

UNIVERZITA KARLOVA

2. lékařská fakulta



**Studium lékařsky významných kmenů
rodu *Acinetobacter***

Studie z let 1996-2004 s komentářem

ALEXANDR NEMEC

Praha 2004

Habilitační práce
v oboru lékařské mikrobiologie

PŘEDMLUVA

Politické změny na podzim 1989 mi umožnily v následujícím roce nastoupit na místo bakteriologa do Institutu hygieny a epidemiologie v Praze (dnes Státní zdravotní ústav). Začal jsem pracovat v odborné skupině Klinické mikrobiologie vedené prof. Jiřím Schindlerem a mým prvním úkolem bylo zavedení metod molekulární typizace bakterií pro účely epidemiologické analýzy. Cílovými organismy byly zvláště gramnegativní bakterie uplatňující se jako podmíněné patogeny v nemocničních infekcích; metody zahrnovaly strukturální analýzu buněčných bílkovin, plazmidové a chromozomální DNA. Šlo o první české pracoviště, které se začalo této problematice systematicky věnovat.

V červnu roku 1991 došlo k závažné infekční komplikaci u malého chlapce hospitalizovaného na Klinice popáleninové medicíny ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady. Z krve pacienta s rozvinutou sepsí byl izolován kmen acinetobaktera, který byl vysoce rezistentní ke většině dostupných antibiotik. Epidemiologické šetření současně prokázalo výskyt kmenů acinetobakterů v prostředí kliniky a acinetobaktery byly zachyceny i z klinického materiálu dalších pacientů. Prof. Schindler mě požádal, abych pomocí již zavedených metod porovnal všechny dostupné izoláty. Výsledky ukázaly, že kmen, který vyvolal infekci u malého chlapce, se na klinice vyskytoval již dříve. Tento kmen kolonizoval chlapcovy popáleniny a byl zavlečen do krevního řečiště pomocí nitrožilního katetru. Podrobná bakteriologická analýza však také (a především) otevřela řadu otázek týkajících se kmenové a druhové identity a populační struktury acinetobakterů, výpovědní hodnoty různých metod a s tím spojených interpretačních obtíží při určování epidemiologické vazby. Tematizace těchto otázek se stala těžištěm mého odborného zájmu v následujících letech.

Předložená práce rekapituluje cestu, kterou jsem s acinetobaktery prošel. Cestu, při níž se studovaný organismus stal čas od času partnerem, aby mi připomněl, že příroda není deterministický stroj ale živý subjekt, o něž je nutno pečovat. Cestu, která mi přinesla setkání s vynikajícími lidmi, bez nichž by tato práce nevznikla a bez nichž bych byl chudší především já sám. Jim patří můj dík.



Alexandr Nemeč

V Kladně, 17. listopadu 2004

SEZNAM KAPITOL

1. Úvod: rod <i>Acinetobacter</i> u člověka	4
1.1. Taxonomie	4
1.2. Lékařský význam	5
1.3. Epidemiologie nemocničních infekcí	6
1.4. Rezistence k antibiotikům	8
2. Studium lékařsky významných kmenů rodu <i>Acinetobacter</i> (komentář k publikovaným studiím)	9
2.1. Struktura nemocniční populace <i>Acinetobacter baumannii</i>	9
2.1.1. Acinetobaktery na klinice popáleninové medicíny	9
2.1.2. Dvě hlavní klonální uskupení <i>A. baumannii</i> v České republice	9
2.1.3. Studium O-antigenů pomocí monoklonálních protilátek	10
2.1.4. Vztah českých klonálních skupin a západoevropských klonů	11
2.1.5. Povaha a vlastnosti panevropských klonů	12
2.1.6. Praktická metoda epidemiologické typizace multirezistentních kmenů	13
2.2. Povaha multirezistence <i>Acinetobacter baumannii</i>	13
2.2.1. Vztah mezi klonalitou a rezistencí k aminoglykozidům	13
2.2.2. Klony a determinanty rezistence k tetracyklinům	15
2.2.3. Efluxová pumpa AdeABC	15
2.2.4. Antibiotický účinek peptidu odvozeného z humánního laktoferinu	16
2.3. Druhová diverzita rodu <i>Acinetobacter</i>	16
2.3.1. Metoda konsenzuální identifikace	17
2.3.2. Druhová diverzita klinických izolátů z České republiky	17
2.3.3. Studium druhově nezařazených kmenů	18
2.3.4. <i>Acinetobacter ursingii</i> , <i>A. schindleri</i> a <i>A. parvus</i>	18
2.3.5. Taxonomie hemolytických kmenů	19
2.3.6. Současný stav druhové klasifikace	20
2.4. Shrnutí	22
3. Přílohy	
3.1. <u>Nemec A.</u> Taxonomie rodu <i>Acinetobacter</i> . <i>Epidemiol Mikrobiol Imunol</i> 1996;45:23-29.	
3.2. <u>Nemec A.</u> , Urbášková P, Grimont F, Vránková J, Melter O, Schindler J. Identifikace a typizace nemocničních kmenů komplexu <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> - <i>Acinetobacter baumannii</i> . <i>Epidemiol Mikrobiol Imunol</i> 1996;45:71-82.	
3.3. <u>Nemec A.</u> , Janda J, Melter O, Dijkshoorn L. Genotypic and phenotypic similarity of multiresistant <i>Acinetobacter baumannii</i> isolates in the Czech Republic. <i>J Med Microbiol</i> 1999;48:287-296.	
3.4. Pantophlet R, <u>Nemec A.</u> , Brade L, Brade H, Dijkshoorn L. O-antigen diversity among <i>Acinetobacter baumannii</i> strains from the Czech Republic and Northwestern Europe, as determined by lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies. <i>J Clin Microbiol</i> 2001;39:2576-2580.	

- 3.5. Pantophlet R, Severin JA, Nemec A, Brade L, Dijkshoorn L, Brade H. Identification of *Acinetobacter* isolates from species belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex with monoclonal antibodies specific for O antigens of their lipopolysaccharides. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:60-65.
- 3.6. Nemec A, van der Reijden TJK, Dijkshoorn L. Multirezistentní klony *Acinetobacter baumannii* v České republice. *Klin Mikrobiol Inf Léč* 2003; 9: 130-137.
- 3.7. Nemec A, Dijkshoorn L, van der Reijden TJK. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. *J Med Microbiol* 2004;53:147-153.
- 3.8. Nemec A. Využití diskového difúzního testu v epidemiologické typizaci multirezistentních kmenů *Acinetobacter baumannii*. *Klin Mikrobiol Inf Léč* 1999;5:287-297.
- 3.9. Nemec A, Dolzani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol* 2004; 53: 1233-1240.
- 3.10. Nemec A, Maixnerová M. Rezistence k aminoglykozidům u nemocničních kmenů *Acinetobacter baumannii* v České republice. *Klin Mikrobiol Inf Léč* 2004; 10: 223-228.
- 3.11. Huys G, Cnockaert M, Vaneechoutte M, Woodford N, Nemec A, Dijkshoorn L, Swings J. Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals. *Res Microbiol* (v tisku).
- 3.12. Dijkshoorn L, Brouwer CP, Boogaards S, Nemec A, van den Broek PJ, Nibbering P. The synthetic N-terminal peptide of human lactoferrin, hLF(1-11), is highly effective against experimental infection caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4919-4921.
- 3.13. Nemec A, Dijkshoorn L, Ježek P. Recognition of two novel phenons of the genus *Acinetobacter* among non-glucose-acidifying isolates from human specimens. *J Clin Microbiol* 2000;38:3937-3941.
- 3.14. Nemec A, De Baere T, Tjernberg I, Vaneechoutte M, van der Reijden TJK, Dijkshoorn L. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1891-1899.
- 3.15. Nemec A, Dijkshoorn L, Cleenwerck I, De Baere T, Janssens D, van der Reijden TJK, Ježek P, Vaneechoutte M. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small colony forming species isolated from human specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1563-1567.
- 3.16. Dijkshoorn L, Nemec A, van der Reijden TJK, De Baere T, Ježek P, van den Broek PJ, Vaneechoutte M. Extended description of three novel *Acinetobacter* species of possible clinical relevance, *Acinetobacter ursingii*, *Acinetobacter schindleri* and *Acinetobacter parvus*. The 104th General ASM Meeting, New Orleans, LA, May 23-27, 2004.
- 3.17. Nemec A, Dijkshoorn L, van der Reijden T, De Baere T, van den Broek PJ, Vaneechoutte M. The recognition of two tentative novel species among haemolytic *Acinetobacter* strains [abstract P1855]. In: 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Prague, Czech Republic, 1-4 May 2004. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(suppl 3):530.

1. ÚVOD: ROD *ACINETOBACTER* U ČLOVĚKA

Rod *Acinetobacter* zahrnuje bakterie běžně rozšířené v přírodě, které pro svou nízkou patogenitu stály dlouho na okraji zájmu lékařských mikrobiologů. Během posledních desetiletí však došlo k dramatickému posunu v jejich klinickém významu a dnes se řadí k důležitým původcům nemocničních infekcí. V nemocnicích mohou dlouhodobě přežívat a vyvolávat epidemie postihující zvláště kriticky nemocné pacienty v intenzivní péči. Jsou často multirezistentní a pokračující vývoj jejich rezistence vede k obavám z úplného selhání antibiotické léčby vyvolaných infekcí.

1.1. Taxonomie

Rod *Acinetobacter* zahrnuje gramnegativní, nepohyblivé, striktně aerobní bakterie, které netvoří oxidázu a mají morfologii krátkých tyček či koků uspořádaných obvykle ve dvojicích.² Podle primární struktury 16S ribozomální RNA a pozitivního transformačního testu (schopnosti DNA testovaného izolátu transformovat kmen *Acinetobacter baylyi* BD413trpE27 na kmen prototrofní)³ představuje geneticky a fylogeneticky diskrétní skupinu. Spolu s rody *Moraxella* a *Psychrobacter* se řadí do čeledi *Moraxellaceae*, která je součástí podtřídy gama třídy *Proteobacteria*.⁴

Systematickému studiu acinetobakterů dlouho bránila chybějící druhová klasifikace. Předělem se stala studie Bouveta a Grimonta z roku 1986, kteří pomocí metody DNA-DNA hybridizace rozdělili rod do 12 DNA skupin (DS).⁵ Šest těchto skupin bylo pojmenováno (*Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter johnsonii* a *Acinetobacter lwoffii*), zatímco ostatní obsahovaly malý počet kmenů nebo je nebylo možno fenotypově identifikovat a zůstaly proto pouze očíslovány. Roku 1989 popsali Bouvet a Jeanjeanová dalších pět DNA skupin zahrnujících proteolytické kmeny.⁶ V tomtéž roce Tjernbergová a Ursing publikovali klasifikaci kmenů izolovaných z klinického materiálu, která se shodovala s klasifikací Bouveta a Grimonta a v níž byly popsány tři nové DNA skupiny.⁷ Protože tyto studie vznikly nezávisle na sobě, byly DNA skupiny 13 až 15 označeny nejednotně (skupiny se stejným číslem se proto rozlišují iniciálami autorů, např. 13BJ resp. 13TU). Stav klasifikace a nomenklatury rodu k roku 1996 je uveden v *příloze 3.1.*, její současný stav pak na str. 20 (*kapitola 2.3.6.*).

Pro druhovou identifikaci byla navržena řada metod, ale jenom některé byly ověřeny na dostatečném počtu referenčních kmenů představujících všechny popsané druhy. Zlatým standardem je DNA-DNA reasociace (hybridizace), metoda zároveň klasifikační. Souvisí přímo s definicí bakteriálního druhu, do něhož náležejí všechny kmeny vykazující nejméně 70 % příbuznost genomové DNA prokázanou v reasociačním experimentu.⁸ Pro svou náročnost se však používá pouze v klasifikačních studiích. V roce 1987 Bouvet a Grimont publikovali metodu identifikace pomocí 19 biochemických (převážně asimilačních) testů (viz *příloha 3.1.*: tabulka 2), která umožnila identifikovat téměř všechny druhy/DNA skupiny.⁹ Pozdější vyhodnocení tohoto schématu pomocí numerické pravděpodobnostní identifikace však ukázalo jeho nízkou účinnost pro některé fenotypově podobné druhy/DNA skupiny.

¹ Název doktorské disertační práce Alexandry T. Bernarda (Leiden University, 1998).

² Baumann P et al. *J Bacteriol* 1968;95:1520-1541.

³ Juni E. *J Bacteriol* 1972;112:917-931.

⁴ Rossau R et al. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:310-319.

⁵ Bouvet PJM, Grimont PAD. *Int J Syst Bacteriol* 1986;36:228-240.

⁶ Bouvet PJM, Jeanjean S. *Res Microbiol* 1989;140:291-299.

⁷ Tjernberg I, Ursing J. *APMIS* 1989; 97:595-605.

⁸ Wayne LG et al. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:463-464.

⁹ Bouvet PJM, Grimont, PAD. *Ann Inst Pasteur/Microbiol* 1987;138:569-578.

ny.¹⁰ Šlo zvláště o *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, DS 3 a DS 13TU, pro něž bylo v souladu s jejich genotypovou podobností navrženo skupinové označení komplex *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (ACB). Později byly vypracovány další biochemické metody avšak sestava testů podle Bouveta a Grimonta se stala nejčastěji používanou fenotypovou identifikační metodou. Druhovú identifikace acinetobakterů diagnostickými soupravami (např. Biomérieux API20NE, Biolog) je nespolehlivá.¹¹

Jednou z mála dostatečně vyhodnocených genotypových identifikačních metod a zároveň metodou nejrozšířenější je ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*), při níž se 16S rDNA amplifikovaná pomocí PCR štěpí restrikcími endonukleázami a výsledné profily se srovnávají s knihovnou známých profilů pro jednotlivé druhy/DNA skupiny.¹² Tato metoda rozlišila všechny známé druhy/DNA skupiny s výjimkou *A. johnsonii*, *A. haemolyticus* a DS 13BJ/14TU.¹³ Pravděpodobně neúčinnější identifikační metodou (vedle DNA-DNA hybridizace) je AFLP založená na selektivní amplifikaci restrikcími fragmentů genomové DNA a jejich separaci na sekvenačním zařízení. Výsledkem jsou komplexní profily odrážející strukturu celého genomu, jejichž podobnost se vyhodnocuje numericky. Korelace výsledků AFLP a DNA-DNA hybridizace je vynikající, což umožňuje její použití i pro klasifikaci dosud nezařazených kmenů.¹⁴

Taxonomicky významnou otázku představují kmeny neidentifikovatelné do žádného z dosud popsaných druhů/DNA skupin. Ve své studii z roku 1986 Bouvet s Grimontem nezařadili 11 z 85 kmenů studovaných DNA-DNA hybridizací do žádné z 12 popsaných DNA skupin. Čtyři z těchto kmenů později Bouvet a Jeanjeanová (1989) klasifikovali do nových DNA skupin, ale dalších 7 z 27 studovaných proteolytických kmenů zůstalo nezařazeno. Podobně Tjernbergová a Ursing (1989) nezařadili 16 z 198 kmenů do žádné ze 14 druhů/DNA skupin. Neidentifikované kmeny se běžně popisují i ve studiích založených na některé z fenotypových nebo genotypových identifikačních metod (*příloha 3.1.*: tabulka 5). Jejich výskyt může být důsledkem nedostatečně popsané vnitrodruhové diverzity nebo mohou spolu s kmeny nezařazenými v hybridizačních studiích představovat dosud nepopsané druhy.

1.2. Lékařský význam

Pro nízkou patogenitu acinetobakterů se jejich nález v klinickém materiálu obvykle považoval za důsledek druhotné kontaminace nebo kolonizace. Nicméně již práce ze 70. let uvádějí závažné infekce u hospitalizovaných pacientů.¹⁵ Postupem času se význam acinetobakterů jakožto nemocničních patogenů výrazně zvýšil, a to v souvislosti se změnami v nemocniční péči v 70. a 80. letech, především používáním širokospektrých antibiotik a rozšířením invazivních diagnostických a terapeutických výkonů.¹⁶ V evropské prevalenční studii z roku 1995 se acinetobaktery uvádějí jako původci 8 % bakteriálních infekcí na jednotkách intenzivní péče (JIP).¹⁷ V jiné studii se umístily na sedmém místě nejčastěji izolovaných původců nemocničních infekcí na JIP a jako původce 10 % nozokomiálních infekcí dýchacího ústrojí.¹⁸

U hospitalizovaných pacientů je nejčastěji postižen dolní respirační trakt. Nozokomiální pneumonie je obvykle spojena s mechanickou ventilací kriticky nemocných pacientů na JIP.¹⁹ Riziko kolonizace a infekce dýchacího traktu vzrůstá s délkou pobytu v nemocnici, dobou mechanické ventilace a s předchozím podáváním širokospektrých β -laktamových a aminoglykozidových antibiotik.²⁰ Pneu-

¹⁰ Gerner-Smidt P et al. *J Clin Microbiol* 1991;29:277-282.

¹¹ Bernards AT et al. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:303-308.

¹² Vaneechoutte M et al. *J Clin Microbiol* 1995;33:11-15.

¹³ Dijkshoorn L et al. *System Appl Microbiol* 1998;21:33-39.

¹⁴ Janssen P et al. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:1179-1187.

¹⁵ Glew RH et al. *Medicine* 1977;56:79-97.

¹⁶ Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:148-165.

¹⁷ Vincent JL et al. *JAMA* 1995;274:639-644.

¹⁸ Spencer RC. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:281-285.

¹⁹ Hartstein AI et al. *Am J Med* 1988;85:624-631.

²⁰ Peacock JE Jr et al. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1988;9:302-308.

monie vyvolané acinetobaktery mívají těžký průběh se smrtností až 73 %.²¹ Acinetobaktery vyvolávají u hospitalizovaných pacientů dále sepse, infekce močového traktu, meningitidy, endokarditidy, infekce ran a popálených ploch, osteomyelitidy a peritonitidy.²² Tyto infekce jsou obvykle spojeny s chirurgickými a invazivními terapeutickými zásahy a postihují pacienty s oslabenou imunitou, závažným základním onemocněním nebo poraněním. Sepse mohou vznikat jako následek kolonizace dýchacího ústrojí u intubovaných pacientů či v souvislosti se zavedením nitrožilních katetrů.²³ Jejich průběh závisí na závažnosti základního onemocnění i druhu etiologického agens; infekce vyvolané *A. baumannii* mívají závažnější průběh než infekce vyvolané jinými druhy.²⁴

Acinetobakterové infekce mimo nemocnice jsou ojedinělé. Acinetobakterová etiologie byla prokázána u 4-14 % pacientů se signifikantní bakteriurií.²⁵ Vzácným ale závažným onemocněním jsou pneumonie, které postihují častěji osoby s rizikovými faktory (např. alkoholismus, kouření, chronické onemocnění dýchacích cest) a u nichž smrtnost dosahuje až 64 %.²⁶

Jednotlivé druhy a DNA skupiny se svým významem liší. Většina klinicky a epidemiologicky významných kmenů náleží do komplexu *ACB*. Nejvýznamnější druhem je *A. baumannii*, který představuje zhruba tři čtvrtiny všech nemocničních izolátů acinetobakterů.²⁷ Zahrnuje převážnou většinu kmenů s hromadným výskytem v nemocnicích a většinu multirezistentních kmenů. Studie založené na metodách umožňujících spolehlivé rozlišení DNA skupin komplexu *ACB* však ukázaly, že DS 3 a DS 13TU se mohou v klinickém materiálu vyskytovat s četností srovnatelnou s *A. baumannii*.²⁸ Tyto organismy mohou podobně jako *A. baumannii* dlouhodobě perzistovat na rizikových odděleních a vyvolávat nemocniční epidemie, vyznačují se však nižší rezistencí k antibiotikům.²⁹

Málo se ví o klinickém významu druhů a DNA skupin nenáležících do komplexu *ACB*, což vyplývá z převažujícího zájmu o nemocniční infekce, kde komplex *ACB* dominuje, a z často nedostatečné identifikace v klinicky zaměřených studiích. *A. lwoffii* je běžný u ambulantních pacientů a je nejčastěji izolovaným druhem z kůže a sliznic zdravých osob i pacientů.³⁰ Z kůže a sliznic člověka se izolují i *Acinetobacter radioresistens*, *A. johnsonii* a *A. junii*.³¹ S přirozeným výskytem těchto druhů na kůži souvisí zřejmě i jejich izolace u pacientů s katetrovou bakteriemií.³² *A. baumannii* se oproti tomu na kůži a sliznicích vyskytuje velmi sporadicky a jeho přirozený zdroj je neznámý. Nemocniční epidemie způsobené druhy nenáležícími do komplexu *ACB* jsou ojedinělé; dosud publikované případy se týkají šíření *A. junii* na novorozeneckých JIP a pediatrickém onkologickém oddělení.³³

1.3. Epidemiologie nemocničních infekcí

Nemocniční epidemie jsou obvykle způsobeny jedním bakteriálním kmenem, často jsou explozivní a mají společný zdroj, např. kontaminované zařízení pro mechanickou ventilaci, zvlhčovače vzduchu, převodníky pro měření tlaku v artériích nebo vyhřívací lázně pro peritoneální dialyzační roztok.³⁴ Nejběžnější cestou přenosu jsou ruce personálu kontaminované při ošetřování kolonizovaných pacientů. Buňky acinetobakterů přežívají na suchém povrchu a prachových částicích déle než je

²¹ Fagon JY et al. *Clin Infect Dis* 1996;23:538-542.

²² Levi I, Rubinstein E. In: Bergorne-Bérézin E et al. (eds): *Acinetobacter microbiology, epidemiology, infections, management*. Boca Raton, CRC Press, 1996,101-115.

²³ Tilley PA, Roberts FJ. *Clin Infect Dis* 1994;18:896-900. Regev R, Dolfin T, Zelig I et al. *Infection* 1993;21:394-396.

²⁴ Seifert H et al. *Infection* 1994;22:379-385.

²⁵ Levi I, Rubinstein E, viz odkaz 24.

²⁶ Anstey NM et al. *Clin Infect Dis* 1992;14:83-91.

²⁷ Bouvet PJM, Grimont PAD. *Ann Inst Pasteur/Microbiol* 1987;138:569-578. Seifert H, Baginski R et al. *Zbl Bakt* 1993;279:544-552.

²⁸ Tjernberg I, Ursing J. *APMIS* 1989;97:595-605. Dijkshoorn L et al. *J Clin Microbiol* 1993a;31:702-705.

²⁹ Horrevorts A et al. *J Clin Microbiol* 1995;33:1567-1572. McDonald A et al. *J Chemother* 1999;11:338-344.

³⁰ Germer-Smidt P, Frederiksen W. *APMIS* 1993;101:815-825. Seifert H et al. *J Clin Microbiol* 1997;35:2819-2825.

³¹ Seifert H et al. *J Clin Microbiol* 1997;35:2819-2825.

³² Seifert H et al. *Clin Infect Dis* 1993;17:632-636.

³³ Kappstein I et al. *J Hosp Infect* 2000;44:27-30.

³⁴ Hartstein AI et al. *Am J Med* 1988;85:624-631. Schloesser RL et al. *Infection* 1990 ;18:230-233. Beck-Sagué CM et al. *Am J Epidemiol* 1990;132:723-733. Abrutyn E et al. *Am J Epidemiol* 1978;107:328-335.

známo u stafylokoků.³⁵ Tato jejich vlastnost, mezi gramnegativními organismy ojedinělá, může výrazně přispívat ke vzniku a trvání epidemií. Jsou známy případy, kdy rozšíření kmene importovaného do nemocnice nezabránila ani přísná režimová opatření používaná pro stafylokoky rezistentní k meticilinu.³⁶

Pro analýzu lokálních nemocničních epidemií má zásadní význam subspecifická typizace, při níž se porovnáním vlastností bakteriálních izolátů ověřuje jejich předpokládaná epidemiologická vazba. Typizace má význam i při sledování šíření určitých kmenů (klonů) v širším geografickém a časovém měřítku a výběru kmenů pro studium klinicky a epidemiologicky významných vlastností. Typizační systémy jsou obecné a komparativní. Zatímco obecné systémy umožňují porovnání výsledků získaných v různých laboratořích, systémy komparativní (např. fingerprintingové metody) jsou omezeny na studované soubory a přímé srovnání nezávisle získaných výsledků neumožňují. Kritérii pro posouzení účinnosti typizačního systému jsou především typovatelnost, reprodukovatelnost a rozlišovací účinnost. Flexibilita, rychlost a snadnost použití jsou parametry vyjadřující jeho praktickou použitelnost.³⁷

Literatura uvádí pro acinetobaktery množství typizačních metod založených na analýze fenotypových vlastností a struktury biologických makromolekul. Tradiční fenotypové systémy (fagotypizace, sérotypizace) nenašly z důvodu nízké typovatelnosti a obtíží s referenčními materiály širší použití. Používaná je biotypizace navržená Bouvetem a Grimontem pro *A. baumannii*, která je založená na utilizaci šesti různých uhlíkatých substrátů.³⁸ Známých je 19 biotypů, rozlišovací účinnost této metody však je nízká, neboť zhruba 90 % nemocničních kmenů náleží do čtyř biotypů.³⁹ Nejdostupnější metodou je vyšetření citlivosti na antibiotika. Obvyklá je kvalitativní interpretace minimálních inhibičních koncentrací nebo průměrů inhibičních zón v diskovém testu (citlivý-rezistentní), která však vede ke ztrátě informace o míře citlivosti a nereprodukovatelnosti v situaci, kdy hodnoty kolísají kolem hraničních hodnot citlivosti (breakpointů). Tato omezení odstraňuje numerická srovnávací analýza průměrů inhibičních zón.⁴⁰

Nejcitlivější a nejspolehlivější rozlišení kmenů umožňují metody strukturální analýzy chromozomální DNA. Vysoce účinná je makrorestrikční analýza spojená s dělením restričních fragmentů v pulzním elektrickém poli. Poskytuje lepší rozlišení než ribotypizace, která je založená na restričním polymorfismu fragmentů DNA nesoucích geny pro rRNA.⁴¹ Nevýhodou makrorestrikční analýzy je pracovní náročnost (vyšetření trvá tři až čtyři dny). Navržena byla i řada fingerprintingových metod založených na PCR.⁴² Tyto metody jsou rychlé a dostupné a obvykle poskytují dostatečné rozlišení pro průkaz lokálních epidemií, jejich omezením je nedostatečná reprodukovatelnost. Vysoce účinná je AFLP, která je pro svou náročnost vhodná spíše pro obecné populačně-genetické studie než pro rutinní identifikaci epidemických kmenů.⁴³ Její omezení plyne z toho, že jde o metodu komparativní, která neumožňuje výměnu primárních dat (fingerprintů) mezi laboratořemi.

Přes velký počet studií, neexistuje v typizaci nemocničních izolátů *A. baumannii* jednotný postup. Řada metod je omezena nedostatečnou účinností (obecné typizační systémy, plazmidová analýza) a u většiny molekulových metod dosud chybí vyhodnocení podle výše uvedených kritérií. Pro lokální epidemiologickou analýzu je nejvhodnější makrorestrikční analýza, zatímco pro studium širší populační struktury je nutné použití několika metod.⁴⁴ V roce 1996 Dijkshoornová a spol. uveřejnili studii epidemických a sporadických nemocničních kmenů *A. baumannii* ze severozápadní Evropy.⁴⁵

³⁵ Jawad A et al. *J Clin Microbiol* 1998a;36:1938-1941.

³⁶ Bernards AT et al. *Am J Infect Control* 1998;26:544-551.

³⁷ Struelens MJ, the ESGEM. *Clin Microbiol Infect* 1996;2:2-11.

³⁸ Bouvet PJM, Grimont, PAD. *Ann Inst Pasteur/Microbiol* 1987;138:569-578.

³⁹ Bouvet PJM, Grimont, PAD. *Ann Inst Pasteur/Microbiol* 1987;138:569-578. Seifert H et al. *Zbl Bakt* 1993;279:544-552.

⁴⁰ Dijkshoorn L et al. *J Clin Microbiol* 1993;31:702-705.

⁴¹ Seifert H, Gerner-Smidt P. *J Clin Microbiol* 1995;33:1402-1407.

⁴² Vila J et al. *J Med Microbiol* 1996;44:482-489.

⁴³ Janssen P, Dijkshoorn L. *FEMS Microbiol Lett* 1996;142:191-194.

⁴⁴ Dijkshoorn L et al. *J Clin Microbiol* 1993;31:702-705.

⁴⁵ Dijkshoorn L et al. *J Clin Microbiol* 1996;34:1519-1525.

Podle výsledů AFLP, ribotypizace, biotypizace a analýzy proteinů vnější membrány klasifikovali většinu epidemických kmenů do dvou geograficky rozšířených klonů odlišených od heterogenní populace sporadických izolátů a otevřeli tak otázku obecné populační struktury acinetobakterů.

1.4. Rezistence k antibiotikům

Acinetobaktery patří k nejrezistentnějším původcům infekcí člověka. V 70. letech byla jejich rezistence omezena na tehdy používaná antibiotika (ampicilin, chloramfenikol, tetracyklin, kanamycin a streptomycin) a sulfonamidy.⁴⁶ Se zaváděním nových léků se postupně rozšířila na mladší generace β -laktamových antibiotik (ureidopeniciliny, cefalosporiny třetí generace), aminoglykozidy (gentamicin, amikacin, tobramycin, netilimicin) a fluorochinolony.⁴⁷ *A. baumannii* je obvykle rezistentnější k většímu počtu antibiotik než ostatní druhy/DNA skupiny acinetobakterů⁴⁸ a tato multirezistence má stoupající trend. Zatímco studie z 80. let popisují kmeny obvykle citlivé k některým aminoglykozidům, širokospektrým β -laktamovým antibiotikům nebo fluorochinolonům,⁴⁹ pozdější zprávy se zmiňují o kmenech citlivých pouze ke karbapenemům, lékům volby při závažných acinetobakterových infekcích.⁵⁰ V posledních letech se popisují i epidemické kmeny *A. baumannii* rezistentní ke karbapenemům a polymyxinům,⁵¹ což vede k obavám z celkového selhání antibiotické terapie.

Multirezistence *A. baumannii* vzniká kombinací různých druhotně získaných mechanismů rezistence.⁵² Rezistenci k β -laktamům způsobují plazmidově a chromozomálně kódované β -laktamázy nebo modifikace porinů. Za rezistenci k aminoglykozidům jsou zodpovědné především modifikující enzymy ze skupin acetyltransferáz, fosfotransferáz a nukleotidyltransferáz. Tyto enzymy se mohou v jednotlivých kmenech kombinovat a poskytovat kvantitativně a kvalitativně vysokou rezistenci ke všem terapeuticky významným aminoglykozidům.⁵³ Rezistence k fluorochinolonům je obvykle způsobena mutacemi v genech *gyrA* (kóduje podjednotku gyrázy) a *parC* (kóduje podjednotku topoizomerázy IV), jejichž produkty se uplatňují při replikaci bakteriálního chromozomu. Dalším mechanismem je efluxová pumpa AdeABC, která způsobuje současné snížení citlivosti k aminoglykozidům, β -laktamům, flourochinolonům, teracyklinu a dalším antibiotikům.⁵⁴ Nespecifickou rezistenci může způsobovat také snížená propustnost buněčné stěny.⁵⁵ Šíření mechanismů rezistence u *A. baumannii* může být spojeno s klonální expanzí rezistentních kmenů nebo horizontálním přenosem genů.⁵⁶ Není však jasné, nakolik vznik a vývoj multirezistence souvisí pouze s určitými klony a nakolik jde o proces zcela nezávislý na genetickém pozadí mikroorganismů.

⁴⁶ Glew RH et al. *Medicine* 1977;56:79-97.

⁴⁷ Bergogne-Bérézin E. *J Hosp Infect* 1995;30:441-452.

⁴⁸ Seifert H et al. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:750-753.

⁴⁹ Hartstein AI et al. *Am J Med* 1988;85:624-631. Vila J et al. *J Clin Microbiol* 1989;27:1086-1089.

⁵⁰ Struelens MJ et al. *J Hosp Infect* 1993;25:15-32. Biendo M et al. *J Clin Microbiol* 1999;37:2170-2175.

⁵¹ Bou G et al. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:635-643. Manikal VM et al. *Clin Infect Dis* 2000;31:101-106. Urban C et al. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:994-995.

⁵² Amyes SGB, Young H-K. In: Bergogne-Bérézin E, Joly-Guillou ML, Towner KJ (ed.): *Acinetobacter microbiology, epidemiology, infections, management*. Boca Raton, CRC Press, 1996,185-223.

⁵³ Shaw KJ et al. *Microbiol Rev* 1993;57:138-163. Miller GH et al. *J Chemother* 1995;7(Suppl 2):17-30.

⁵⁴ Magnet S et al. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3375-3380.

⁵⁵ Miller GH et al. *J Chemother* 1995;7(Suppl 2):17-30.

⁵⁶ Lambert T et al. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1244-1248. Vila J et al. *J Clin Microbiol* 1999;37:758-761.

2. STUDIUM LÉKAŘSKY VÝZNAMNÝCH KMENŮ RODU *ACINETOBACTER* (komentář k publikovaným studiím)

2.1. Struktura nemocniční populace *Acinetobacter baumannii* (přílohy 3.2.-3.8)

Populačně-genetické studie popsaly u řady bakteriálních druhů evolučně a geneticky diskrétní skupiny kmenů, tzv. klony.⁵⁷ Klony se vyskytují v různém časovém a geografickém rozmezí a mohou se lišit mírou patogenity a epidemického šíření. Znalost obecné populační struktury acinetobakterů na poddruhové úrovni před rokem 1996 chyběla, a to včetně klinicky nejvýznamnějšího druhu *A. baumannii*. Studie zaměřené na epidemiologickou typizaci acinetobakterů publikované před tímto rokem se téměř výlučně soustředily na vyhodnocování různých metod nebo analýzu lokálních nemocničních epidemií. Tyto studie ukázaly značnou typovou rozmanitost acinetobakterů i shodu vlastností u izolátů s krátkodobou epidemiologickou vazbou. Nejednotnost použitých metodik však vylučovala srovnání výsledků získaných různými autory a obecnější závěry o populační struktuře acinetobakterů.

2.1.1. Acinetobaktery na klinice popáleninové medicíny (příloha 3.2.)

Studium populační struktury acinetobakterů jsem zahájil analýzou kmenů izolovaných na Klinice popáleninové medicíny Fakultní nemocnice na Královských Vinohradech. V letech 1991-1993 zde bylo nasbíráno 98 izolátů acinetobakterů, z nichž 95 náleželo do komplexu *ACB*. Izoláty komplexu *ACB* byly vyšetřeny restriční analýzou buněčné DNA, plazmidovou analýzou, ribotypizací, biotypizací a kvantitativním testem citlivosti na antibiotika. Byly klasifikovány do 15 skupin podobnosti (izoláty každé skupiny měly shodné profily a byly interpretovány jako příslušníci téhož kmene) a 16 kmenů s jedinečnou kombinací typizačních profilů. Celkem tak bylo rozlišeno 31 kmenů, z nichž bylo ribotypizací 18 zařazeno do *A. baumannii* a po 5 do DNA skupin 3 a 13TU. Dva multirezistentní kmeny *A. baumannii* (později zařazené do panevropského klonu I) se na klinice vyskytovaly po celé sledované období a zahrnovaly 41 % všech studovaných izolátů. Jeden z nich způsobil v červnu 1991 sepsi malého chlapce zmíněnou v předmluvě, druhý vyvolal epidemii v létě 1993.

Tato studie naznačila několik skutečností, které byly posléze potvrzeny studiem geograficky širší populace acinetobakterů: (i) kmenová diverzita *A. baumannii* a ostatních skupin komplexu *ACB* je značná, a to zvláště u kmenů s dobrou citlivostí na antibiotika; (ii) multirezistence je u *A. baumannii* spojena s malým počtem genotypů a kmeny s těmito genotypy mohou v nemocnicích dlouhodobě přetrvávat a epidemicky se šířit; (iii) velmi podobné avšak epidemiologicky nesouvisející multirezistentní kmeny se mohou vyskytovat současně na jednom oddělení a k jejich rozlišení je nutné současné použití několika typizačních metod.

2.1.2. Dvě hlavní klonální uskupení *Acinetobacter baumannii* v České republice (příloha 3.3.)

Studium nemocniční populace komplexu *ACB* bylo v dalším kroku rozšířeno na celou republiku. Z více než 400 izolátů acinetobakterů, zaslaných v letech 1991-1997 do naší laboratoře, byl vybrán soubor 103 klinicky nebo epidemiologicky významných nemocničních izolátů komplexu *ACB*. Studovány byly pomocí ribotypizace, plazmidové analýzy, biotypizace a vyšetření citlivosti na antibiotika.

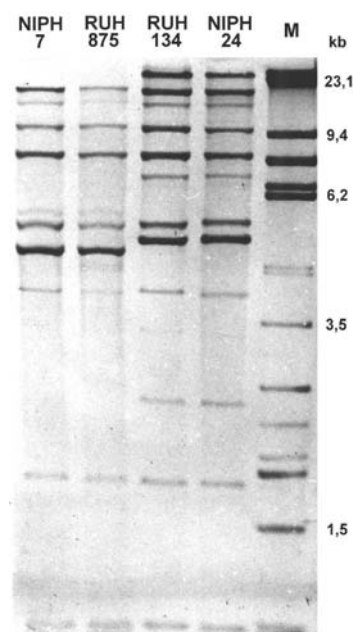
⁵⁷ Dijkshoorn L, Ursing BM, Ursing JB. Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology. *J Med Microbiol* 2000;49: 397-401. Maynard Smith J, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4384-4388.

Podle *EcoRI* ribotypů jich bylo 77 (75 %) identifikováno jako *A. baumannii*, ostatní jako další DNA skupiny komplexu *ACB*. *A. baumannii* zahrnoval všechny multirezistentní a epidemické kmeny.

Celkem bylo zjištěno 50 různých *EcoRI* ribotypů, z nichž se pouze dva vyskytovaly u většího počtu izolátů (*A. baumannii*) různého původu. Izoláty s každým z těchto ribotypů sdílely též shodný nebo podobný biotyp a plazmidový profil a tvořily tak dvě feneticky diskrétní skupiny. Tyto skupiny jsem označil jako A a B s tím, že jde pravděpodobně o dvě klonální linie *A. baumannii* rozšířené v nemocnicích České republiky. Skupina A zahrnovala 37 izolátů s ribotypem I, biotypem 11 nebo 6 a kryptickým plazmidem pAN1 o velikosti 8,7 kb; skupina B obsahovala osm izolátů s ribotypem II a biotypem 2, u nichž většinou nebyla plazmidová DNA zjištěna. Obě skupiny obsahovaly epidemické i sporadické kmeny, které byly izolovány na různých lokalitách během celého sledovaného období a které byly rezistentní k většímu počtu antibiotik než zbývající izoláty (skupiny A a B zahrnovaly 44 % všech studovaných izolátů a 85 % multirezistentních izolátů).

Během prací na tomto projektu publikovali Dijkshoornová a spol. studii, v níž porovnali genotypové a fenotypové vlastnosti epidemických a sporadických nemocničních kmenů *A. baumannii* ze severozápadní Evropy.⁵⁸ Většinu epidemických kmenů rozdělili do dvou diskrétních skupin zřetelně odlišených od heterogenní populace sporadických izolátů a tyto skupiny označili jako epidemické klony I a II. Epidemické klony zahrnovaly kmeny izolované v letech 1982-1990 ve Velké Británii, Holandsku a Belgii, které byly výrazně rezistentnější k antibiotikům než sporadické izoláty. Porovnání publikovaných ribotypů a biotypů s našimi výsledky naznačilo, že skupiny A a B odpovídají popsaným klonům. To posléze potvrdila ribotypizace (*obr. 1*) a plazmidová analýza referenčních kmenů pro klony I a II.

Tato studie potvrdila klíčovou roli *A. baumannii* v nemocniční populaci acinetobakterů. Její význam spočíval zejména v objevu dvou široce rozšířených skupin *A. baumannii* zahrnujících většinu českých multirezistentních izolátů a ve zjištění, že tyto skupiny odpovídají epidemickým klonům ze severozápadní Evropy. Šlo o první doklad panevropského rozšíření klonálně příbuzných kmenů u rodu *Acinetobacter*.⁵⁹ Kmeny popsané v této práci se staly referenčním materiálem pro další studium vlastností a struktury nemocniční populace *A. baumannii*.



Obr. 1. *EcoRI* ribotypy referenčních kmenů pro klony I (RUH 875) a II (RUH 134) a pro české skupiny A (NIPH 7) a B (NIPH 24).

2.1.3. Studium O-antigenů pomocí monoklonálních protilátek (*přílohy 3.4., 3.5.*)

Studium českých kmenů *A. baumannii* pokračovalo analýzou O-antigenů pomocí 20 monoklonálních protilátek (*MAb*), připravených Dr. Ralphem Pantophletem (Research Center Borstel). Studováno bylo 52 českých kmenů z let 1991-1999 a 13 referenčních kmenů pro klony I a II z původní práce Dijkshoornové a spol. Český soubor zahrnoval kmeny skupin A a B a další multirezistentní a citlivé kmeny, vybrané většinou z předchozí studie (*kapitola 2.1.2.*). U nových českých izolátů a referenčních kmenů ze západní Evropy byly z důvodu metodického sjednocení vyšetřeny ribotypy, biotypy a přítomnost plazmidu pAN1.

⁵⁸ Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P et al. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 1996;34:1519-1525.

⁵⁹ Citováno: Juni, E. Genus *Acinetobacter*. In: Garrity G. (ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Proteobacteria, Parts A, B & C*. Springer-Verlag New York Inc. 2004.

Výsledky potvrdily homogenitu českých skupin A a B a jejich odlišnost od ostatních českých kmenů. Všechny kmeny skupiny A reagovaly s *Mab* S48-3-13 nebo S51-3 a všechny kmeny skupiny B reagovaly s *Mab* S53-32, zatímco většina ostatních rezistentních a citlivých kmenů nereagovala se žádnou testovanou protilátkou. Vlastnosti skupiny A odpovídaly klonu I (shodný *EcoRI* ribotyp, biotyp 6 nebo 11, reaktivita s *Mab* S48-3-13, plazmid pAN1) a vlastnosti skupiny B byly zjištěny u většiny kmenů klonu II (*EcoRI* ribotyp, biotyp 2). Reaktivita s monoklonálními protilátkami se však u skupiny B a klonu II lišila. Výsledky další studie (příloha 3.5.) ukázaly, že reaktivita s protilátkami zjištěná u klonů I a II a českých klonálních skupin je častá i u kmenů z dalších evropských zemí (Bulharsko, Maďarsko, Polsko, Německo).

2.1.4. Vztah českých klonálních skupin a západoevropských klonů (přílohy 3.6., 3.7.)

Navzdory předchozím výsledkům zůstal přesný vztah západoevropských klonů a českých kmenů *A. baumannii* nevyjasněn. Klony I a II byly primárně definovány podle podobnosti profilů AFLP, české skupiny shodou v *EcoRI* ribotypech. Zatímco metoda AFLP je založena na analýze krátkých úseků DNA reprezentujících celý genom, ribotypizace vychází ze struktury genů pro ribozomální RNA a těsně přilehlých oblastí. Západoevropské klony a české skupiny tak nemusely být zcela shodné. Heterogenitu ribotypů a biotypů u klonu II ukázala už původní práce Dijkshoornové a spol. (1996). Česká skupina B byla oproti tomu v těchto vlastnostech homogenní.

S touto otázkou byly analyzovány genotypy 52 českých kmenů a 13 referenčních kmenů pro klony I a II z předchozí studie (příloha 3.4.) a 33 českých multirezistentních kmenů z let 2000 - 2001 (tabulka 1). Ke kvantitativnímu vyjádření genotypové podobnosti byla použita ribotypizace s enzymy *HincII* a *HindIII* a metoda AFLP. Numerická analýza ribotypů a profilů AFLP potvrdila příbuznost skupiny A s klonem I a skupiny B s klonem II. Výsledky nicméně ukázaly, že do obou klonů (definovaných primárně podle AFLP) náležejí i některé české kmeny s mírně odlišnými ribotypy, které původně nebyly zařazeny do skupiny A ani B. Klony I a II tak představují širší uskupení než české skupiny. Kvantitativní genotypová analýza zároveň potvrdila genetickou heterogenitu českých citlivých kmenů a jejich odlišnost od klonů I a II a ostatních multirezistentních kmenů *A. baumannii*. Podobně vysokou diverzitu fenotypových a genotypových vlastností popsali u citlivých kmenů ze severozápadní Evropy i Dijkshoornová a spol. (1996).

Prevalence panevropských klonů mezi multirezistentními nemocničními kmeny byla v letech 1991-2001 v České republice vysoká: z celkem 70 multirezistentních kmenů bylo 41 zařazeno do klonu I a 21 do klonu II, tj. 89 % multirezistentních kmenů náleželo k jednomu z těchto klonů. Jejich poměrný výskyt byl však ve skutečnosti zřejmě vyšší, neboť při výběru kmenů pro tyto studie bylo

Tabulka 1. Vlastnosti klonů I a II*

Klon	Soubor	Doba izolace	Počet kmenů	Ribotyp <i>Hin dIII-Hin cII</i>	Biotyp	Počet rezistencí na kmen**	Počet kmenů s plazmidem pAN1 (8,7 kb)	Reaktivita s monoklonální protilátkou
Klon I	Česká republika	1991-2001	41	R1-1 (38), R5-3 (1), R3-1 (2)	6 (15), 11 (24), 12 (1)	7,1 [2-10]	24 Netestováno (17)	S48-3-13 (18) S51-3-12 (6) Netestováno (17)
	Evropské referenční kmeny	1984-1990	9	R1-1 (8), R3-1 (1)	6 (3), 11 (1)	6,6 [4-9]	9	S48-3-13 (9)
Klon II	Česká republika	1991-2001	21	R2-2 (11), R6-4 (4), R4-2 (3), R2-5 (2), R2-4 (1)	2 (21)	5,8 [3-8]	1 Netestováno (11)	S53-32 (7) Netypovatelné (3) Netestováno (11)
	Evropské referenční kmeny	1982-1989	4	R2-2 (3), R4-2 (1)	1 (1), 2 (2), 9 (1)	3,8 [1-5]	1	S48-3-17 (3) Netypovatelné (1)

* V závorkách uvedeny počty kmenů náležející k příslušnému typu.

** Testováno 11 antibiotik (viz kapitola 2.1.6.). Uveden průměrný počet rezistencí na kmen, v hranatých závorkách rozpětí.

zachování typové rozmanitosti nadřazeno proporčnímu zastoupení jednotlivých typů.

2.1.5. Povaha a vlastnosti panevropských klonů (přílohy 3.3.- 3.7., 3.11.)

Klon je populací bakterií odvozených asexuální reprodukcí z jediného individua. Je kategorií relativní, neboť vztahy mezi jednotlivými předky mohou být opět klonální. Klonální vztah existuje mezi buňkami jedné kolonie, izoláty endemického kmene, kmeny pandemického klonálního uskupení ale i mezi různými prvky této řady. Pokaždé jde o vztah v jiném časovém a generačním intervalu. Čím je tento interval delší, tím větší jsou rozdíly ve vlastnostech příbuzných organismů (vzniklé mutacemi nebo horizontálním přenosem genů) a tím obtížněji se klonální vztah⁶⁰ rozeznává (zvláště tehdy, uplatňuje-li se významně horizontální přenos).⁶¹

K rozlišení lékařsky významných klonů se používají různé metody, při nichž se vychází z podobnosti vlastností u klonálně příbuzných organismů a jejich odlišností u nepříbuzných (méně příbuzných) organismů.⁶² Jde o fenetický přístup (analýza celkové podobnosti organismů), který při použití metod strukturální analýzy DNA umožňuje aproximaci klonálních vztahů i bez fylogenetické dedukce. Dnes používané genotypové metody (makrorestriční analýza chromozomální DNA nebo fingerprintingové metody založené na PCR) jsou vysoce citlivé a umožňují rozlišit mělké klonální vazby, což má význam zvláště v epidemiologii a diagnostice. V posledních letech došlo k výraznému posunu i v definování širších příbuzenských vztahů uvnitř populací jednotlivých druhů, a to díky metodě multilokusové sekvenční typizace (MLST) založené na analýze tzv. provozních genů (*housekeeping genes*).⁶³ Tento přístup umožňuje použití matematických modelů pro analýzu populační struktury bakterií a pro definování klonálních uskupení.⁶⁴

Klony I a II byly rozpoznány na základě celkové podobnosti genotypových (AFLP, ribotypy) a fenotypových vlastností (biotyp, struktura O-antigenů). I když biologické důvody obecně neumožňují přesné určení hranic klonu, je zjevné, že oba panevropské klony mají diskrétní a homogenní genetické jádro. To potvrdila i studie ve spolupráci s Geertem Huyssem z University v Gentu (příloha 3.11.), v níž byly oba klony spolehlivě identifikovány metodou fingerprintingu (rep)-PCR, která vychází z jiných částí genomu než AFLP a ribotypizace. Rozeznání a detailní analýza klonů I a II iniciovaly studium populační struktury *A. baumannii*. V letošním roce vyšla práce popisující další evropský multirezistentní klon (klon III)⁶⁵ a naše nepublikované výsledky naznačují existenci dalších klonálních uskupení. Očekávané zavedení metody MLST je předpokladem účinnější analýzy populační struktury *A. baumannii* a sledování jejích změn.

Z rozšíření klonů I a II a jejich vnitřní diverzity lze usuzovat na to, že jde o relativně staré skupiny. Typové varianty uvnitř klonů vznikají postupnou diverzifikací a mohou představovat geneticky homogenní a evolučně mladé populace (subklony). Příkladem jsou české kmeny klonu I náležející k biotypu 11. Kmeny *A. baumannii* s tímto biotypem jsou v České republice nejčastější zatímco v západní Evropě jsou vzácné (přílohy 3.1. a 3.3.). Kmeny s biotypem 11 měly většinou podobné makrorestriční profily chromozomální DNA a sdílely další vlastnosti (neschopnost růstu na L-arabinóze a přítomnost plazmidu o velikosti 6 kb), které nebyly zjištěny u ostatních kmenů klonu I.

⁶⁰ Klonální vztah zde neznamená genetickou identitu, ale nedávnou společnou evoluční historii většiny genomu.

⁶¹ Feil EJ, Spratt BG. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:561–590.

⁶² Ørskov F, Ørskov I. Summary of a workshop on the clone concept in epidemiology, taxonomy, and evolution of the *Enterobacteriaceae* and other bacteria. *J Infect Dis* 1983;148:346-357.

⁶³ Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3140-3145.

⁶⁴ Day N P, Moore CE, Enright MC et al. A link between virulence and ecological abundance in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Science* 2001;292:114–116. (Retraction, 295:971,2002)

⁶⁵ Van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden TJK et al. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res Microbiol* 2004;155:105-112.

Objev panevropských klonů může mít pro lékařskou mikrobiologii nemalý význam. Lze předpokládat, že tyto klony nesou faktory zodpovědné za jejich schopnost šířit se, kolonizovat pacienty a efektivně vyvíjet rezistenci k antibiotikům. Studium těchto faktorů u taxonomicky a evolučně definovaných skupin může objasnit příčiny, proč se *A. baumannii* během posledních desetiletí stal jedním z nejvýznamnějších nemocničních patogenů.

2.1.6. Praktická metoda epidemiologické typizace multirezistentních kmenů (příloha 3.8.)

Jedním z úkolů praktické bakteriologie je včasné rozpoznání epidemiologicky závažné situace analýzou vlastností nemocničních kmenů (typizací). Pokusil jsem se proto vypracovat metodu, která za minimálních materiálových a pracovních nároků umožní u izolátů *A. baumannii* rozeznat epidemiologickou vazbu. Východiskem byla skutečnost, že u multirezistentních kmenů existuje značná rozmanitost profilů rezistence a fakt, že průměry inhibičních zón kolem antibiotických disků v rutinním diskovém difúzním testu jsou mírou citlivosti, kterou lze numericky vyhodnotit a použít pro přesnější klasifikaci kmenů než umožňují kategorizace citlivý-rezistentní.⁶⁶

Typizační sestava 11 antibiotik byla vybrána podle distribučních charakteristik a vzájemné korelace hodnot citlivosti u epidemiologicky heterogenního souboru kmenů. Obsahovala ampicilin+sulbaktam, piperacilin, ceftazidim, imipenem, ko-trimoxazol, ofloxacin, gentamicin, tobramycin, amikacin, netilmicin a tetracyklin. Sestavy průměrů inhibičních zón pro tato antibiotika (antibiogramy) byly porovnány shlukovou analýzou s euklidovskou vzdáleností jako koeficientem podobnosti. Tato metoda účinněji rozlišovala multirezistentní kmeny než ribotypizace a biotypizace (což plyne z konzervativnosti těchto znaků u převažujících klonů), a podobně jako makrorestrikční analýza chromozomální DNA rozlišila kmeny náležející do klonu I. Její meze plynou z nestability rezistence k některým antibiotikům (např. k amikacinu), z možné shody fenotypu rezistence u genotypově odlišných kmenů a z neschopnosti rozlišit citlivé kmeny. Výsledky nicméně ukázaly, že tuto jednoduchou a rutinně prováděnou metodu lze v praxi využít pro orientační typizaci multirezistentních kmenů *A. baumannii*, zvláště pak pro včasné rozpoznání jejich epidemického šíření.

2.2. Povaha multirezistence *Acinetobacter baumannii* (přílohy 3.9.-3.12.)

Zjištění, že multirezistentní kmeny *A. baumannii* jsou genotypově výrazně homogennější než citlivé kmeny (příloha 3.3), vedlo k otázce, zda je tento jev důsledek rozšíření několika multirezistentních kmenů nebo nezávislého vzniku a vývoje rezistence u klonálně příbuzných citlivých kmenů. Skutečnost, že všechny do té doby izolované kmeny klonů I a II byly multirezistentní, svědčila pro první alternativu, zatímco rozmanitost fenotypů rezistence uvnitř klonů ukazovala na možnost druhou. Dostupnost definovaného souboru kmenů z České republiky a dalších evropských zemí umožnila studovat tuto otázku na vztahu mezi multirezistencí a příslušností kmenů do hlavních klonálních uskupení.

2.2.1. Vztah mezi klonalitou a rezistencí k aminoglykozidům (přílohy 3.9., 3.10)

Jako modelovou skupinu antibiotik pro studium tohoto vztahu jsem vybral aminoglykozidy. Důvody byly tyto: (i) multirezistentní kmeny *A. baumannii* jsou obvykle rezistentní alespoň k jednomu klinicky významnému aminoglykozidu; (ii) mechanismy rezistence k aminoglykozidům jsou u acinetobakterů dobře prostudovány: zahrnují především enzymatickou modifikaci antibiotik acetyltransferázami (AAC), nukleotidyltransferázami (ANT) nebo fosfotransferázami (APH); (iii) tyto enzymy

⁶⁶ Giacca M, Menzo S, Trojan S, Monti-Bragadin C. Cluster analysis of antibiotic susceptibility patterns of clinical isolates as a tool in nosocomial infection surveillance. Eur J Epidemiol 1987;3:155-163.

mají strukturálně a funkčně odlišné formy, které se mohou vyskytovat u jednotlivých kmenů v různých kombinacích; (iv) sekvence mnoha genů pro tyto enzymy jsou známy a lze je proto prokázat pomocí PCR; (v) geny pro modifikující enzymy mohou být součástí integrónů třídy I, genetických struktur obsahujících různé geny rezistence ve formě tzv. genových kazet a charakterizovaných konzervativními strukturálními prvky, které umožňují určení typu a polohy integrované kazety. Cílem studie bylo určit vztah mezi přítomností a genetickou lokalizací genů pro rezistenci k aminoglykozidům a příslušností kmenů do hlavních klonálních uskupení.

Studovaný soubor zahrnoval 106 multirezistentních kmenů a 15 kontrolních kmenů přirozeně (*wild-type*) citlivých k aminoglykozidům. Šlo o 85 českých kmenů a 13 referenčních kmenů pro klony I a II z předchozí studie (*příloha 3.7.*) doplněných o 23 multirezistentních kmenů klonů I, II a III izolovaných v letech 1993-1998 v dalších evropských zemích. Pomocí PCR byla vyšetřena přítomnost genů pro sedm modifikujících enzymů vybraných podle literárních údajů a výsledků pilotní studie provedené ve spolupráci s Dr. Georgem Millerem (Schering-Plough Institute): fosfotransferázy APH(3')-Ia (gen *aphA1*) a APH(3')-VIa (*aphA6*), acetyltransferázy AAC(3)-Ia (*aacC1*), AAC(3)-IIa (*aacC2*) a AAC(6')-Ib (*aacA4*), nukleotidyltransferázy ANT(2'')-Ia (*aadB*) a ANT(3'')-Ia (*aadA1*).⁶⁷ Umístění a poloha genů ve variabilních oblastech integrónů byla studována metodou PCR mapování, při níž se používají primery specifické pro konzervativní části integrónu a genů pro rezistenci.⁶⁸

Výsledky potvrdily zásadní význam modifikujících enzymů pro klinicky významnou rezistenci k aminoglykozidům. Celkem 96 % multirezistentních kmenů bylo rezistentních k nejméně jednomu aminoglykozidu (kanamycin, 92 %; gentamicin, 88 %; amikacin, 47 %; tobramycin, 37 %; netilmicin, 26 %) a nejméně jeden gen rezistence byl zjištěn u 95 % kmenů (*aphA1*, 72 %; *aacC1*, 64 %; *aadA1*, 64 %; *aphA6*, 52 %; *aadB*, 29 %; *aacC2*, 7 %; *aacA4*, 3 %). U 84 % multirezistentních kmenů byly zjištěny kombinace dvou až pěti různých genů, a to ve 12 různých sestavách. Přítomnost genů pro modifikující enzymy a fenotyp rezistence byly v souladu v převážné většině případů s výjimkou netilmicinu. I když vysoká rezistence k netilmicinu byla obvykle spojena s přítomností genů pro jeho inaktivaci, hodnoty MIK (minimální inhibiční koncentrace) se u většiny kmenů (71 %) bez těchto genů pohybovaly kolem hraniční koncentrace pro citlivost (8 mg/l), tj. byly zhruba desetkrát vyšší než MIK kontrolních citlivých kmenů.

Integróny třídy I byly zjištěny u 74 % multirezistentních kmenů, a to celkem v šesti typech variabilních oblastí o velikostech 0,7 kb až 3,0 kb. Jednoznačně převažovaly oblasti o 2,5 kb a 3,0 kb, které se obě vyskytovaly u klonů I a II, nikoliv však u ostatních kmenů. Sekvenční analýza provedená Dr. Lucillou Dolzani z Univerzity v Terstu, ukázala, že oblast 2,5 kb obsahuje genové kazety v pořadí *aacC1*, *orfX*, *orfX'*, *aadA1*, zatímco oblast 3,0 kb kazety *aacC1*, *orfX*, *orfX*, *orfX'*, *aadA1*.⁶⁹ Obě nejrozšířenější integrónové oblasti se tak lišily pouze dodatečnou kazetou *orfX* u variabilní oblasti 3,0 kb a mají tak pravděpodobně společný původ (lze předpokládat vzájemnou konverzi delecí nebo duplikací *orfX*).

Vnitroklonální diverzita genů rezistence, jejich kombinací a typů integrónů byla u klonů I a II značná. U klonu I bylo zjištěno devět genových kombinací a čtyři typy integrónů, zatímco u klonu II se vyskytlo sedm kombinací genů a tři typy integrónů. Tato diverzita odpovídá již zmíněné heterogenitě v dalších vlastnostech a dále potvrzuje, že klony I a II jsou relativně stará uskupení (klon III byl oproti tomu zcela homogenní, což naznačuje jeho poměrně nedávné rozšíření). Klony I a II přitom sdílely většinu genů rezistence, jejich kombinace i oba geograficky rozšířené typy integrónů. Situaci, kdy evolučně odlišné skupiny jsou v genotypu rezistence vnitřně heterogenní a zároveň sdílejí

⁶⁷ Fenotypy rezistence pro jednotlivé enzymy jsou následující: APH(3')-Ia (kanamycin), APH(3')-VIa (kanamycin, amikacin), AAC(3)-Ia (gentamicin), AAC(3)-IIa (gentamicin, tobramycin, netilmicin), AAC(6')-Ib (kanamycin, tobramycin, netilmicin, amikacin), ANT(2'')-Ia (kanamycin, gentamicin, tobramycin), ANT(3'')-Ia (streptomycin).

⁶⁸ Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:185-191.

⁶⁹ Kazety *orfX* a *orfX'* kódují proteiny neznámé funkce.

shodné genotypové prvky rezistence, lze interpretovat jako důsledek horizontálního šíření genů případně kombinovaného s jejich nestabilitou. Tomu odpovídá i zjištění, že české multirezistentní kmeny byly jako celek (tj. bez ohledu na klonální příslušnost) v genotypu rezistence homogennější (nesly pouze integrony typu 2,5 kb a 3,0 kb a neobsahovaly geny *aacC2* a *aacA4* pro inaktivaci netilmicinu) než geograficky heterogenní populace jednotlivých klonů. Tyto rozdíly mezi geograficky oddělenými populacemi klonálně příbuzných kmenů mohou plynout z lokálních odlišností ve složení dostupných genů (*genetic pool*) nebo v aplikaci jednotlivých antibiotik.

2.2.2. Klony a determinanty rezistence k tetracyklinům (příloha 3.11.)

Tématem další studie provedené ve spolupráci s Dr. Geertem Huyssem (Univerzita v Gentu) byl vztah mezi determinantami tetracyklinové rezistence a klonální příslušností kmenů *A. baumannii*. Studováno bylo 49 multirezistentních kmenů z různých evropských nemocnic náležejících většinou do klonu I ($n=18$), klonu II ($n=19$) nebo klonu III ($n=4$). U kmenů klonů I a III se vyskytoval téměř výlučně pouze gen *tet(A)* kódující eflux tetracyklinu, zatímco gen *tet(B)* (eflux tetracyklinu i minocyklinu) byl zjištěn u převážné většiny kmenů klonu II. Tato zjištění odpovídala fenotypové citlivosti studovaných kmenů k tetracyklinu a minocyklinu i nepublikovaným údajům pro citlivost českých multirezistentních kmenů k doxycyklinu (kmeny klonu I měly sníženou citlivost k doxycyklinu, kmeny klonu II byly obvykle plně rezistentní). Tyto výsledky naznačují - na rozdíl od aminoglykozidové rezistence - klonální vazbu genetických determinant rezistence k tetracyklinům i možnou terapeutickou účinnost tetracyklinů druhé generace na infekce vyvolané především multirezistentními kmeny nenáležejícími do klonu II.

2.2.3. Efluxová pumpa AdeABC (přílohy 3.10., 3.11.)

Miller a spol. uvádějí ve své práci z roku 1995 jako jeden z nejrozšířenějších mechanismů aminoglykozidové rezistence u acinetobakterů tzv. AAC(3)-?, charakterizovaný intermediární citlivostí (nízkou rezistencí) k netilmicinu, gentamicinu a klinicky nepoužívaným derivátům netilmicinu.⁷⁰ I když se původně předpokládalo, že jde o acetyltransferázu, nikdy se nepodařilo tento hypotetický enzym izolovat. V roce 2001 Magnetová a spol. publikovali práci, v níž popsali u kmene *A. baumannii* efluxovou pumpu AdeABC snižující citlivost k řadě antibiotik včetně aminoglykozidů.⁷¹ Tato pumpa byla zvláště účinná pro hydrofóbní aminoglykozidy (netilmicin a gentamicin). Může tudíž zodpovídat za typ rezistence AAC(3)-? a být příčinou snížené citlivosti k netilmicinu zjištěné u převážné většiny multirezistentních kmenů *A. baumannii*, u nichž nebyly prokázány jiné mechanismy rezistence k tomuto antibiotiku (přílohy 3.9., 3.10.).

Otázku distribuce genu pro AdeB (vlastní proteinová pumpa) a jeho vazbu s fenotypem citlivosti jsme zkoumali u 70 multirezistentních a 15 přirozeně citlivých českých kmenů *A. baumannii*. Gen *adeB* byl zjištěn u všech multirezistentních kmenů, což bylo v souladu s faktem, že tyto kmeny měly obvykle sníženou citlivost k netilmicinu a že jejich MIK pro ostatní aminoglykozidy (po vyloučení rezistence způsobené enzymatickou modifikací) odpovídaly údajům ze studie Magnetové a spol. Gen *adeA* se však vyskytoval i u osmi z 15 kmenů s MIK přirozeně citlivé populace, u nichž neměl vliv na kvantitativní hodnoty citlivosti. Vysvětlení tohoto jevu nabízí právě uveřejněná práce, jejíž autoři studovali přirozeně citlivý kmen *A. baumannii* obsahující geny pro pumpu AdeABC.⁷² Molekulární analýza spontánních mutant rezistentních ke gentamicinu odvozených z tohoto kmene ukázala, že původní

⁷⁰ Miller GH, Sabatelli FJ, Naples L, Hare RS, Shaw KJ. The most frequently occurring aminoglycoside mechanisms - combined results of surveys in eight regions of the world. *J Chemother* 1995;7(Suppl 2):17-30.

⁷¹ Magnet S, Courvalin P, Lambert, T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3375-3380.

⁷² Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert, T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3298-3304.

citlivý fenotyp byl důsledkem striktní regulace dvousložkovým systémem AdeRS. Spontánní mutace v regulačních genech vedly ke konstitutivní (nadměrné) expresi pumpy a rezistenci resp. snížené citlivosti.

Naše výsledky ohledně netilmicinu naznačují, že konstitutivně exprimovaná pumpa se pravidelně vyskytuje u multirezistentních kmenů, které disponují dalšími mechanismy rezistence, vyskytujícími se u různých kmenů v různých kombinacích. Aktivace efluxového systému tak může být prvním krokem umožňujícím přežívání původně dobře citlivých kmenů v prostředí s antibiotiky, na něž navazuje akvizice specifických a vysoce účinných mechanismů rezistence. Protože multirezistence je pravděpodobně epidemiologicky nejvýznamnější vlastnost acinetobakterů, může být pumpa AdeABC jedním z hlavních důvodů, proč se právě *A. baumannii* (a jeho určité klonální linie) stal mezi ostatními acinetobaktery daleko nejvýznamnějším nemocničním patogenem.

2.2.4. Antibiotický účinek peptidu odvozeného z humánního laktoferinu (příloha 3.12.)

Pokračující nárůst multirezistence *A. baumannii* a obavy ze selhání antibiotické léčby vedou kromě studia vzniku a vývoje rezistence ke hledání nových preparátů s antibakteriálním účinkem. Jednou z takových látek je syntetický peptid (hLF(1-11)) odpovídající prvním 11 aminokyselinám N-konce lidského laktoferinu (hLF), který je vysoce účinný při léčbě experimentálních infekcí způsobených multirezistentními stafylokoky.⁷³ Ve studii provedené na Department of Infectious Diseases v Leidenu jsme studovali účinek hLF1-11 na pět multirezistentních kmenů *A. baumannii* vybraných z předchozích studií. Peptid hLF1-11 byl vysoce účinný na všechny kmeny *in vitro* (redukce CFU o tři až čtyři řády) a na čtyři z těchto kmenů v experimentální infekci u myši (redukce CFU o dva až tři řády) a je tak nadějným kandidátem pro léčbu infekcí vyvolaných kmeny rezistentními ke konvenčním antibiotikům.

2.3. Druhovú diverzita rodu *Acinetobacter* (přílohy 3.3., 3.13. - 3.17)

Nejistota ohledně biologických kontur a praktické definice *klonu* není o nic menší u bakteriálního *druhu*. Ač je *druh* v bakteriologii základní taxonomická jednotka, jeho pojetí (*species concept*) i způsob rozlišení (*species definition*) jsou předmětem neustávající diskuse. Hlavní příčinou je povaha bakterií jako nepohlavně se množících haploidních organismů a tudíž nepoužitelnost biologického kritéria reprodukčního křížení (*reproductive interbreeding*) platného pro vyšší eukaryontní organismy.⁷⁴ Pochybnosti týkající se ontologického statusu druhu u bakterií jsou proto oprávněné.⁷⁵ Dnešní pojetí bakteriálního druhu zahrnuje fenetický i fylogenetický prvek (*phylo-phenetic species concept*).⁷⁶ Druh je chápán jako monofyletický a genomově koherentní shluk individuí sdílejících vysoký stupeň podobnosti v mnoha nezávislých vlastnostech, který lze rozeznat podle fenotypových znaků. Toto pojetí slučuje tři přístupy: (i) určení genomových hranic taxonu metodou DNA-DNA reasociace (hybridizace),⁷⁷ (ii) studium fenotypových vlastností s cílem definovat vnitrodruhovou diverzitu a určit druhově specifické a diagnosticky významné vlastnosti, (iii) průkaz monofyletické povahy taxonu a jeho zařazení do evoluční genealogie (zvláště pomocí srovnávací sekvenční analýzy 16S ribozomální RNA).

⁷³ Nibbering PH, Ravensbergen E, Welling MM et al. Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria. *Infect Immun* 2001;69:1469-1476.

⁷⁴ Mayr E. The ontological status of species: scientific progress and philosophical terminology. *Biol Phil* 1987;2:145-166.

⁷⁵ Cowan ST. Sense and nonsense in bacterial taxonomy. *J Gen Microbiol* 1971;67:1-8.

⁷⁶ Rosselló-Mora R, Amann R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 2001;25:39-67.

⁷⁷ Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR et al. Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches to Bacterial Systematics. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:463-464.

S tímto pojetím druhu souvisí i polyfázový přístup ve studiu druhové diverzity bakterií založený na analýze širokého spektra vlastností.⁷⁸

V roce 1986 publikovali Bouvet a Grimont klasifikační studii, která měla pro taxonomii acinetobakterů zásadní význam.⁷⁹ Pomocí DNA-DNA reasociace a rozsáhlé fenotypové analýzy v ní rozdělili rod do 12 DNA skupin. Jejich systém byl nezávisle potvrzen Tjernbergovou a Ursingem⁸⁰ a byl následován dalšími klasifikačními studii. V roce 1992, když jsem se začal zabývat druhovou identifikací acinetobakterů, obsahoval rod sedm pojmenovaných druhů (*nomenspecies*) a 12 nepojmenovaných DNA skupin (*genomic species*) (viz příloha 3.1.: str. 24). Bylo nicméně jasné, že taxonomie acinetobakterů je teprve na počátku a nabízí ke zkoumání řadu otázek. Ty zahrnovaly nedostatečnou znalost vnitřní diverzity některých DNA skupin (danou malým počtem dostupných izolátů), problémy s odlišením některých druhů/DNA skupin vyplývající z jejich genetické příbuznosti (např. komplex *ACB* nebo proteolytické druhy), obtíže druhové identifikace, existenci kmenů s neznámou druhovou identitou a nejednotnou nomenklaturu.

2.3.1. Metoda konsenzuální identifikace (příloha 3.13.)

Praktický význam *druhu* je v tom, že jeho průkaz umožňuje predikci druhově charakteristických vlastností, často lékařsky významných (patogenita, primární rezistence na antibiotika). Předpokladem je spolehlivá identifikační metoda, jejíž nedostupnost dosud komplikuje taxonomii acinetobakterů a snižuje hodnotu popsaných druhů v očích praktických mikrobiologů. Ani poměrně komplikované citlivé metody jako je biochemické schéma podle Bouveta a Grimonta nebo restriční analýza 16S rDNA (ARDRA) neumožňují identifikaci všech popsaných druhů/DNA skupin.

Při hledání postupu, který by zajistil spolehlivou identifikaci a přitom nevyžadoval nákladné přístrojové vybavení, jsem vyšel z předpokladu, že nedostatky těchto dvou metod lze potlačit jejich kombinací. Tento přístup, nazvaný konsenzuální identifikace (*consensus identification*), má dvě části. První je numerická pravděpodobnostní identifikace, při níž se výsledky biochemických testů pro daný kmen nezávisle porovnávají se dvěma publikovanými identifikačními (frekvenčními) maticemi odvozenými z vlastností různých souborů referenčních kmenů.⁸¹ Druhou je ARDRA, při níž se restriční profily amplifikované 16S rDNA získané pro daný kmen srovnávají s knihovnou známých profilů pro jednotlivé druhy/DNA skupiny. Každý kmen je tak charakterizován třemi výsledky identifikace, dvěma podle biochemických znaků a jedním podle ARDRA. Kmen je identifikován, pokud se výsledek ARDRA shoduje (resp. není v rozporu) alespoň s jedním výsledkem biochemické identifikace.

2.3.2. Druhová diverzita klinických izolátů z České republiky (příloha 3.13.)

Druhová diverzita byla studována u 700 izolátů z let 1991-1999, které pocházely od hospitalizovaných i ambulantních pacientů a byly vysoce heterogenní s ohledem na geografický původ a typ vyšetřovaného materiálu. Všechny izoláty byly nejdříve vyšetřeny biochemickými testy, jejichž výsledky byly interpretovány pomocí pravděpodobnostní numerické identifikace s využitím zmíněných dvou matic. Kmeny, které nebyly oběma maticemi shodně zařazeny do komplexu *ACB*, byly studovány metodou ARDRA a identifikovány postupem konsenzuální identifikace. Výsledky byly následující:

⁷⁸ Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 1996;60:407-438.

⁷⁹ Bouvet PJM, Grimont PAD. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Bacteriol* 1986;36:228-240.

⁸⁰ Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* 1989;97:595-605.

⁸¹ Gener-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 277-282. Grimont PAD, Bouvet PJM. Taxonomy of *Acinetobacter*, p. 25-36. In Towner KJ, Bergogne-Bérézin E, Fewson CA (ed.), *The biology of Acinetobacter*, 1991, Plenum Press, New York.

komplex *ACB* ($n=553$, 79 %), *A. lwoffii* ($n=63$, 9 %), DS 13BJ/14TU ($n=9$), *A. johnsonii* ($n=7$), *A. haemolyticus* ($n=6$), *A. junii* ($n=5$), *A. radioresistens* ($n=4$), DS 10 ($n=3$), DS 11 ($n=2$), DS 6 ($n=1$), DS 15TU ($n=1$) a DS 16 ($n=1$). Druhová skladba studovaná u 103 nemocničních kmenů komplexu *ACB* pomocí *EcoRI* ribotypizace (příloha 3.3.) pak potvrdila dominantní postavení *A. baumannii*, který zahrnoval tři čtvrtiny izolátů komplexu *ACB* a všechny epidemické a multirezistentní kmeny.

U 45 (31 %) ze 147 izolátů, které nenáležely do komplexu *ACB*, nebyla možná identifikace žádnou metodou nebo byly výsledky biochemické a genotypové (ARDRA) identifikace v rozporu. Kombinace obou metod nicméně umožnila klasifikaci 32 (71 %) nezařazených izolátů do dvou feneticky diskrétních skupin, tzv. fenonů 1 a 2.⁸² Zatímco fenon 1 ($n=17$) byl téměř homogenní biochemicky a vyznačoval se jistou heterogenitou v profilech ARDRA, u fenonu 2 ($n=15$) tomu bylo obráceně. Použití jediné z uvedených metod by tudíž rozpoznání obou fenonů neumožnilo. Další dva kmeny tvořící na agarových půdách neobvykle drobné kolonie byly zařazeny do tzv. fenonu 4. Pomocí AFLP byla později vyjasněna druhová příslušnost dalších neidentifikovaných kmenů: dva byly identifikovány jako *A. haemolyticus*, dva jako *A. johnsonii* a jeden jako *A. junii*. V těchto případech šlo o důsledek vnitrodruhové diverzity nezachycené v identifikačních schématech.

2.3.3. Studium druhově nezařazených kmenů

V roce 1999 jsme (s Dr. Dijkshoornovou) zahájili projekt zaměřený na celkovou taxonomickou revizi rodu, jehož součástí byla i klasifikace kmenů s nejasnou taxonomickou pozicí. V té době bylo v našich sbírkách přes 100 druhově nezařazených kmenů: 27 kmenů z předchozích klasifikačních studií založených na DNA-DNA reasociaci (Bouvet a Grimont, 1986; Tjernbergová a Ursing, 1989; Bouvet a Jeanjean, 1989), 45 kmenů ze studie českých klinických izolátů a více než 30 kmenů neidentifikovatelných některou z citlivých identifikačních metod. Prvním krokem byla charakterizace biochemických vlastností, která v kombinaci s metodou ARDRA umožnila presumptivní identifikaci aberantních kmenů a klasifikaci neidentifikovatelných kmenů do tzv. fenonů. Následující analýza pomocí AFLP buď umožnila zařadit aberantní kmeny do známých druhů/DNA skupin nebo potvrdila statut fenonu, tj. genomově diskrétní skupiny představující s velkou pravděpodobností nový druh. Fenony, obsahující nejméně pět kmenů různého původu byly poté studovány rozšířenou sestavou asimilačních testů, srovnávací analýzou 16S rDNA (prof. Mario Vaneechoutte a Dr. Thierry de Baere z Univerzity v Gentu) a DNA-DNA reasociací (Dr. Ingela Tjernberg z Univerzity v Malmö a Dr. Danielle Janssens z Univerzity v Gentu).

2.3.4. *Acinetobacter ursingii*, *A. schindleri*, *A. parvus* (přílohy 3.14.-3.16.)

Studium nezařazených kmenů pomocí kombinace biochemické analýzy a ARDRA umožnilo rozšířit české fenony 1 a 2 o izoláty z dalších evropských zemí. Analýza fenotypu, ARDRA, AFLP, DNA-DNA reasociace a sekvenční analýza genů pro 16S rRNA prokázaly, že fenony 1 ($n=29$) a 2 ($n=22$) představují dva nové druhy nazvané *Acinetobacter ursingii* a *Acinetobacter schindleri*. Všechny kmeny, podle nichž byly oba druhy popsány, pocházely z člověka. Zatímco *A. schindleri* byl většinou izolován ze sliznic, kůže a moče ambulantních pacientů, *A. ursingii* zahrnoval převážně klinicky významné nemocniční izoláty. Celkem 13 kmenů *A. ursingii* bylo izolováno z krve pacientů hospitalizovaných v kritickém stavu na odděleních intenzivní péče a nejméně u tří pacientů byla

⁸² Termín *fenon* označuje skupiny vzájemně si podobných izolátů (podle fenotypových znaků a ARDRA), zřetelně odlišených od známých druhů/DNA skupin a dalších nezařazených kmenů.

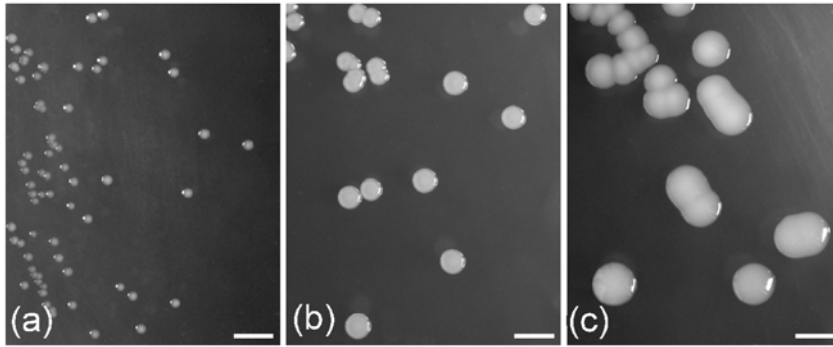


Fig. 2. Kolonie (a) *Acinetobacter parvus*, (b) *Acinetobacter ursingii* a (c) *Acinetobacter schindleri*. Kmeny byly kultivovány 24 h při 30 °C na tryptózo-sojovém agaru; úsečka, 2 mm.

prokázána sepse. Retrospektivní analýza rozsáhlého souboru kmenů izolovaných v České republice za posledních 10 let navíc ukázala, že *A. ursingii* byl po *A. baumannii* nejčastěji izolovaným druhem acinetobaktera z hemokultury.

Obdobný postup jako u fenonů 1 a 2 byl použit při taxonomické analýze sedmi kmenů fenonu 4 vyznačujících se neobvykle malými koloniemi na agarových půdách (obr. 2) a nízkou biochemickou aktivitou. Polyfázová analýza potvrdila, že i v tomto případě jde o geneticky diskrétní skupinu představující nový druh nazvaný *Acinetobacter parvus*. Časem byly izolovány další kmeny, které potvrdily relativně častý výskyt *A. ursingii* v krvi hospitalizovaných pacientů. Bakteriemií vyvolanou tímto druhem popsali v minulém roce i jiní autoři.⁸³ Vyšetření citlivosti dále ukázalo, že *A. ursingii* má ve srovnání s *A. schindleri* a *A. lwoffii* sníženou citlivost k antibiotikům, především β -laktamům, a že některé kmeny *A. ursingii* obsahují druhotně získanou rezistenci k aminoglykozidům.

2.3.5. Taxonomie hemolytických kmenů (příloha 3.17.)

Cílem zatím poslední etapy bylo určit taxonomickou pozici nezařazených hemolytických kmenů. Schopnost rozkládat beraní erythrocyty je u acinetobakterů relevantní taxonomický znak. Zatímco *A. haemolyticus*, '*A. venetianus*' a DNA skupiny 6, 13BJ (= 14TU), 14BJ, 15BJ, 16 a 17 zahrnují výlučně hemolytické kmeny, kmeny ostatních druhů/DNA skupin jsou nehemolytické. Pouze u *A. junii* jde o znak variabilní. Schopnost hemolýzy je obvykle spojena s proteolytickou aktivitou. Studie Bouveta a Jeanjeanové z roku 1989 navíc ukázala, že hodnoty DNA-DNA reasociace mezi proteolyticko-hemolytickými DNA skupinami 13BJ-17 jsou výrazně vyšší než hodnoty mezi těmito skupinami a ostatními druhy/DNA skupinami a jejich fylogenetickou příbuznost prokázaly i výsledky srovnávací sekvenční analýzy genů *gyrB* a *recA*.⁸⁴ Výrazem této příbuznosti jsou malé fenotypové rozdíly mezi některými proteolytickými skupinami.

Studie zahrnovala 36 druhově nezařazených hemolytických kmenů, izolovaných většinou z klinického materiálu. Kmeny byly klasifikovány pomocí AFLP a ARDRA a podle biochemických vlastností do šesti fenonů (obsahujících po dvou a více kmenech) a tří nezařazených kmenů. Podrobná analýza dvou nejpočetnějších skupin, fenonů 3 ($n=8$) a 7 ($n=14$), umožnila nalézt biochemické znaky, kterými se tyto fenony odlišují od dosud popsaných druhů. Některé jejich kmeny byly studovány již v předchozích taxonomických studiích pomocí DNA-DNA reasociace, jejichž výsledky potvrzují genomovou diskrétnost obou fenonů. Jde tak s největší pravděpodobností o dva nové druhy, na jejichž nomenklaturních návrzích se v současnosti pracuje.

⁸³ Loubinoux J, Mihaila-Amrouche L, Le Fleche A et al. Bacteremia caused by *Acinetobacter ursingii*. *J Clin Microbiol* 2003;41:1337-1338.

⁸⁴ Yamamoto S, Harayama S. Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46: 506-511. Krawczyk B, Lewandowski K, Kur J. Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the *recA* sequences *Molecular and Cellular Probes* 2002;16,1-11.

2.3.6. Současný stav druhové klasifikace

Tabulka 2 uvádí stav klasifikace rodu *Acinetobacter* k současnému datu. Rozlišeno je zatím 32 DNA skupin (*genomic species*), z nichž 17 má platné druhové jméno. Dalších šest fenonů s velkou pravděpodobností představuje nové druhy a spolu s dosud neklasifikovanými kmeny ukazuje značnou genetickou a druhovou diverzitu acinetobakterů. Z tabulky je nicméně zřejmé, že otázky vyslovené na počátku stále čekají na odpověď. Některé z nich jsou dokonce komplikovanější a to zásluhou studie Carrové a spol. z roku 2003, v níž bylo popsáno sedm nových druhů podle pouhých 11 izolátů z aktivovaného kalu.⁸⁵ Autoři opustili pravidlo uplatňované v předchozích klasifikačních studiích, tj. že pojmenovány jsou pouze fenotypově identifikovatelné DNA skupiny obsahující nejméně 5 kmenů. Malý počet kmenů neumožňuje dostatečně prozkoumat vnitřní diverzitu popisovaného druhu a vylučuje spolehlivou fenotypovou identifikaci. Ač zjevně nesmyslný, je popis druhu (obecné entity) podle vlastností jediného izolátu (individu) v bakteriologii obvyklý: 40 % nových druhů z let 1990-2000 bylo navrženo na základě jediného kmene a tento trend pokračuje navzdory přesvědčivé kritice Chris-

Tabulka 2. Druhová klasifikace rodu *Acinetobacter*

Druh s platným jménem	Reference	Počet kmenů	Původ kmenů
<i>A. calcoaceticus</i> (= DNA skupina 1)	Bouvet & Grimont (1986)/Tjernberg & Ursing (1989)	3/5	člověk, půda
<i>A. baumannii</i> (= DNA skupina 2)	Bouvet & Grimont (1986)/Tjernberg & Ursing (1989)	21/10	člověk
<i>A. haemolyticus</i> (= DNA skupina 4)	Bouvet & Grimont (1986)/Tjernberg & Ursing (1989)	10/11	člověk
<i>A. junii</i> (= DNA skupina 5)	Bouvet & Grimont (1986)/Tjernberg & Ursing (1989)	4/19	člověk, prostředí
<i>A. johsonii</i> (= DNA skupina 7)	Bouvet & Grimont (1986)/Tjernberg & Ursing (1989)	12/12	člověk, prostředí
<i>A. lwoffii</i> (= DNA skupiny 8 a 9)	Bouvet & Grimont (1986)/Tjernberg & Ursing (1989)	9/44	člověk
<i>A. radioresistens</i> (= DNA skupina 12)	Nishimura <i>et al.</i> (1987)/Bouvet & Grimont (1986)/	3/2/32	bavlna, člověk
<i>A. ursingii</i> (= Fenon 1)	Nemec <i>et al.</i> (2001)	29	člověk
<i>A. schindleri</i> (= Fenon 2)	Nemec <i>et al.</i> (2001)	22	člověk
<i>A. parvus</i> (= Fenon 4)	Nemec <i>et al.</i> (2003)	7	člověk, pes
<i>A. baylyi</i>	Carr <i>et al.</i> (2003)	3	aktivovaný kal
<i>A. tjernbergiae</i>	Carr <i>et al.</i> (2003)	2	aktivovaný kal
<i>A. towneri</i>	Carr <i>et al.</i> (2003)	2	aktivovaný kal
<i>A. bouvetii</i>	Carr <i>et al.</i> (2003)	1	aktivovaný kal
<i>A. grimontii</i>	Carr <i>et al.</i> (2003)	1	aktivovaný kal
<i>A. gernerii</i>	Carr <i>et al.</i> (2003)	1	aktivovaný kal
<i>A. tandoii</i>	Carr <i>et al.</i> (2003)	1	aktivovaný kal

DNA skupina	Reference	Počet kmenů	Původ kmenů
<i>A. venetianus</i> '	DiCello <i>et al.</i> (1997)/Vanechoutte <i>et al.</i> (1999)	2/2	mořská voda
3	Bouvet & Grimont (1986)/Tjernberg & Ursing (1989)	4/30	člověk
6	Bouvet & Grimont (1986)/Tjernberg & Ursing (1989)	2/1	člověk
10	Bouvet & Grimont (1986)/Tjernberg & Ursing (1989)	4/3	člověk
11	Bouvet & Grimont (1986)/Tjernberg & Ursing (1989)	3/5	člověk, skot
13 BJ/14 TU	Bouvet & Jeanjean (1989)/Tjernberg & Ursing (1989)	9/4	člověk
14 BJ	Bouvet & Jeanjean (1989)	3	člověk
15 BJ	Bouvet & Jeanjean (1989)	2	člověk
16	Bouvet & Jeanjean (1989)	4	člověk
17	Bouvet & Jeanjean (1989)	2	člověk
13 TU	Tjernberg & Ursing (1989)	4	člověk
15 TU	Tjernberg & Ursing (1989)	2	člověk
"Close to 13TU"	Gerner-Smidt & Tjernberg (1993)	2	člověk
"Between 1 and 3"	Gerner-Smidt & Tjernberg (1993)	2	člověk

Fenon	Reference	Počet kmenů	Původ kmenů
Fenon 3	Nemec <i>et al.</i> (2004)	8	člověk
Fenon 7	Nemec <i>et al.</i> (2004)	14	člověk, kůň, prostředí
Fenon 8	Nemec <i>et al.</i> (nepublikováno)	2	člověk
Fenon 9	Nemec <i>et al.</i> (nepublikováno)	2	člověk
Fenon 10	Nemec <i>et al.</i> (nepublikováno)	4	člověk, prostředí
Fenon 11	Nemec <i>et al.</i> (nepublikováno)	3	člověk

⁸⁵ Carr EL, Kämpfer P, Patel BKC, Gürtler V, Seviour RJ. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:953-963.

tensena a spol. z roku 2001.⁸⁶ V kombinaci s technokratickou aplikací srovnávací sekvenční analýzy 16S rDNA⁸⁷ pak tento přístup vede ke kumulaci pojmenovaných izolátů o pochybném taxonomickém významu.

Taxonomické studie od roku 1986 nicméně umožnily značný pokrok v druhové klasifikaci lékařsky významných acinetobakterů a staly se východiskem pro další podrobné studium vlastností a ekologie těchto organismů na pozadí jejich známé genetické a evoluční příbuznosti. *Tabulka 3* ukazuje identifikaci a klasifikaci nezařazených kmenů z předchozích taxonomických studií zaměřených téměř výlučně na izoláty z člověka. Skupina neidentifikovaných a neklasifikovaných klinických izolátů se výrazně zmenšila, avšak další taxonomicky obtížné kmeny se budou u člověka nepochybně dále objevovat vzhledem k dosud neodhadnutelné avšak bezpochyby ohromné genetické rozmanitosti rodu v přírodě a schopnosti řady druhů osídlivat různorodé ekosystémy.

Tabulka 3. Taxonomická pozice kmenů neidentifikovaných/neklasifikovaných v předchozích studiích.

Druh/DNA skupina/ Fenon	Bouvet & Grimont (1986)	Tjernberg & Ursing (1989)	Bouvet & Jeanjean (1989)	Seifert <i>et al.</i> (1997)	Dijkshoorn <i>et al.</i> (1998)	Nemec <i>et al.</i> (2000)	Celkem
<i>A. haemolyticus</i>		1				2	3
<i>A. junii</i>						1	1
<i>A. johsonii</i>		1				2	3
<i>A. lwoffii</i>					1		1
<i>A. radioresistens</i>		1					1
<i>A. ursingii</i>	2	5			1	17	25
<i>A. schindleri</i>		4		1	1	15	21
<i>A. parvus</i>						3	3
DNA skupina 11		1					1
DNA skupina 16		1					1
DNA skupina 13TU	1						1
DNA skupina "Close to 13TU"					1		1
Fenon 3			4			1	5
Fenon 7	1	2		1			4
Fenon 8					1	1	2
Fenon 9			1				1
Fenon 10			1				1
Dosud nezařazeno			1		1	3	5
Celkem	4	16	7	2	6	45	80

.....

Žádná klasifikace živé přírody nemůže být konečná. Je vždy určena metodou popisu a interpretací. Je metafyzickým nárokem svírajícím spontaneitu a růst. Časem se zřejmě ukáže, že popsané taxony nejsou izolované entity, ale jenom zdánlivé shluky diskretnosti v moři kontinuity a toku vývoje bakteriálního světa. Nicméně náležitý popis těchto byť i nejistých útvarů je užitečným krokem umožňujícím studium souvislosti a změn v živé populaci, uspořádání nepřehledných a stále narůstajících poznatků i predikci prakticky významných vlastností.

A. Nemec

⁸⁶ Christensen H, Bisgaard M, Frederiksen W *et al.* Is characterization of a single isolate sufficient for valid publication of a new genus or species? Proposal to modify Recommendation 30b of the Bacteriological Code (1990 Revision). *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:2221-2225.

⁸⁷ Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:846-849. Na základě této práce se DNA-DNA hybridizace provádí pouze u kmenů s podobností 16S rDNA vyšší než 97 %.

2.4. Shrnutí

Studie z let 1996-2004 přinesly tyto hlavní výsledky:

- Shromáždění světově unikátního souboru kmenů acinetobakterů. Tento soubor v kombinaci se systematickou polyfázovou analýzou přispěl k vyjasnění taxonomie a populační struktury rodu *Acinetobacter* a povahy multirezistence u *A. baumannii*.
- Vypracování metody konsenzuální identifikace založené na kombinaci numerické pravděpodobností identifikace podle biochemických znaků a restriční analýzy genů pro 16S rDNA. Metoda se osvědčila při identifikaci i při klasifikaci druhově nezařazených kmenů do provizorních taxonů.
- Určení taxonomické pozice kmenů s nejasnou druhovou příslušností a popis tří nových druhů: *A. ursingii*, *A. schindleri* a *A. parvus*. *A. ursingii* způsobuje závažné infekce u hospitalizovaných pacientů, zatímco *A. schindleri* se obvykle izoluje ze sliznic ambulantních pacientů. *A. parvus* má mezi acinetobaktery unikátní morfologii kolonií a může mít klinický význam.
- Klasifikace druhově nezařazených hemolytických kmenů do šesti feneticky diskrétních skupin (fenonů) představujících pravděpodobně další druhy.
- Potvrzení klíčové role *A. baumannii* v nemocniční populaci acinetobakterů. Multirezistentní a epidemické kmeny patří téměř výlučně do tohoto druhu.
- Objev dvou široce rozšířených klonálních skupin zahrnujících většinu českých multirezistentních kmenů *A. baumannii*. Tyto skupiny odpovídají epidemickým klonům I a II ze severozápadní Evropy. Jde o první doklad panevropského rozšíření klonálních linií *A. baumannii* a jejich detailní popis.
- Prostudování molekulární povahy rezistence k aminoglykozidům u českých kmenů *A. baumannii*. Její hlavní příčinou je enzymatická modifikace gentamicinu, tobramycinu a amikacinu. Modifikující enzymy se různě kombinují, což vede k vysoké a komplexní rezistenci. Intermediární citlivost k netilmicinu je pravděpodobně způsobena nadměrnou expresí efluxové pumpy AdeABC.
- Charakterizace strukturálních typů integrónů a definování jejich role v rezistenci *A. baumannii* k aminoglykozidům. Integrónové struktury o velikostech 3,0 kb a 2,5 kb (obsahují geny pro rezistenci ke gentamicinu a streptomycinu) jsou značně rozšířené u obou hlavních panevropských klonů. Popis struktury 3,0 kb je prioritní.
- Zjištění, že některé mechanismy rezistence (nespecifická efluxová pumpa AdeABC, eflux tetracyklinů) jsou evolučně konzervativní. Tyto mechanismy mohly hrát roli při úvodní adaptaci určitých klonů na nemocniční prostředí. Oproti tomu specifické a vysoce účinné mechanismy (enzymy modifikující aminoglykozidy) získávají klonálně příbuzné kmeny nezávisle, což vede k vysoké vnitroklonální diverzitě rezistence.
- Vypracování metody typizace multirezistentních kmenů *A. baumannii* založené na numerické analýze průměrů inhibičních zón v diskovém difúzním testu. Metoda je vhodná pro presumptivní epidemiologickou typizaci v rutinních laboratořích.
- Průkaz antibakteriálního účinku syntetického peptidu odvozeného z lidského laktoferinu *in vitro* i *in vivo* proti multirezistentním kmenům *A. baumannii*. Peptid je nadějným kandidátem pro léčbu infekcí vyvolaných kmeny rezistentními ke konvenčním antibiotikům.