

Multirezistentní klony *Pseudomonas aeruginosa* v České republice

A. NEMEC¹, M. MAIXNEROVÁ¹, M. MUSÍLEK¹

¹Státní zdravotní ústav, Praha

SOUHRN

Nemec A, Maixnerová M., Musílek M.: **Multirezistentní klony *Pseudomonas aeruginosa* v České republice**

Cíl: Rozhodnout, zda častá rezistence nemocničních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* izolovaných z hemokultur v České republice souvisí s klonálním šířením multirezistentních (MR) kmenů.

Materiál a metody: Studováno bylo 20 MR izolátů zachycených v roce 2007 z krve pacientů hospitalizovaných ve 20 nemocnicích v 15 městech. Každý z těchto izolátů byl rezistentní alespoň ke třem ze šesti protipseudomonádových antibiotik (piperacilin, ceftazidim, meropenem, ciprofloxacín, gentamicin, tobramycin). Další deset izolátů citlivých k těmto antibiotikům tvořilo kontrolní skupinu. Genotypy izolátů byly vyšetřeny multilokusovou sekvenční typizací (MLST), makrorestrikční analýzou genomové DNA (PFGE) a restrikční analýzou variabilních oblastí integrónů třídy 1.

Výsledky: Devět MR izolátů patřilo k multilokusovému sekvenčnímu typu ST 235, osm k ST 175, u zbývajících MR a všech citlivých izolátů byly zjištěny jedinečné ST. Jednotlivé ST se vzájemně lišily nejméně ve třech alelách. Izoláty s tímž ST měly shodné nebo podobné PFGE profily. Integróny byly zjištěny u všech MR izolátů, citlivé izoláty byly negativní. Sedm izolátů s ST 235 mělo strukturně shodné integróny s variabilní oblastí o délce 1,9 kb, sedm izolátů s ST 175 sdílelo integrón s variabilní oblastí 1,6 kb. Integróny zbývajících izolátů měly jedinečnou strukturu.

Závěr: V České republice jsou rozšířeny dva MR klony *P. aeruginosa*, z nichž jeden (ST 235) patří ke klonálnímu komplexu CC11 vyskytujícímu se i jinde v Evropě. Tyto klony se pravděpodobně významně podílejí na časté rezistenci českých izolátů *P. aeruginosa*.

Klíčová slova: *Pseudomonas aeruginosa*, multirezistentní klony, MLST, PFGE, integrón

SUMMARY

Nemec A, Maixnerová M., Musílek M.: **Multidrug resistant clones of *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic**

Objective: To assess whether the high rate of antimicrobial resistance among bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic is associated with the clonal spread of multidrug resistant (MDR) strains.

Material and methods: A total of 30 bloodstream isolates obtained in 2007 were studied, including 20 MDR isolates (from 20 hospitals in 15 cities) and 10 susceptible control isolates. Each of the MDR isolates was resistant to at least three of the following agents: piperacillin, ceftazidime, meropenem, ciprofloxacin, gentamicin, tobramycin. Isolates were investigated by multilocus sequence typing (MLST), macrorestriction analysis of genomic DNA (PFGE) and class 1 integron typing.

Results: Nine MDR isolates belonged to multilocus sequence type (ST) 235, eight to ST 175 and each of the remaining isolates yielded a unique ST. The STs differed from each other in at least three alleles. Isolates of the same ST had highly similar PFGE profiles. Integrons were found in all MDR isolates but in none of the susceptible controls. Seven isolates with ST 235 harbored the same integron with a 1.9 kb variable region, while seven isolates with ST 175 shared an integron with a 1.6 kb variable region. Each of the remaining isolates yielded a unique integron.

Conclusions: The high prevalence of antibiotic resistance in Czech isolates of *P. aeruginosa* is likely to be associated with the spread of MDR clones, one of which (ST 235) belongs to international clonal complex CC11.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, multidrug resistant clone, MLST, PFGE, integron

Klin mikrobiol inf lék 2008;14(5):168–172

Adresa: Doc. RNDr. Alexandr Nemeč, PhD., Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10, e-mail: anemec@szu.cz

Došlo do redakce: 9. 9. 2008

Přijato k tisku: 27. 9. 2008

Úvod

Pseudomonas aeruginosa je významným bakteriálním původcem infekcí u pacientů v intenzivní nemocniční péči. Závažným problémem jsou multirezistentní (MR) kmeny, které zásadně omezují léčebné možnosti. Na rezistenci *P. aeruginosa* se podílí řada molekulárních mechanismů, jejichž kombinace mohou vést až k rezistenci ke všem klinicky použitelným antibiotikům [1]. V literatuře se proto MR *P. aeruginosa* někdy označuje termínem „superbug“ [2], který vyjadřuje též obavy z dalšího vývoje populace tohoto organismu k léčebně nezládnutelné rezistenci [3]. A to

v situaci, kdy nelze v blízké budoucnosti očekávat uvedení nových látek s antipseudomonádovým účinkem [2].

Jedním z předpokladů účinné kontroly rezistence je znalost její epidemiologie [4]. Zjištění, do jaké míry se na růstu multirezistence podílí šíření MR kmenů a jakou roli při něm hraje nezávislý vznik rezistence u nepříbuzných kmenů, může vést ke zlepšení preventivních opatření. Pro posouzení klonálního původu multirezistence lze využít metody analýzy DNA, které umožňují určit strukturu bakteriální populace na poddruhové (kmenové) úrovni. Různé metody se liší svojí výpovědní hodnotou. Zatímco multilokusová se-

kvenční typizace (MLST) je založena na porovnání sekvencí několika provozních genů, které se vyskytují u všech kmenů (součást tzv. „core genome“), makrorestrikční analýza (PFGE) mapuje celý bakteriální genom a strukturální analýza mobilních genetických elementů nenesoucích geny pro rezistenci se zaměřuje na přídatné složky genomu („accessory genome“), které se vyskytují pouze u některých kmenů. Vhodnou kombinací metod lze určit roli epidemických klonů při šíření rezistence i proměnlivost rezistence u jednotlivých klonů.

Výsledky studie EARSS (The European Antimicrobial Resistance Surveillance System) za roky 2005 a 2006 ukázaly vysoký výskyt nemocničních izolátů *P. aeruginosa* rezistentních k protipseudomonádovým antibiotikům v České republice [5]. Cílem této pilotní studie bylo rozhodnout, zda daný jev souvisí s klonálním šířením určitých MR kmenů. Za tímto účelem byl genotypizačními metodami analyzován soubor izolátů *P. aeruginosa* pocházející z hemokultur pacientů hospitalizovaných v roce 2007 v České republice.

Materiál a metody

Kmeny

Celkem 30 studovaných izolátů pocházelo ze souboru 437 klinických izolátů *P. aeruginosa* získaných v roce 2007 při řešení projektů IGA MZ ČR NR/9428-3 a EARSS. Podle údajů o původu izolátů a výsledků primárního vyšetření citlivosti poskytnutých Národní referenční laboratoří pro antibiotika (NRL-ATB) bylo vybráno 20 MR izolátů (rezistentních nejméně ke třem z těchto antimikrobiálních látek: piperacilin, ceftazidim, meropenem, ciprofloxacin, gentamicin, tobramycin) pocházejících z 20 nemocnic v 15 městech ČR (obr. 1) a 10 izolátů citlivých ke všem testovaným antibiotikům. Všechny izoláty pocházely z krve hospitalizovaných pacientů.

MLST

Byla použita metoda podle Currana et al. pro sedm provozních genů (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA*, *trpE*) [6]. Postup zahrnoval izolaci genomové DNA, amplifikaci cílových oblastí a jejich sekvenaci pomocí kitu ABI PRISM® BigDye 3.1 Terminator a sekvenačního zařízení ABI PRISM® 3100 Avant (Applied Biosystems). Alelickým formám genů a jejich kombinacím byly přiřazeny číselné kódy na základě porovnání s databází MLST pro *P. aeruginosa* [<http://pubmlst.org/paeruginosa/>].

PFGE

Genotypová podobnost izolátů byla dále vyšetřena štěpením genomové DNA pomocí restriktivní endonukleázy *SpeI* (New England Biolabs) s následnou separací makrorestrikčních fragmentů v pulzním elektrickém poli [7]. Výsledné restriktivní profily byly porovnány vizuálně.

Typizace integrónů

Struktura variabilních oblastí integrónů třídy 1 byla analyzována podle publikovaného postupu [8]. U všech 30 izolátů byla nejdříve vyšetřena přítomnost integrónů třídy 1 pomocí PCR amplifikace vnitřního fragmentu genu pro integrázu (*intI1*). U pozitivních izolátů byly poté amplifikovány variabilní oblasti integrónů pomocí primerů komple-

mentárních ke konzervovaným oblastem 5' and 3' vymezením integrované genové kazety. Struktura variabilních oblastí byla porovnána restriktivní analýzou amplikonů s endonukleázou *HinI* (Fermentas).

Vyšetření citlivosti

Minimální inhibiční koncentrace (MIK) pro imipenem, meropenem, ceftazidim, cefepim, piperacilin, gentamicin, tobramycin, amikacin, ciprofloxacin a kolistin byla vyšetřena pomocí Etestu® (AB-Biodisk) na půdě s Mueller-Hintonovým agarem (Oxoid). Podle kritérií CLSI byly izoláty hodnoceny jako citlivé, intermediární nebo rezistentní [9].

Výsledky

Výsledky genotypizace a citlivost k antimikrobiálním látkám u 30 studovaných izolátů uvádí *tabulka 1*.

MLST

U devíti MR izolátů byl zjištěn alelický profil (*acsA-aroE-guaA-mutL-nuoD-ppsA-trpE*) 38-11-3-13-1-2-4 odpovídající sekvencnímu typu ST 235 a u osmi profil 28-22-5-3-3-14-19 odpovídající ST 175, zatímco tři zbývající MR i všechny citlivé izoláty měly jedinečné profily. Jednotlivé profily se vzájemně lišily nejméně ve třech alelách.

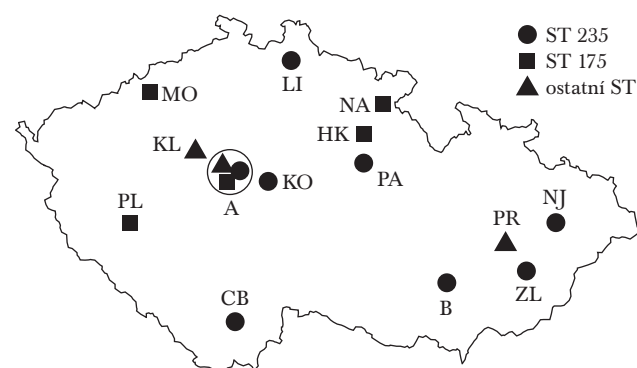
PFGE

Profily jednotlivých izolátů obsahovaly 25–30 elektroforetických proužků odpovídajících restriktivním fragmentům DNA o různé délce. PFGE profily izolátů s tímž ST se lišily nejvýše v poloze sedmi proužků, kdežto u izolátů s různými ST se lišily polohou více než 14 proužků.

Analýza integrónů

Gen *intI1* byl zjištěn u všech MR izolátů, zatímco všechny citlivé izoláty byly negativní. U izolátů s ST 235 byly v sedmi případech zjištěny amplikony o délce 1,9 kb a se shodným restriktivním profilem, jeden z těchto izolátů poskytl navíc amplikon o délce 0,5 kb. U dvou zbývajících izolátů s ST 235 bylo zjištěno po jednom jedinečném amplikonu. Izoláty s ST 175 měly až na jeden strukturálně

Obr. 1
Geografický původ 20 studovaných multirezistentních izolátů *P. aeruginosa* rozlišených podle multilokusového sekvencního typu (ST)



Tabulka 1
Genotyp a citlivost k antimikrobiálním látkám u 30 studovaných izolátů *P. aeruginosa*

Izolát č.	MLST (alelický) profil										Integron							MIK (mg/l)*				
	acsA	aroE	guaA	mutL	nuoD	ppsA	tpE	ST	PFGE†	(kb)*	Mer	Imi	Ctz	Cpm	Pip	Cip	Gen	Tob	Ami			
MR izoláty																						
ANC 3586	38	11	3	13	1	2	4	235	A	1,9	0,5	0,38	32	24	> 256	>32	12	32	64			
ANC 3539	38	11	3	13	1	2	4	235	A	1,9	4	3	48	32	> 256	>32	32	48	48			
ANC 3185	38	11	3	13	1	2	4	235	A	1,9	0,5	0,5	24	8	6-8	>32	32	48	48			
ANC 3173	38	11	3	13	1	2	4	235	A	2,6	0,25	0,38	16	8	6	24	32	48	48			
ANC 3248	38	11	3	13	1	2	4	235	A	1,9	12	12	16	12	> 256	>32	24	32	48			
ANC 3263	38	11	3	13	1	2	4	235	A	1,9	1,5	0,75	48	32	> 256	>32	48	64	64			
ANC 3492	38	11	3	13	1	2	4	235	A	1,9	1	0,75	6	6	24	>32	48	32	48			
ANC 3174	38	11	3	13	1	2	4	235	A	0,5+1,9	0,25	0,38	3	12	8	>32	16	96	96			
ANC 3211	38	11	3	13	1	2	4	235	A	1,0	12	12	48	12	48	>32	64	96	256			
ANC 3157	28	22	5	3	3	14	19	175	B	1,6	12	16	96	48	> 256	>32	256	32	6			
ANC 3169	28	22	5	3	3	14	19	175	B	1,6	16	12	48	24	> 256	>32	256	24	4			
ANC 3196	28	22	5	3	3	14	19	175	B	1,6	≥ 24	12	48	24	> 256	>32	256	16	6			
ANC 3513	28	22	5	3	3	14	19	175	B	1,6	4	8	8	8	64	>32	256	16	4			
ANC 3275	28	22	5	3	3	14	19	175	B	1,6	> 32	24	96	48	> 256	>32	256	24	6			
ANC 3434	28	22	5	3	3	14	19	175	B	1,6	8	6	16	12	> 256	>32	256	8	4			
ANC 3505	28	22	5	3	3	14	19	175	B	1,6	32	24	48	24	> 256	>32	256	32	8			
ANC 3587	28	22	5	3	3	14	19	175	B	0,7	8	12	32	24	≥ 256	>32	256	24	8			
ANC 3356	17	5	12	3	14	4	7	244	C	2,9	3	1	8	12	64	>32	256	48	128			
ANC 3568	6	20	1	3	4	4	2	132	D	0,8	2	1,5	24	16	> 256	>32	192	24	8			
ANC 3163	2	4	5	3	1	6	11	357	E	3,0	> 32	> 32	8	16	> 256	>32	256	64	3			
Citlivé izoláty																						
ANC 3177	125	5	6	3	4	13	23	633	F	-	0,125	1	1	1	2	0,094	2	0,75	3			
ANC 3208	39	6	12	11	3	15	2	245	NT	-	0,5	1	1,5	4	2	0,25	3	0,75	4			
ANC 3168	6	5	1	1	1	12	1	395	G	-	0,25	1	1,5	3	3	0,125	3	0,5	3			
ANC 3175	23	5	11	7	1	12	7	274	H	-	0,19	1	1,5	1	3	0,094	2	0,5	3			
ANC 3220	6	5	58	11	3	4	37	254	I	-	0,094	0,5	1,5	1,5	3	0,125	3	0,5	3			
ANC 3161	16	5	11	11	1	4	7	634	NT	-	0,25	1,5	1,5	3	3	0,19	4	1	6			
ANC 3201	4	4	16	12	1	6	3	253	NT	-	0,25	0,38	1,5	1,5	3	0,125	2	0,75	3			
ANC 3324	6	5	11	3	1	6	27	635	J	-	0,5	0,5	1,5	3	3	0,25	3	0,75	6			
ANC 3506	105	5	30	3	3	4	14	261	K	-	0,25	0,5	1,5	2	4	0,19	2	0,75	4			
ANC 3584	1	5	20	16	3	4	7	369	L	-	0,19	0,5	1,5	1,5	3	0,125	2	0,75	2			

§ Původ MR izolátů viz obr. 1. Nemocnice z téhož města jsou odlišeny číslicemi.

† Písmeno označuje PFGE profily lišící se polohou nejvýše sedmi elektroforetických proužků; NT, netypovatelné.

* Variabilní oblasti integronů o stejné velikosti měly shodný restriční profil; – negativní výsledek průkazu genu pro integrázu.

Mer, meropenem; Imi, imipenem; Ctz, ceftazidim; Cpm, cefepim; Pip, piperacilin; Gen, ciprofloxacín; Tob, tobramycin; Ami, amikacin.

shodné amplikony o délce 1,6 kb. Integroány každého ze zbývajících tří MR izolátů měly jedinečnou strukturu.

Citlivost k antimikrobiálním látkám

Všechny MR izoláty byly citlivé ke kolistinu (MIK < 4 mg/l), rezistentní k ciprofloxacinu a (s výjimkou dvou intermediárně citlivých izolátů) ke gentamicinu a tobramycinu (tabulka 1). Citlivost k β -laktamům byla různá, a to i u izolátů se stejným ST. Izoláty s ST 175 byly oproti izolátům s ST 235 vysoce rezistentní ke gentamicinu, citlivé k amikacinu a většinou rezistentní ke karbapenemům.

Diskuze

Cílem této studie bylo zjistit, zda se na časté rezistenci *P. aeruginosa* v České republice podílí klonální šíření MR kmenů. Genotypová analýza 20 MR a 10 citlivých izolátů ukázala, že většina (17 z 20) MR izolátů náležela do dvou genotypově odlišných skupin, z nichž každá zahrnovala izoláty se shodným MLST profilem, podobnými PFGE profily a většinou shodnými integroány. Zjištěná genotypová podobnost MR izolátů ukazuje na klonální šíření MR kmenů, vyloučit však nelze ani nezávislý vznik rezistence u kmenů původně citlivého klonálního uskupení převažujícího v nemocničním prostředí. Výsledky je proto nutné interpretovat v kontextu znalostí o populační struktuře *P. aeruginosa* a metodicky srovnatelných studií.

Charakter populací bakteriálních druhů se – z genetického hlediska – pohybuje mezi klonální (zdrojem diverzifikace druhového „core genome“ jsou mutace) a panmiktickou strukturou (k diverzifikaci dochází zvláště rekombinací následkem horizontálního přenosu DNA) [10]. Curran et al. zjistili velkou rozmanitost MLST profilů u obecné populace *P. aeruginosa* a zároveň existenci skupin izolátů se shodnými nebo podobnými MLST profily [6]. U *P. aeruginosa* se tudíž předpokládá klonálně epidemická struktura charakterizovaná rekombinací alelických variant provozních genů s dočasným (epidemickým) rozšířením určitých MLST genotypů. Příkladem je příbuznost evropských izolátů rezistentních ke karbapenemům [11,12].

Porovnání našich a zahraničních výsledků ukázalo, že MLST profily příbuzné s naším profilem 38-11-3-13-1-2-4 (ST 235) byly nalezeny i jinde v Evropě. Shodný profil byl prokázán u izolátů z Polska [13] a Maďarska [12], jeho varianty lišící se v jedné alele u izolátů z Itálie (profil 38-11-3-9-1-2-4; ST 227) a z Řecka a Švédska (profil 38-11-5-13-1-2-4; ST 230) [11]. Tyto profily náležejí do klonálního uskupení CC11 (pozn. klonální komplex je uskupení podobných ST lišících se obvykle nejvýše ve dvou ze sedmi alel). Oproti tomu druhý profil převažující mezi českými MR izoláty (28-22-5-3-3-14-19; ST 175) neuvádí žádná z citovaných studií s výjimkou jedolokusové varianty (28-22-5-3-1-14-19; ST 228) zjištěné u italského izolátu [11]. Nutno zmínit, že citované práce se zabývaly nepočetnými skupinami izolátů produkujících β -laktamázy typu PER-1 [13] nebo VIM [11,12]. Ve studii zaměřené na obecnou populaci *P. aeruginosa* nebyl mezi 139 sekvenčními typy zjištěn ST 235 ani ST 175 [6]. V jiné studii bylo u 90 izolátů z rekta zjištěno 60 různých ST, z toho tři izoláty s ST 235 a dva izoláty s sekvenčními typy tvořícími s ST 235 klonální komplex, zatímco žádný ST nebyl příbuzný s ST 175 [14]. U českých

izolátů tak převažuje v literatuře dosud nepopsaný ST 175 a ST 235 zjištěný zvláště u maďarských a polských izolátů produkujících β -laktamázy PER-1 nebo VIM.

Srovnání se zmíněnými publikacemi umožňují i výsledky analýzy integroánů. Giske et al. našli u 11 studovaných izolátů 10 integroánů s různou strukturou variabilní oblasti (z toho každý ze sedmi izolátů CC11 s jedinečným integroánem) [11]. Podobně Libisch et al. zjistili šest různých integroánů u devíti izolátů produkujících VIM (dva z nich byly izoláty s ST 235 s různými integroány) [12]. Tyto výsledky dokládají vysokou rozmanitost integroánů i u izolátů téhož klonálního komplexu a sekvenčního typu. Skutečnost, že většina českých izolátů s týmž MLST profilem nesla shodné integroány, tedy představuje pravděpodobný důsledek jejich bezprostřední klonální a tudíž i epidemiologické vazby. Tomu odpovídají i velmi podobné PFGE profily u izolátů s týmž MLST profilem. I při omezeném počtu studovaných izolátů lze předpokládat, že tyto klony představují významnou část MR izolátů z infekcí krevního řečiště u hospitalizovaných pacientů v České republice.

Závěr

Na rezistenci nemocničních izolátů *P. aeruginosa* v České republice se podílejí dva MR klony, z nichž jeden patří k evolučně širšímu klonálnímu uskupení vyskytujícímu se v dalších evropských zemích. Shoda nebo vysoká podobnost genotypových markerů u izolátů téhož klonu ukazuje na nedávné klonální rozšíření MR kmenů v českých nemocnicích. Výskyt MR epidemických klonů u *P. aeruginosa* a dalších významných nemocničních patogenů [15, 16] na území celého státu pravděpodobně souvisí s nedostatečnými opatřeními proti šíření MR mikroorganismů.

Poděkování

Autoři děkují kolegům z diagnostických laboratoří za poskytnutí izolátů a pracovníkům Národní referenční laboratoře pro antibiotika za organizaci sběru izolátů a primární data citlivosti. Studie byla součástí grantového projektu NR/9428-3 Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví České republiky.

Literatura

- Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002;34(5):634–40.
- Nordmann P, Naas T, Fortineau N, Poirel L. Superbugs in the coming new decade; multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in 2010. *Curr Opin Microbiol*. 2007;10(5):436–40.
- McGowan JE Jr. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Med*. 2006 Jun;119(6 Suppl 1):S29–36.
- Gould IM. The epidemiology of antibiotic resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Aug 29. [Epub ahead of print]
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). EARSS annual report 2006. http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202006%20Def_tcm61-44176.pdf (poslední přístup 22.8. 2008)
- Curran B, Jonas D, Grundmann H, et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5644–9.
- Vošahlíkova S, Dřevínek P, Cinek O, et al. High genotypic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis in the Czech Republic. *Res Microbiol*. 2007;158(4):324–29.
- Nemec A, Dolzani L, Brisse S, et al. 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(Pt 12):1233–40.

9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement M100-S15. CLSI, Wayne, PA, USA, 2005.
10. Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(10):4384–8.
11. Giske CG, Libisch B, Colinson C, et al. Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*. 2006;44(12):4309–15.
12. Libisch B, Watine J, Balogh B, et al. Molecular typing indicates an important role for two international clonal complexes in dissemination of VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Hungary. *Res Microbiol*. 2008;159(3):162–8.
13. Empel J, Filczak K, Mrówka A, et al. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J Clin Microbiol*. 2007;45(9):2829–34.
14. Johnson JK, Arduino SM, Stine OC, et al. Multilocus sequence typing compared to pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2007;45(11):3707–12.
15. Melter O, Aires de Sousa M, Urbásková P, et al. Update on the major clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic. *J Clin Microbiol*. 2003;41(11):4998–5005.
16. Nemeč A, Krízová L, Maixnerová M, et al. 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*. 2008;62(3):484–9.