme porovnali pomocí difuzního diskového testu a makrorestrikční analýzy. Všechny sdílely antibiogram charakterizovaný citlivostí na tobramycin a netilmicin, intermediární citlivostí na doxycyklin a kvantitativně vysokou rezistencí na ostatní antibiotika (amikacin, ampicilin/sulbaktam, ciprofloxacin, ceftazidim, gentamicin, imipenem, meropenem, piperacilin/tazobaktam a trimethoprim/sulfamethoxazol). Jak je patrné z obr. 8, izoláty měly shodné makrorestrikční profily, což potvrzuje jejich identitu na kmenové úrovni a je v souladu s předpokladem bezprostřední epidemiologické vazby. U indexového izolátu ANC 4373 jsme též provedli multiplexovou PCR, jež jej identifikovala jako příslušníka epidemického klonu ECI (obr. 6).

Detekce genů rezistence pomocí PCR ukázala u všech sedmi izolátů přítomnost genu pro OXA-23 a absenci genu pro ArmA (obr. 5), což je v souladu s jejich kvantitativně vysokou rezistencí ke karbapenemům a citlivostí k některým aminoglykosidům. Tým laboratoře LBG provedl u indexového izolátu ANC 4373 též vyšetření na přítomnost dalších genů rezistence s doloženým výskytem u *A. baumannii* podle metodiky popsané v práci Švandové (2018). Ta v souladu s fenotypem rezistence prokázala přítomnost genů pro acetyltransferázu AAC(3)-I (rezistence ke gentamicinu) a fosfotransferázu APH(3')-VI (rezistence k amikacinu) a nepřítomnost genů pro karbapenemázy (metalo- β -laktamázy IMP, GIM, NDM, SIM, VIM a SPM a oxacilinázy OXA-24/40, OXA-58 a OXA-143) a pro modifikaci aminoglykosidů (acetyltransferázy AAC(3)-II a AAC(6)-Ib, fosfotransferáza APH(3')-VI a nukleotidyltransferáza AAD(2'')-Ia.

Uvedené výsledky jsou v souladu s předpokladem, že záchyt MDR izolátů *A. baumannii* od sedmi pacientů na KPM je důsledkem monoklonální epidemické epizody způsobené kmenem, který kolonizoval pacienta repatriovaného z Athén. Tento kmen náleží do epidemického klonu ECI, který byl v 90. letech minulého století rozšířen v českých nemocnicích a stále, byť vzácněji, se u nás vyskytuje. Oproti historickým českým kmenům však nový kmen kóduje karbapenemázu OXA-23, která způsobuje kvantitativně vysokou rezistenci ke karbapenemům a většině ostatních β -laktamům primárně účinným na *A. baumannii*.



Obr. 8. Makrorestrikční profily (ApaI) genomové DNA u sedmi MDR izolátů *A. baumannii* ECI (ANC 4373–ANC 4419) zachycených od různých pacientů hospitalizovaných na KPM v období 10. 8. –5. 10. 2012. Izolát ANC 5966 je zařazen pro porovnání s profily XDR izolátů ECII nesoucí ArmA z obr. 8. Provedeno postupem popsáním v kapitole 4.6.2. M, standard molekulových hmotností (Bio-Rad CHEF DNA Size Standard Ladder 48,5 kb)..

7. DISKUZE

K významnému zkvalitnění péče o těžce popálené pacienty došlo během druhé poloviny 20. století. Šance na přežití a pokles mortality jsou dány zejména pokrokem v tekutinové resuscitaci, zkvalitněním umělé plicní ventilace, časně nekrektomii následované autotransplantací dermoepidermálním štěpem, nutritivní podpoře a v neposlední řadě mikrobiologickou kontrolou. Přes všechny tyto aspekty popáleniny představují typ traumatu, který má výrazný sociální a ekonomický dopad (Lipový et al., 2012b). Zásadní problém představují infekční komplikace. Faktory, které jsou pro jejich vznik rozhodující, jsou velikost popálené plochy, věk pacienta, délka hospitalizace a četnost chirurgických a rekonstrukčních zákroků (Lipový et al., 2010; Vránková et al., 1998). Dochází také k dramatickému nárůstu rezistentních mikroorganismů, na což nestačí farmaceutické firmy reagovat vývojem nových antimikrobiálních preparátů a možnosti adekvátní terapie tak mohou být značně omezené (Leseva et al., 2013).

Výsledky předkládané práce ve smyslu zastoupení jednotlivých infekčních agens u popálených pacientů odpovídají dostupným literárním zdrojům (Erol et al., 2004; Lipový et al., 2010, 2012a, 2012b; Vránková et al., 1998). Nejčastěji izolovanými z popálených ploch byly zástupci rodu *Staphylococcus*, a to převážně koaguláza negativních druhů. Druhou nejpočetnější skupinou byl rod *Bacillus*. Obě tyto skupiny vesměs patří k fyziologické kožní mikroflóře s nízkým patogenním potenciálem, avšak ve spojení s popáleninovým traumatem a narušenou imunitou pacienta mohou vyvolat závažné infekční komplikace. Výjimkou je primární patogen *S. aureus*. Ten sice může být součástí fyziologické mikroflóry (kůže, nos), ale tato kolonizace představuje riziko endogenní infekce případně exogenní infekce pro ostatní pacienty a ošetřující personál (Dansby et al., 2008). Je třeba zmínit relativně nízký záchyt bakterií z rodu *Enterococcus* a *Streptococcus*, zvláště primárně patogenní β -hemolytické streptokoky v čele se *Streptococcus pyogenes*. Ve spektru gramnegativních bakterií dominuje rod *Escherichia*, který patří k časně kolonizujícím podmíněně patogenním mikroorganismům, zejména pokud jde o postižení v perianogenitální oblasti. Relativně vysokou mírou záchytu měl rod *Pseudomonas*, obzvláště pak *P. aeruginosa* se schopností způsobit infekci jakéhokoli orgánu nebo orgánového systému. Rody *Enterobacter* a *Klebsiella*, v naší práci s téměř stejným záchytem, jsou obávanými podmíněně patogenními agens vzhledem k časté multirezistenci a tudíž problematické terapii.

Předložená práce se zaměřila na rod *Acinetobacter*, který ze sledovaných agens prodělal historicky největší posun ve smyslu klinicko-epidemiologického významu u infekcí spoje-

ných se zdravotní péčí a jehož role u popáleninových pacientů není dostatečně prostudována. V naší studii jsme ve sledovaném období zachytili 52 izolátů acinetobakterů, což je 2,56 % z celkem 2038 izolovaných mikroorganismů a 10 % z 524 zachycených gramnegativních bakterií. Nejpočetnější zastoupení měl komplex *A. calcoaceticus-A. baumannii* s 27 (52 %) izoláty (15 izolátů *A. pittii*, 11 izolátů *A. baumannii* a jeden izolát *A. seifertii*), následovaný *A. lwoffii* s devíti (17 %), *A. ursingii* se šesti (12 %), *A. courvalinii* se třemi a *A. junii* se dvěma izoláty. Po jednom izolátu připadlo na *A. indicus*, *A. radioresistens*, *A. schindleri* a *A. towneri*.

Porovnání s dosud publikovanými údaji o výskytu a medicínské relevanci acinetobakterů u pacientů s popáleninami omezuje malý počet takto zaměřených studií a jejich téměř převážné zaměření na komplex ACB. Albrecht et al. (2006) se zabývali narůstajícím počtem infekcí způsobených kmeny komplexu ACB u vojáků, kteří byli zraněni na misích v Iráku nebo Afganistánu. Během let 2003–2005 bylo do zařízení popáleninové medicíny přijato 821 pacientů. Infekce komplexem ACB se objevily u 7,4 % z nich, a to zejména u osob s těžkými popáleninami v intenzivní péči. Práce poukázala na důležitost nemocničních infekcí vyvolaných MDR kmeny komplexu ACB a možný prediktivní význam izolace těchto bakterií pro zvýšenou mortalitu u pacientů se závažným poraněním a rozsáhlými popáleninami. I další studie, jež proběhla v letech 2006–2011 v popáleninovém centru bruselské vojenské nemocnice, se zaměřila na klinický význam i molekulární epidemiologii komplexu ACB u popálených osob (De Vos et al., 2016). Do studie trvající 52 měsíců bylo zahrnuto 1438 hospitalizovaných pacientů, z nichž infikováno nebo kolonizováno bylo 48 (3,3 %). Z toho prokázaných infekcí (pozitivní hemokultura a laboratorní i klinické znaky infekce) bylo 11, vždy vyvolaných *A. baumannii*. Toto relativně nízké číslo (např. ve srovnání s předchozími studiemi) autoři vysvětlují tím, že oproti americké armádě, Belgie pouze sporadicky repatriuje zraněné vojáky z oblastí s vysokým výskytem multirezistentních organismů. Nedávno publikovaná retrospektivní studie amerických autorů (Aurora et al., 2018) se zaměřila na riziko opakovaných infekcí krevního řečiště různé etiologie u vojáků popálených při vojenských konfliktech. Ze 166 pacientů, u kterých byla během hospitalizace diagnostikována bakteriémie, se u 105 (63,2 %) tato komplikace objevila pouze jednou, zatímco u 61 pacientů (36,8 %) došlo k jejímu opakovanému výskytu. Bakterie komplexu ACB byly oproti ostatním agens nejčastěji izolovány v situacích, kdy nedošlo k opakované infekci (64 případů, 63 %), a zároveň byly nejvíce asociovány s mortalitou. Podle autorů mohla vysoká incidence infekcí způsobených komplexem ACB souviset s faktem, že řada pacientů byla repatriována z konfliktů na Blízkém Východě s vysokým výskytem těchto mikroorganismů. Další příčinou mohlo být to, že studie probíhala

v období epidemického výskytu kmenů komplexu ACB v americkém vojenském nemocničním systému.

Předložená studie klade důraz na precizní identifikaci izolátů na druhové úrovni, což je v kontextu dosud publikovaných údajů ohledně infekcí u pacientů s popáleninami ojedinělé. Nejčastěji jsme izolovali *A. pittii*, který obecně převažuje ve vzorcích z klinického materiálu v případech absence epidemického výskytu MDR kmenů *A. baumannii*. Z tohoto hlediska se tak naše výsledky neliší od situace u jiných skupin pacientů. Podobně je tomu tak s *A. lwoffii*, který též patří k nejčastěji izolovaným acinetobakterům u lidí (Nemec et al., 2000) a v naší studii počtem záchytů následoval po *A. pittii* a *A. baumannii*. Nález *A. lwoffii* v klinickém materiálu je vzhledem k jeho nízké patogenitě obvykle považován za důsledek pouhé kolonizace bez etiologického významu. Jinak je tomu u *A. ursingii*, který v naší studii počtem záchytů následoval za *A. lwoffii*. Tento druh je často izolován z krevního řečiště nebo jinak klinicky významného materiálu hospitalizovaných pacientů (Nemec et al., 2000, 2001) a může vyvolávat epidemické epizody septických infekcí v nemocnicích (Nemec et al., 2000; Kilic et al., 2008). Jeho druhovou vlastností je snížená citlivost až rezistence k cefalosporinům 3. generace (Dortet et al., 2006), což představuje selektivní výhodu v nemocničním prostředí, i schopnost získávat sekundární mechanismy rezistence k dalším antibiotikům (Faccone et al., 2019). Z taxonomického pohledu zajímavý je záchyt tří izolátů nedávno popsaného druhu *A. courvalinii* (Nemec et al., 2016), který náleží do tzv. hemolytické fyloskupiny a je charakteristický silnou proteolytickou aktivitou. Byl je *A. courvalinii* příležitostně izolován z lidských vzorků (Nemec et al., 2016), jeho lékařský význam není prozkoumán. Dva izoláty byly identifikovány jako *A. junii*, který se pravidelně izoluje z různých typů klinického materiálu a byl doložen i jako původce epidemických epizod na novorozeneckých odděleních (Bernards et al., 1997). Zbývající izoláty byly po jednom zařazeny do *A. indicus*, *A. radioresistens*, *A. schindleri*, *A. seifertii* a *A. towneri*, což jsou až na environmentální *A. towneri* druhy, které se příležitostně objevují ve vzorcích ambulantních i hospitalizovaných pacientů.

Z epidemiologického, klinického i terapeutického hlediska je klíčovým druhem rodu *A. baumannii* (Dijkshoorn et al., 2007). V naší studii jsme izolovali celkem 11 izolátů *A. baumannii*, tj. 21 % všech izolátů acinetobakterů. Z toho tři XDR izoláty byly citlivé pouze ke kolistinu a dva MDR izoláty citlivé vedle kolistinu též k některým aminoglykosidům a v jednom případě karbapenemům. Zbývající izoláty pak byly plně citlivé ke všem antibiotikům, které jsou primárně účinné na *A. baumannii* (Magiorakos et al., 2012). Všechny tři XDR izoláty nesly gen pro OXA-23, který způsobuje kvantitativně vysokou rezistenci ke karbapenemům a většině dalších β -laktamů, a gen pro metylázu ArmA, která modifikuje cílové místo

pro aminoglykosidy na molekule 16S rRNA a způsobuje kvantitativně vysokou rezistenci ke všem antibiotikům kanamycinové (amikacin, kanamycin a tobramycin) a gentamicinové (gentamicin a netilmicin) řady (Radolfová-Křížová et. al, 2016). XDR kmeny *A. baumannii* ECII, které jsou citlivé pouze na kolistin a nesou tyto geny rezistence byly v Česku poprvé zjištěny v polovině roku 2015 a posléze byly izolovány v řadě českých a moravských nemocnic (Radolfová-Křížová et al., 2016). Švandová (2018) pak doložila jejich pokračující šíření v Praze a Středočeském kraji v letech 2017 až 2018, a to včetně případů epidemických epizod v jednotlivých nemocnicích i přenosu mezi nemocnicemi. Tato v Česku nová subpopulace ECII, jež disponuje až na kolistin kvantitativně vysokou rezistencí ke všem klinicky využitelným antibiotikům i schopností epidemicky se šířit, tak představuje novou hrozbu zvláště pro kriticky nemocné pacienty v nemocniční péči. Navzdory tomuto potenciálu není pravděpodobné, že tři XDR izoláty z KPM mají přímou epidemiologickou souvislost, a to s ohledem na časový odstup jejich izolace a rozdíly v makrorestrikčních profilech DNA. Lze tak předpokládat, že šlo nezávislé introdukované kmeny v současnosti expandující XDR subpopulace ECII, které se na KPM dále nešířily. Absence šíření MDR nebo XDR kmenů *A. baumannii* na KPM ve sledovaném období tak vysvětluje i relativně nízkou proporcí izolátů *A. baumannii*, které v nemocničních populacích za epidemické situace výrazně převažují (Nemec et al., 1999, 2008).

Potenciál *A. baumannii* k vyvolání epidemických epizod jsme nicméně potvrdili retrospektivní analýzou MDR izolátů zachycených na KPM v roce 2012. Naše výsledky ukázaly, že pacient repatriovaný z Řecka kolonizovaný MDR kmenem *A. baumannii* ECI, který byl přijatý na KPM počátkem srpna, byl zdrojem monoklonální epidemické epizody, která postihla v období od září do října šest dalších pacientů. U dvou pacientů byl kmen izolován z krevního řečiště a jeden z nich zemřel. Významný je fakt, že tento kmen nesl gen pro karbapenemázu OXA-23, který byl do té doby v Česku zjištěn pouze ojedinele, přičemž v jednom ze tří do roku 2012 doložených případů šlo též o import skrze kolonizovaného pacienta, který byl repatriován ze středomořské oblasti (Švandová, 2018).

Z výše uvedeného plyne, že ve sledovaném období byl záchyt acinetobakterů na KPM a oproti ostatním bakteriálním agens relativně nízký a nebyla prokázána pouze acinetobakterem vyvolaná infekce ani šíření MDR kmenů těchto bakterií mezi pacienty. To však nezpochybňuje rizikovost těchto organismů, jak ukazuje příklad epidemické situace vyvolané importovaným kmenem z roku 2012 i sporadický výskyt XDR kmenů *A. baumannii* ve sledovaném období. V této souvislosti je nutno zdůraznit pilotní charakter a metodická omezení naší studie, neboť sběr trvající necelých 11 měsíců byl realizován pouze v rámci rutinního mikro-

biologického provozu, tj. bez prospektivního zaměření na selektivní záchyt acinetobakterů a související detailní epidemiologickou a klinickou analýzu. Nicméně lze doufat, že i tak naše výsledky přispějí ke studiu role acinetobakterů u humánních infekcí.

8. ZÁVĚR

Výsledky předložené práce lze vzhledem k jejím cílům specifikovaným v kapitole 4 shrnout následovně:

- Během sledovaného období (1. 2. – 15. 12. 2018) byly na KPM zachyceny 52 izoláty rodu *Acinetobacter*, což činí 2,56 % ze všech izolovaných mikroorganismů (n = 2038) a 10 % gramnegativních bakterií (n = 524). Toto relativně nízké číslo je zjevným důsledkem absence epidemického šíření acinetobakterů (viz níže).
- Zachycené 52 izoláty byly zařazeny do *A. pittii* (n = 15), *A. baumannii* (n = 11), *A. lwoffii* (n = 9), *A. ursingii* (n = 6), *A. courvalinii* (n = 3) a *A. junii* (n = 2). Po jednom izolátu připadlo na *A. indicus*, *A. haemolyticus*, *A. radioresistens*, *A. schindleri*, *A. seifertii* a *A. towneri*. Až na tři XDR a dva MDR izoláty *A. baumannii*, byly všechny izoláty plně citlivé na všechna nebo většinu antibiotik používaných v léčbě acinetobakterových infekcí. Dostupné klinické údaje nenaznačily kauzální roli acinetobakterů na manifestní infekci postižených tkání.
- Tři XDR a jeden MDR izolát *A. baumannii* izoláty patřily k celosvětově převažujícímu epidemickému klonu ECII; u jednoho MDR izolátu šlo o variantu ECII. XDR izoláty byly citlivé pouze na kolistin a nesly geny pro karbapenemázu OXA-23 a metylázu ArmA, jež jsou zodpovědné za kvantitativně vysokou rezistenci k β -laktamům a aminoglykosidům. XDR izoláty patří k subpopulaci ECII, jež aktuálně expanduje v tuzemských nemocnicích. Vzájemná epidemiologická vazba XDR izolátů na KPM je nepravděpodobná.
- Pacient repatriovaný v srpnu 2012 byl kolonizovaný MDR kmenem *A. baumannii* ECI nesoucím gen pro karbapenemázu OXA-23. Tento kmen způsobil na KPM monoklonální epidemickou epizodu, která postihla od září do října šest dalších pacientů, z nichž jeden v souvislosti s infekcí zemřel. Tato kauza dokládá hrozbu při epidemickém šíření MDR/XDR kmenů acinetobakterů.

9. LITERATURA

Albrecht, M., Griffith, M.A., Murray, C.K., Chung, K.K., Horvath, E.E. et al. (2006). Impact of *Acinetobacter* infection on the mortality of burn patient. *J. Am. Coll. Surg.* 203: 546-550.

Aurora, A., Le, T.D., Akers, K.S., Blyth, D.M., Graybill, J.C. et al. (2018). Recurrent bacteremia: A 10-year retrospective study in combat-related burn casualties. *Burns*. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2018.10.003>.

Bartual, S.G., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, M.A.D., Wisplinghoff, H., Rodriguez-Valera, F. (2005). Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4382–4390.

Baumann, P. (1968). Isolation of *Acinetobacter* from Soil and Water. *J. Bacteriol.* 96: 39-42.

Bernards, A.T., de Beaufort, A.J., Dijkshoorn, L., van Boven, C.P. (1997). Outbreak of septicaemia in neonates caused by *Acinetobacter junii* investigated by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and four typing methods. *J. Hosp. Infect.* 35: 129-40.

Bouvet, P.J.M., Grimont, P.A. (1986). Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp.nov., and *Acinetobacter junii* sp.nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwofii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 228-240.

Buxton, A.E., Anderson, R.L., Werdegar, D., Atlas, E. (1978). Nosocomial respiratory tract infection and colonization with *Acinetobacter calcoaceticus*. Epidemiologic characteristics. *Am. J. Med.* 65: 507-5013.

CLSI. (2015). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 25th informational supplement M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

Cosgaya, C., Marí-Almirall, M., Van Assche, A., Fernández-Orth, D., Mosqueda, N. et al. (2016). *Acinetobacter dijkschoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 4105-4111.

Da Silva, G., Dijkshoorn, L., van der Reijden, T., van Strijen, B., Duarte, A. (2007). Identification of widespread, closely related *Acinetobacter baumannii* isolates in Portugal as a subgroup of European clone II. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 190-195.

Dansby, W., Purdue, G., Hunt, J., Arnoldo, B., Phillips, D., et al. (2008). Aerosolization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* during an epidemic in a Burn Intensive Care Unit. *J. Burn Care Res.* 8: 331-337.

De Vos, D., Pirnay, J.P., Bilocq, F., Jennes, S., Verbeken, G., Rose, T. et al. (2016). Molecular epidemiology and clinical impact of *Acinetobacter calcoaceticus – baumannii* complex in a Belgian Burn Wound Center. *PLoS ONE.* 11: e0156237.

Di Popolo, A., Giannouli, M., Triassi, M., Brisse, S., Zarrilli, R. (2011). Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme. *Clin. Microbiol. Infect.* 17: 197-201.

Diancourt, L., Passet, V., Nemec, A., Dijkshoorn, L., Brisse, S. (2010). The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS ONE.* 5: e10034.

Dijkshoorn, L., Aucken, H., Gerner-Smidt, P., Janssen, P., Kaufmann, M.E. et al. (1996). Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1519-1525.

Dijkshoorn, L., Nemec, A., Seifert, H. (2007). An increasing threat in hospitals: multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 939–951.

Dortet, L., Legrand, P., Soussy, C.J., Cattoir, V. (2006). Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 44: 4471-4478.

Erol, S., Altoparlak, U., Akcay, M.N., Celebi, F., Parlak, M. (2004). Changes of microbial flora and wound colonization in burned patients. *Burns.* 30: 357-361.

EUCAST. (2019). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 9.0. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints.

Faccone, D., Martino, F., Pasteran, F., Albornoz, E., Biondi, E., Vazquez, M., Rapoport, M., Rodrigo, V., De Belder, D., Gomez, S., Corso, A. (2019). Multiple clones of metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter ursingii* in a children hospital from Argentina. *Infect. Genet. Evol.* 67: 145-149.

Freiwald, A., Sauer, S. (2009). Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 4: 732-742.

Greenhalgh, D.G., Suffle, J.R., Holmes, J.H., Gamelli, R.L., Palmieri, T.L. et al. (2007). American Burn Association consensus conference to define sepsis and infection in burns. *J. Burn Care Res.* 28: 776-790.

Church, D., Elsayed, S., Reid, O., Winston, B., Lindsay, R. (2006). Burn Wound Infections. *ASM.* 19: 403-434.

Jawad, A., Seifert, H., Snelling, A.M., Heritage, J., Hawkey, P.M. (1998). Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1938-1941.

Kilic, A., Li, H., Mellmann, A., Basustaoglu, A.C., Kul, M., Senses, Z., Aydogan, H., Stratton, C.W., Harmsen, D., Tang, Y.W. (2008). *Acinetobacter septicus* sp. Nov. association with a nosocomial outbreak of bacteremia in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 46: 902-908.

Königová, R., Bláha, J. (2010). Komplexní léčba popáleninového traumatu. Praha: Karolinum, ISBN 978-80-246-1670-4.

Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., Nemeč, A. (2015). *Acinetobacter albensis* sp. nov., isolated from natural soil and water ecosystems. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65: 3905-3912.

Leseva, M., Arguirova, M., Nashev, D., Zamfirova, E., Hadzhyiski, O. (2013). Nosocomial infection in burn patients: etiology, antimicrobial resistance, means to control. *Ann. Burns Fire Disasters.* 26: 5-11.

Lipový, B., Brychta, P., Hanslianová, M., Suchánek, I. (2012a). Prevalence a etiologie infekce popálené plochy, výsledky evropské multicentrické studie. *Hojení ran.* 6: 28-30.

Lipový, B., Fiamoli, M., Gregorová, N., Říhová, H., Jarkovský, J., Cvanová, M. et al. (2012b). Epidemiologie kritických popálenin na jižní Moravě. *Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae. Čechosl.* 79: 370-375.

Lipový, B., Říhová, H., Hansaliová, M., Burgetová, D., Kaloudová, Y., Suchánek I., Brychta, P. (2010). Změna bakteriálního spektra na ranných plochách u těžce popálených pacientů. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 59: 34-38.

Magiorakos, A.,P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E. et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18: 268-281.

Maiden, M.C., Jansen van Rensburg, M.J., Bray, J.E., Earle, S.G., Ford, S.A. et al. (2013). MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* 11: 728-736.

Murray, P.(1999). *Manual of clinical Microbiology*. 7. Washington: American Society for Microbiology, ISBN 1-55581-126-4.

Nemec, A., Dijkshoorn, L., Ježek, P. (2000). Recognition of two novel phenons of the genus *Acinetobacter* among non-glucose-acidifying isolates from human specimens. *J Clin Microbiol.* 38: 3937-3941.

Nemec, A. (2004). Studium lékařsky významných kmenů rodu *Acinetobacter* (Soubor publikovaných prací z let 1996-2004 s komentářem). Habilitační práce. 2. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Praha. [http://apps.szu.cz/anemec/Nemec_2004_Habilitace.pdf]. Str. 1.

Nemec, A., Dijkshoorn, L., van der Reijden, T.J.K. (2004). Long-term predominance of two pan-European clones among multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. *J. Med. Microbiol.* 53: 147-153.

Nemec, A., Janda, J., Melter, O., Dijkshoorn, L. (1999). Genotypic and phenotypic similarity of multiresistant *Acinetobacter baumannii* isolates in the Czech republic. *J. Med. Microbiol.* 48: 287-296.

Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T.J.K., Deschaght, P. et al. (2011). Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res. Microbiol.* 162: 393-404.

Nemec, A., Křížová, L., Maixnerová, M., Diancourt, L., van der Reijden, T.J.K. et al. (2008). Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. *J. Antimicrob. Chemother.* 62: 484-489.

Nemec, A., Radolfova-Krizova, L., Maixnerova, M., Vrestiakova, E., Jezek, P., Sedo, O. (2016). Taxonomy of haemolytic and/or proteolytic strains of the genus *Acinetobacter* with the proposal of *Acinetobacter courvalinii* sp. nov. (genomic species 14 sensu Bouvet & Jean-jean), *Acinetobacter dispersus* sp. nov. (genomic species 17), *Acinetobacter modestus* sp. nov., *Acinetobacter proteolyticus* sp. nov. and *Acinetobacter vivianii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 1673-1685.

Nemec, A., De Baere, T., Tjernberg, I., Vaneechoutte, M., van der Reijden, T.J.K., Dijkshoorn, L. (2001). *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1891-1899.

Radolfová-Křížová, L., Maixnerová, M., Jakubů, V., Nemec, A. (2016). Extenzivně rezistentní kmeny *Acinetobacter baumannii* nesoucí geny pro karbapenemázu OXA-23 a metylázu ArmA v nemocnicích České republiky. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 25: 231-234.

Rezaei, E., Safari, H., Naderinasab, M., Aliakbarian, H. (2011). Common pathogens in burn wound and changes in their drug sensitivity. *Burns*. 37: 805-807.

Rice, L. B. (2008). Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J. Infect. Dis.* 197: 1079-1081.

Rossau, R., Van Landschoot, A., Gillis, M., De Ley, J. (1991). Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a New Bacterial Family To Accommodate the Genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and Related Organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 310-319.

Seifert, H., Baginski, R., Schulze, A., Pulveler, G. (1993). Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 37: 750-753.

Schommer, N.N., Gallo, R.L. (2013). Structure and function of the human skin microbiome. *Trends Microbiol.* 21: 660-8.

Švandová L. (2018). Extenzivně rezistentní *Acinetobacter baumannii* v České republice: populačně genetická struktura a mechanismy rezistence ke karbapenemům a aminoglykosidům. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha.

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M. et al. (2018). WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* 18: 318-327.

Touchon, M., Cury, J., Yoon, E.J., Krizova, L., Cerqueira, G.C et al. (2014). The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. *Genome Biol. Evol.* 6: 2866-2882.

Turton, J.F., Gabriel, S.N., Valderrey, C., Kaufmann, M.E., Pitt, T.L. (2007) Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 807-815.

Van Dessel, H., Dijkshoorn, L., van der Reijden, T., Bakker, N., Paauw, A. et al. (2004). Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res. Microbiol.* 155: 105-112.

Votava, M. (2003) *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, ISBN 80-902896.

Vránková, J., Bendová, E., Königová, R. a Brož, L. (1998). Bacteriological monitoring in the Prague burns center. *Acta chirurgiae plasticae.* 40: 105-108.

WHO (World Health Organization) (2017). Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. http://www.who.int/medicines/publications/WHOPPLShort_Summary_25FebET_NM_WHO.

Wong, D., Nielsen, T.B., Bonomo, R.A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., Spellberg, B. (2017). Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* 30: 409-447.

Yoon, E.J., Goussard, S., Touchon, M., Krizova, L., Cerqueira, G. et al. (2014). Origin in *Acinetobacter guillouiae* and dissemination of the aminoglycoside-modifying enzyme Aph(3')-VI. *mBio* 5: e01972-14.

Poděkování

V první řadě děkuji svému školiteli prof. Alexandru Nemcovi za odborné vedení a cenné rady při psaní této práce a Martině Maixnerové nejen za technickou pomoc a podporu (Laboratoř bakteriální genetiky, SZÚ). Poděkování dále patří všem kolegům z Ústavu laboratorní diagnostiky úseku lékařské mikrobiologie FNKV, kteří mi byli vždy nápomocni při předávání a uchovávání testovaných kmenů během rutinního celotýdenního chodu mikrobiologické laboratoře a také kolektivu Kliniky popáleninové medicíny FNKV.