

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Ladislava Švandová

**Extenzivně rezistentní *Acinetobacter baumannii* v České republice: populačně genetická
struktura a mechanismy rezistence ke karbapenemům a aminoglykosidům**

**Extensively resistant *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic: population genetic
structure and mechanisms of resistance to carbapenems and aminoglycosides**

Diplomová práce

Školitel: prof. RNDr. Alexandr Nemeč, PhD. et Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 8. 2018

Podpis:

Děkuji svému školiteli prof. RNDr. Alexandru Nemcovi, Ph.D. et Ph.D. za vedení diplomové práce a cenné rady, Martině Maixnerové za technickou pomoc a Mgr. Lence Radolfové, Ph.D. za odborné konzultace (Laboratoř bakteriální genetiky, SZÚ). Dále pak prim. MVDr. Petru Ježkovi a Mgr. Petře Zívalové za pomoc při analýze epidemiologické situace v Oblastní nemocnici Příbram. Díky patří též kolegům v mém zaměstnání i mým nejbližším za toleranci a podporu při studiu.

ABSTRAKT

Práce řeší otázku epidemiologie antibiotické rezistence u *Acinetobacter baumannii*, dnes jednoho z nejproblematictějších bakteriálních původců infekcí člověka ve smyslu selhávání antimikrobní terapie. Jejím cílem bylo definovat populačně-genetické vlastnosti, epidemiologii a povahu rezistence u vzorku aktuální populace *A. baumannii* z České republiky. Studováno bylo 55 multirezistentních izolátů zachycených v osmi zdravotnických zařízeních ve Středočeském kraji a Praze od října 2016 do května 2018. U těchto izolátů byla provedena identifikace na druhové, klonální a kmenové úrovni, určen fenotyp a genotyp rezistence a provedena klasifikace do pěti skupin izolátů s pravděpodobnou epidemiologickou vazbou. Studované izoláty téměř výlučně patřily do globálního klonu ECII; z nich pak 53 % tvořilo geneticky poměrně homogenní skupinu charakterizovanou extenzivní rezistencí k antibiotikům (citlivost pouze ke kolistinu), přítomností genů pro ArmA a OXA-23 (rezistence ke všem aminoglykosidům a karbapenemům) a výskytem na všech lokalitách. Podrobná epidemiologická analýza izolátů z Příbrami a okolí prokázala epidemické šíření dvou kmenů, z nichž jeden patřil k extenzivně rezistentní skupině. Oba tyto kmeny byly izolovány od pacientů hospitalizovaných na chirurgickém oddělení, a to i po jejich propuštění do ambulantní péče. Naše výsledky dokládají pokračující šíření extenzivně rezistentních kmenů ECII s ArmA a OXA-23, které byly v Česku poprvé zjištěny v roce 2015.

Klíčová slova: *Acinetobacter baumannii*, aminoglykosid, genotypizace, karbapenem, epidemický klon, epidemiologie, antibiotická rezistence.

ABSTRACT

This study focuses on the question of the epidemiology of resistance to antibiotics in *Acinetobacter baumannii*, which is nowadays one of the most problematic bacterial pathogens associated with failing antimicrobial therapy. Its aim was to define population-genetic properties, epidemiology and the nature of multidrug resistance for a sample of the current population of *A. baumannii* from Czechia. A total of 55 isolates were collected in eight medical facilities in central Bohemia from October 2016 to May 2018. The isolates were assessed for their identity at the species, clonal and strain levels as well as resistance phenotype and genotype; they were classified into five clonal groups, each of which encompassed isolates that were likely to be epidemiologically related. The 55 isolates studied belonged, nearly exclusively, to global clone ECII, with 53 % of them forming a genetically relatively homogeneous group characterized by extensive resistance to antibiotics (susceptible only to colistin), the presence of genes encoding ArmA and OXA-23 (resistance to all aminoglycosides and carbapenems) and spread in all locations. The in-depth epidemiological analysis of isolates from the city of Přebor and its vicinity indicated the regional spread of two strains, one of which belonged to the extensively-resistant group. Both strains were isolated from patients hospitalized in a surgical ward (also after they were released for ambulatory care). Our results provide evidence for the continuing spread of extensively-resistant ECII strains with ArmA and OXA-23 genes, which follows their first detection in Czechia in June 2015.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, aminoglycoside, genotyping, carbapenem, epidemic clone, epidemiology, antibiotic resistance.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. PŘEHLED LITERATURY	8
2.1. Problém bakteriální multirezistence k antibiotikům	8
2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i>	9
2.2.1. Taxonomie, vlastnosti a lékařský význam	9
2.2.2. Populačně genetická struktura a epidemické klony	10
2.2.3. Citlivost na antibiotika a získaná rezistence	12
2.2.3.1. Rezistence k β -laktamovým antibiotikům	13
2.2.3.2. Rezistence k aminoglykosidům	15
2.2.4. Situace v České republice	16
3. CÍLE PRÁCE	20
4. MATERIÁL A METODY	21
4.1. Vyšetření citlivosti k antibiotikům	21
4.1.1. Antibiotika a referenční kmeny	21
4.1.2. Difuzní diskový test	22
4.1.3. Mikrodiluční metoda	22
4.2. Identifikace pomocí MALDI-TOF MS	22
4.3. Identifikace <i>A. baumannii</i> průkazem genu pro OXA-51	23
4.4. Identifikace epidemických klonů ECI a ECII pomocí multiplexové PCR ...	24
4.5. Epidemiologická genotypizace pomocí makrorestrikční analýzy	25
4.6. Průkaz genů rezistence pomocí PCR	26
5. VÝSLEDKY	29
5.1. Výběr izolátů	29
5.2. Identifikace na druhové a klonální úrovni	31
5.3. Citlivost na antibiotika a vztah mezi genotypem a fenotypem rezistence	31
5.4. Skupiny izolátů s pravděpodobnou epidemiologickou vazbou	38
5.5. Epidemiologická analýza v Oblastní nemocnici Příbram	43
6. DISKUZE	47
7. SOUHRN	51
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	53

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- AAC** Acetyltransferáza aminoglykosidu (*Aminoglycoside Acetyltransferase*)
- AFLP** Fingerpintová DNA metoda (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)
- AME** Enzymy modifikující aminoglykosidy (*Aminoglycoside Modifying Enzymes*)
- ANT** Nukleotidyltransferáza aminoglykosidu (*Aminoglycoside Nucleotidyltransferase*)
- APH** Fosfotransferáza aminoglykosidu (*Aminoglycoside Phosphotransferase*)
- ARO** Anesteziologicko-resuscitační oddělení
- CLSI** *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- ECI** Epidemický klon I (*Epidemic Clone I*)
- ECII** Epidemický klon II (*Epidemic Clone II*)
- ESBL** β -laktamázy z rozšířeným substrátovým spektrem (*Extended-Spectrum β -Lactamases*)
- MALDI-TOF MS** *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of-Flight Mass Spectrometry*)
- MBL** Metalo- β -laktamáza (*Metallo- β -lactamase*)
- MIC** Minimální inhibiční koncentrace (*Minimal Inhibitory Concentration*)
- MLSA** Multilokusová sekvenční analýza (*Multilocus Sequence Analysis*)
- MLST** Multilokusová sekvenční typizace (*Multilocus Sequence Typing*)
- PCR** Polymerázová řetězová reakce (*Polymerase Chain Reaction*)
- PFGE** Gelová elektroforéza v pulzním poli (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*)
- WHO** Světová zdravotnická organizace (*World Health Organization*)

1. ÚVOD

Předkládaná diplomová práce se věnuje lékařsky aktuální problematice epidemiologie antibiotické rezistence u nemocničního bakteriálního patogenu *Acinetobacter baumannii*. Bakterie rodu *Acinetobacter* se ještě v 70. letech minulého století považovaly za obecně neškodné komenzální mikroorganismy, které nehrají podstatnou roli při vzniku onemocnění u člověka. Počínaje 80. lety se však tento jejich obraz začíná dramaticky měnit. Kmeny acinetobakterů se začínají stále častěji izolovat z případů infekcí hospitalizovaných pacientů, zvláště pak u osob se závažným základním onemocněním v intenzivní péči. Objevují se případy epidemického šíření infekcí a u izolovaných kmenů se zjišťuje rezistence k dosud účinným antibiotikům. Dnes jsou multirezistentní acinetobaktery, a zvláště pak jejich lékařsky nejvýznamnější druh *A. baumannii*, považovány za jednoho z hlavních původců nemocničních infekcí. Tuto skutečnost podtrhuje zpráva Světové zdravotnické organizace z roku 2017, která tento druh uvádí hned po extenzivně rezistentním *Mycobacterium tuberculosis* jako nejproblematictější etiologické agens infekcí u člověka ve smyslu urgentní potřeby vývoje nových antimikrobních látek.

Práce navazuje na dlouhodobé zaměření řešitelského pracoviště (Laboratoř bakteriální genetiky, Státní zdravotní ústav v Praze) na problematiku rodu *Acinetobacter*. Součástí tohoto zaměření je i systematické studium mechanismů, genetiky a epidemiologie antibiotické rezistence u *A. baumannii*. Laboratoř se ve světovém kontextu podílela na realizaci prvních studií, které přispěly k odhalení epidemicko-klonální povahy populační struktury tohoto druhu, identifikaci hlavních epidemických klonů a jejich vazby na antibiotickou rezistenci. Další studie ukázaly změny v české populaci acinetobakterů směrem ke kmenům nesoucím efektivnější mechanismy rezistence. Poslední práce z let 2015 a 2016 pak identifikovaly geneticky novou populaci *A. baumannii* charakterizovanou kvantitativně vysokou rezistencí ke všem klinicky využitelným antibiotikům vyjma polymyxinů a naznačily její značný epidemický potenciál. Předložená práce na tato zjištění navazuje s cílem prozkoumat vzorek aktuální populace multirezistentních kmenů *A. baumannii* u nás s ohledem na nejnovější poznatky ohledně epidemiologie a povahy multirezistence u tohoto organismu.

2. PŘEHLED LITERATURY

2.1. Problém bakteriální multirezistence k antibiotikům

Antibiotika se považují za nejúspěšnější formu chemoterapie vzniklou ve 20. století a pravděpodobně i v celé historii medicíny (Wright, 2007). Jejich teoretickým východiskem byl koncept „Kouzelné střely“, který formuloval Paul Ehrlich v roce 1900 a jehož podstatou byla selektivní toxicita definovaných chemických látek na patogenní mikroorganismy (Wright, 2007). Zatímco první látky s antibiotickými účinky byly připraveny synteticky už v první třetině 20. století, zásadní přínos měl až objev přírodního penicilinu Alexandrem Flemिंगem v roce 1928, jeho následná izolace a zahájení průmyslové produkce během druhé světové války. Následoval „Zlatý věk antibiotik“ (1945–1960), kdy byla objevena a charakterizována většina hlavních skupin dnes používaných antibiotik, a to vesměs jakožto přírodních produktů bakterií a plísní (Wright, 2007). V následujících 60. letech pak převládla představa o definitivním vyřešení problémů bakteriálních infekcí člověka pomocí antibiotik.

Nedlouho po rozšíření antibiotické léčby se však objevily případy léčebného selhání, jehož příčinou byla bakteriální rezistence. Ukázalo se, že bakterie jsou schopné rychle a účinně reagovat na nově zaváděná antibiotika získáním účinných mechanismů omezujících jejich účinek. Klasickým příkladem je rezistence *Staphylococcus aureus* k penicilinům (Lowy, 2003). Zatímco v době Flemingova objevu byla tato bakterie k penicilinu citlivá, koncem 60. let už byla většina kmenů rezistentních díky produkci β -laktamázy. Na zavedení chemicky modifikované, k β -laktamáze odolné řady penicilinů (meticilin, oxaciliny) začátkem 60. let reagovala populace *S. aureus* velmi záhy vznikem rezistentních kmenů (tzv. MRSA, *S. aureus* rezistentní k meticilinu), jež se v následujících desetiletích staly noční můrou nemocnic. Podobně na plošné, často zbytečné používání antibiotik reagovaly další bakteriální patogeny. Výsledkem je dnešní situace, kdy se antibiotická rezistence považuje za jeden z hlavních problémů medicíny a hovoří se o konci antibiotické éry (Falagas a Bliziotis, 2007).

Problém s antibiotickou rezistencí však není stejně závažný u všech bakteriálních patogenů. Jsou skupiny, u nichž se rezistence ke klíčovým antibiotikům navzdory jejich dlouhodobému používání nevyvinula (např. *Streptococcus pyogenes* a penicilin). Na druhé straně stojí organizmy, u nichž nejvíce hrozí selhání konvenční antimikrobní terapie a existují omezené možnosti ohledně zavedení nových, účinnějších antibiotik. Tuto skupinu tzv. „superbugs“ tvoří kmeny bakteriálních druhů, které sice nedisponují vysokou primární patogenitou, ale

způsobují infekce u oslabených pacientů v nemocnicích, zvláště osob v intenzivní léčebné péči. Talbot et al. (2006) do této skupiny, kterou označil ESKAPE, zařadil *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacteriaceae* produkující β -laktamázy s rozšířeným spektrem (ESBL), *Enterococcus faecium* rezistentní k vankomycinu, *Pseudomonas aeruginosa* a *S. aureus* rezistentní k metilcinu.

Výjimečné postavení mezi patogeny ESKAPE zaujímá druh *A. baumannii*. Již Talbot et al. (2006) tento organizmus spolu s *P. aeruginosa* označili jako nejproblematictější s ohledem na absenci budoucích terapeutických alternativ. Tuto pozici zaujal *A. baumannii* i v pozdějších hodnoceních (Boucher et al., 2009; Vila a Pachon, 2011), a to i díky svému dalšímu vývoji směrem k panrezistenci, tj. rezistenci ke všem klinicky využitelným antibiotikům. WHO pak v roce 2017 tento druh uvádí po extenzivně rezistentním *Mycobacterium tuberculosis* jako nejproblematictější mikroorganismus ve smyslu urgentní potřeby vývoje nových antimikrobních látek (Tacconelli et al., 2018). V některých případech je přitom *A. baumannii* jednou z nejčastěji izolovaných bakterií od hospitalizovaných pacientů (Kořpa et al., 2018).

2.2. *Acinetobacter baumannii*

2.2.1. Taxonomie, vlastnosti a lékařský význam

A. baumannii je příslušníkem rodu *Acinetobacter*, jenž spolu s rody *Moraxella* a *Psychrobacter* tvoří čeleď *Moraxellaceae*, náležející do třídy *Gammaproteobacteria*. Rod *Acinetobacter* zahrnuje gramnegativní, striktně aerobní, nepohyblivé bakterie, které mají v konvenčních mikroskopických preparátech tvar krátkých tyčinek nebo koků, často uspořádaných ve dvojicích (Baumann et al., 1968). Rod v současnosti tvoří 54 druhů s validně publikovanými jmény a řada skupin představujících pravděpodobně další, dosud formálně nepojmenované druhy (<https://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf>). Některé z nich, jako např. *Acinetobacter guillouiae* (Yoon et al., 2014) nebo *Acinetobacter variabilis* (Krizova et al., 2015), jsou rozšířené ve vodních a půdních ekosystémech a mohou být izolovány i od lidí a zvířat, u nichž příležitostně vyvolávají infekce. Jiné jsou vázány na specifický ekosystém, jako např. *Acinetobacter nectaris* izolovaný z květního nektaru (Álvarez-Pérez et al., 2013). *A. baumannii* spolu s několika dalšími druhy tvoří fylogeneticky oddělenou skupinu, jež se označuje jako komplex *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* (Nemec et al., 2011). Tato skupina vedle *A.*

baumannii zahrnuje půdní druh *A. calcoaceticus* a další čtyři druhy, které se obvykle izolují od lidí, ale vyskytují se i ve vnějším prostředí (Cosgaya et al., 2016).

A. baumannii je z lékařského hlediska jednoznačně nejvýznamnějším druhem rodu. Zahrnuje převážnou většinu klinicky a epidemiologicky významných izolátů acinetobakterů od hospitalizovaných pacientů, zvláště pak osob se závažným základním onemocněním v intenzivní léčebné péči. Jakožto typický podmíněný patogen způsobuje u těchto pacientů škálu infekcí, jako jsou ventilační pneumonie, infekce močového ústrojí a měkkých tkání, septikémie, endokarditidy nebo meningitidy (Dijkshoorn et al., 2007; Peleg et al., 2008). Může dlouhodobě přežívat a šířit se v nemocničním prostředí, což podporuje i jeho u gramnegativních bakterií neobvyklá odolnost k vyschnutí (Jawad et al., 1998). Izolace z klinického materiálu hospitalizovaných pacientů je však mnohem častěji výrazem kolonizace než skutečné infekce, byť jejich rozlišení je obtížné (Dijkshoorn et al., 2007).

Podobně problematické je i určení molekulárních faktorů patogenity, které jsou zodpovědné za infekční potenciál *A. baumannii*. I když byla identifikována řada genů, jejichž produkty se uplatňují při adherenci, kolonizaci, tvorbě biofilmu, vazbě železa, cytotoxicitě, koagulaci lidské plazmy atd., konkrétní role v patogenezi zůstává u většiny z nich stále nejasná (Wong et al., 2017). Faktory, které naopak k lékařskému významu *A. baumannii* jasně přispívají je schopnost účinně vyvíjet a integrovat rezistenci ke všem klinicky využitelným antibiotikům a epidemicky se šířit v lokálním i geograficky širokém prostoru (Dijkshoorn et al., 2007).

2.2.2. Populačně genetická struktura a epidemické klony

Epidemické klony jsou evolučně samostatné a genotypově relativně homogenní skupiny kmenů, které se zřetelně odlišují od ostatních kmenů daného druhu a mohou se vyskytovat v různém čase a na různých místech (Nemec, 2008). Na existenci epidemických klonů *A. baumannii* poprvé upozornila v polovině 90. let studie Dijkshoorn et al. (1996), v níž byly mezi izoláty ze západoevropských nemocnic (Velká Británie, Holandsko, Dánsko a Belgie) z let 1982 až 1990 rozeznána dvě klonální uskupení, označená jako klon I a II. Tyto klony charakterizovalo epidemické šíření mezi hospitalizovanými pacienty a ve srovnání se sporadicky izolovanými kmeny *A. baumannii* vyšší stupeň rezistence k antibiotikům. Další multirezis-

tentní epidemický klon, tzv. klon III, identifikovali van Dessel et al. (2004) u evropských izolátů zachycených především ve francouzských a španělských nemocnicích v 90. letech. Obě tyto studie byly založeny na kombinaci několika typizačních metod umožňujících klasifikaci izolátů na poddruhové úrovni; šlo především o fingerprintové komparativní metody AFLP a ribotypizaci.

Klíčový význam pro definování populační struktury *A. baumannii* pak měla studie Diancourt et al. (2010), která pro analýzu klonální příbuznosti *A. baumannii* využila metody multi-locusové sekvenční typizace (MLST) a analýzy (MLSA). Na základě analýzy rozsáhlého bakteriálního souboru 154 izolátů tato studie potvrdila existenci tří hlavních klonálních komplexů odpovídajících výše uvedeným klonům I–III, pro něž se postupně zavedla různá označení, jako např. „evropské“ nebo „mezinárodní“ (v této práci se pro klony I a II používá označení ECI a ECII), a jejich vazbu s antibiotickou multirezistencí. Zároveň naznačila možnou existenci dalších klonálních uskupení s epidemickým potenciálem. Následující studie pak potvrdily rozšíření multirezistentních klonů odlišných od klonů I–III (Da Silva et al., 2014; Stietz et al., 2013).

Počáteční problémy s identifikací izolátů *A. baumannii* do známých epidemických klonů pomocí fingerprintových metod byly vyřešeny zavedením metody MLST, která se stala a standardním postupem při populačně genetických a epidemiologických studiích u bakteriálních patogenů (Maiden et al., 2013). Tato metoda, jež je založena na srovnávací analýze částečných sekvencí několika provozních genů, umožňuje mezilaboratorní sdílení údajů a jejich archivaci, což má zásadní význam pro epidemiologické studie na národní i globální úrovni. Pro *A. baumannii* byly původně zavedeny dvě typizační schémata (Bartual et al., 2005; Diancourt et al., 2010), která jsou dnes integrována na webové stránce PubMLST (<https://pubmlst.org/abaumannii>). Metodicky jednoduché a rychlé rozlišení hlavních epidemických klonů ECI a ECII pak umožňuje metoda podle Turton et al. (2007) založená na multiplexové PCR zaměřené klonálně specifické sekvence tří chromozomálních genů.

Zpětný pohled na výsledky studií zaměřených na výskyt epidemických klonů ukazuje rozdíly v distribuci těchto klonů v jednotlivých zemích. Zatímco v 80. a 90. letech v evropských zemích převažoval klon ECI (Dijkshoorn et al., 1996; Nemeč et al., 1999, 2004a), po přelomu milénia dochází k posunu ve prospěch ECII (Da Silva et al., 2007; Di Popolo et al.,

2011; Nemeč et al., 2008; Turton et al., 2007). ECII je poté identifikován jako dominantní epidemický klon i v řadě mimoevropských zemí (Higgins et al., 2010).

Rozšíření kmenů náležejících do téhož klonálního uskupení, jako je tomu v případě ECII, v určité oblasti komplikuje mikrobiologickou typizaci bakteriálních izolátů pro účely epidemiologické analýzy. K této analýze lze využít řadu tradičních přístupů, jako jsou fingerprintové metody založené na polymerázové řetězové reakci (PCR) typu Rep-PCR či RAPD (Dijkshoorn a Nemeč 2008) nebo makrorestrikční analýza genomové DNA (Tenover et al., 1995), která je stále platí za zlatý metodický standard pro epidemiologickou typizaci. Genetická podobnost izolátů ECII se u těchto metod projevuje vysokou podobností genotypových profilů (Nemeč et al., 2008), což komplikuje rozhodnutí o epidemiologické vazbě porovnávaných izolátů. Velký pokrok v rychlosti a dostupnosti celogenomové sekvenace zde nabízí vysoce citlivou alternativu k tradičním přístupům, která oproti nim nabízí nejen podrobnější informaci o genetické podobnosti, ale i analýzu dalších lékařsky významných vlastností, jako je rezistence k antibiotikům (Higgins et al., 2017).

2.2.3. Citlivost na antibiotika a získaná rezistence

A. baumannii má mimořádnou schopnost akumulovat různé mechanismy rezistence, které přispívají k jeho perzistenci v nemocničním prostředí a šíření mezi hospitalizovanými pacienty (Peleg et al., 2008). Některé kmeny mohou být panrezistentní, tj. rezistentní ke všem klinicky využitelným antimikrobiálním látkám, a tyto kmeny představují noční můru zdravotnických zařízení (Rossolini a Mantengoli, 2008). Ke vzniku rezistence obecně dochází horizontálním přenosem nových genů nebo modifikací již přítomné genetické informace. *A. baumannii* získává nové geny pomocí mobilních nebo mobilizujících genetických elementů, jako jsou plazmidy, transpozony nebo integrony (Roca et al., 2012). Modifikace přítomných struktur zahrnuje především spontánní mutace, které vedou k modifikaci zásahového místa, a inserce mobilních genetických elementů, které mění expresi endogenních mechanismů rezistence nebo modifikují propustnost membrány (Roca et al., 2012). Vzhledem k velkému spektru těchto mechanismů u *A. baumannii* se následující kapitoly zaměří na mechanismy relevantní pro cíle této diplomové práce, konkrétně na enzymatickou rezistenci k β -laktamovým a aminoglykosidovým antibiotikům. Známé mechanismy tohoto typu u *A. baumannii* shrnuje tabulka 1.

Tabulka 1. Mechanizmy enzymatické rezistence *A. baumannii* k antibiotikům.

Mechanismus	Skupinové zařazení mechanismu	Původ	Typický substrát
Hydrolyza β-laktamů			
ADC	Chromozomální β -laktamáza třídy C	Vlastní	Cefalosporiny
TEM-1*	β -laktamáza třídy A s úzkým substrátovým spektrem	Získaná	Peniciliny
SHV	β -laktamáza třídy A s úzkým substrátovým spektrem	Získaná	Peniciliny
SCO-1	β -laktamáza třídy A s úzkým substrátovým spektrem	Získaná	Peniciliny
CARB	β -laktamáza třídy A s širokým substrátovým spektrem	Získaná	Peniciliny
VEB-1	β -laktamáza třídy A s širokým substrátovým spektrem	Získaná	Cefalosporiny
PER-1	β -laktamáza třídy A s širokým substrátovým spektrem	Získaná	Cefalosporiny
GES	β -laktamáza třídy A s širokým substrátovým spektrem	Získaná	Cefalosporiny
CTX-M-2	β -laktamáza třídy A s širokým substrátovým spektrem	Získaná	Cefalosporiny
OXA-51*	Chromozomální β -laktamáza třídy D	Vlastní	Karbapenemy
OXA-23*	β -laktamáza třídy D	Získaná	Karbapenemy
OXA-24/40*	β -laktamáza třídy D	Získaná	Karbapenemy
OXA-58*	β -laktamáza třídy D	Získaná	Karbapenemy
OXA-143*	β -laktamáza třídy D	Získaná	Karbapenemy
OXA-235*	β -laktamáza třídy D	Získaná	Karbapenemy
IMP	Metalo- β -laktamáza	Získaná	Karbapenemy
SIM	Metalo- β -laktamáza	Získaná	Karbapenemy
VIM	Metalo- β -laktamáza	Získaná	Karbapenemy
NDM	Metalo- β -laktamáza	Získaná	Karbapenemy
Modifikace aminoglykosidů			
AAC(3)-Ia	Acetyltransferáza	Získaná	Gentamicin
AAC(3)-IIa	Acetyltransferáza	Získaná	Gentamicin, tobramycin
AAC(6')-Ib	Acetyltransferáza	Získaná	Tobramycin, amikacin
AAC(6')-Ih	Acetyltransferáza	Získaná	Tobramycin, amikacin
APH(3')-I	Fosfotransferáza	Získaná	Kanamycin
APH(3')-VI	Fosfotransferáza	Získaná	Amikacin
ANT(2'')-Ia	Nukleotidyltransferáza	Získaná	Gentamicin, tobramycin
ANT(3'')-Ia	Nukleotidyltransferáza	Získaná	Streptomycin
Metylace aminoglykosidů			
ArmA	Metyláza 16S rRNA	Získaná	Aminoglykosidy

* Existuje více alelických variant u genotypově odlišných kmenů.

2.2.3.1. Rezistence k β -laktamovým antibiotikům

Rezistenci k β -laktamům způsobuje enzymatická inaktivace (β -laktamázy) nebo neenzymatické mechanismy, které ovlivňují permeabilitu membrány (změna exprese proteinů vnější membrány nebo aktivity efluxových systémů) či aktivitu proteinů PBP při syntéze buněčné stěny (Roca et al., 2012).

Chromozom *A. baumannii* nese geny pro dvě druhově specifické β -laktamázy, cefalosporinázu typu AmpC (Bou a Martinez, 2000), označovanou jako ADC, a oxacilinázu typu OXA-51 (Brown et al., 2005), jež u různých kmenů existují v řadě alelických variant (Zhao a Hu, 2012). ADC jsou β -laktamázy třídy C zodpovědné za rezistenci k penicilinům a cefalosporinům. Nejsou inducibilní a jejich exprese je přirozeně nízká. Pokud se však do promotorové oblasti genu pro ADC (bla_{ADC}) přesune mobilní element *ISAb_a1* nebo jiná inzerční sekvence se silným promotorem, exprese genu se zvýší a vzniká rezistence k původně účinným cefalosporinům, např. ceftazidimu (Héritier et al., 2006).

OXA-51 náleží do β -laktamáz třídy D, tzv. oxacilináz, jež typicky hydrolyzují oxacilin a některé oxyimino- β -laktamy, ale ne karbapenemy (Ambler, 1980). Oproti této definici však rodově specifické oxacilinázy acinetobakterů charakterizuje slabá karbapenemázová aktivita, byť obvykle nehydrolyzují širokospektré cefalosporiny ani aztreonam (Poirel a Nordmann, 2006). Podobně jako bla_{ADC} , je gen pro OXA-51 (bla_{OXA-51}) exprimován na nízké hladině. Přítomnost mobilního elementu *ISAb_a1* nebo *ISAb_a9* v promotorové oblasti genu však může zvýšit jeho expresi, což vede k snížení citlivosti ke karbapenemům (Turton et al., 2006).

Vedle chromozomální, druhově specifické OXA-51, bylo u *A. baumannii* nalezeno dalších pět fylogeneticky odlišných podskupin β -laktamáz třídy D, které nejsou součástí druhového genomu *A. baumannii*, ale mají jiný původ a šíří se horizontálně. Jde o skupiny označované podle prvních známých představitelů jako OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143 (Higgins et al., 2009) a OXA-235 (Higgins et al., 2013).

OXA-23 původně označená jako ARI-1 byla objevena již v roce 1985 (Paton et al., 1993). Enzym způsoboval rezistenci k penicilinům, cefalosporinům a imipenemu. Je první známou oxacilinázu s karbapenemázovou aktivitou, která byla navíc zachycena ještě před plošným zavedením karbapenemových antibiotik. Gen bla_{OXA-23} byl posléze detekován i po celém světě, nesený na chromozomu i plazmidech a asociovaný s mobilními genetickými elementy, především *ISAb_a1* (Mugnier et al., 2010). Původ genu pro OXA-23 byl zjištěn v chromozomu *Acinetobacter radioresistens* (Poirel et al., 2008) a rozšíření tohoto genu je dosud omezeno téměř výlučně na rod *Acinetobacter*.

Historicky druhou skupinou je OXA-24/40 původem ze Španělska (Bou et al., 2000). OXA-24 a OXA-40 byly považovány za různé enzymy, ale posléze se ukázalo, že jsou shodné. Geny kódující OXA-24/40 nebo jejich alelické varianty jsou nesený na chromozomu nebo plazmi-

dech a jsou rozšířené především na Pyrenejském poloostrově (Quinteira et al., 2007; Ruiz et al., 2007). OXA-58 byla objevena u francouzského izolátu *A. baumannii* z roku 2003 (Poirel et al., 2005). Gen *bla*_{OXA-58} je typicky umístěn na plazmidech, což pravděpodobně příčinou jeho celosvětového rozšíření (D'Arezzo et al., 2009; Gogou et al., 2011). Poslední dvě skupiny acinetobakterových oxacilináz s karbapenemázovou aktivitou byly objeveny u amerických izolátů *A. baumannii*: OXA-143 v Brazílii (Higgins et al., 2009) a OXA-235 v USA a Mexiku (Higgins et al., 2013).

Metalo- β -laktamázy (MBL) tvoří třídu B podle Amblera (1980). Mají široké substrátové spektrum - hydrolyzují všechny β -laktamy vyjma monobaktamů a aztreonamu. Pro svou hydrolytickou aktivitu vyžadují atomy zinku a jsou tudíž inhibovány EDTA. Oproti β -laktamázám třídy D mají 100–1000krát vyšší hydrolytickou aktivitu ke karbapenemům (Poirel a Nordman, 2006). Z dosud popsaných skupin byly u *A. baumannii* nalezeny MBL typu IMP, VIM, SIM a NDM, které s výjimkou NDM bývají součástí genových kazet v integronech třídy 1 (Houang et al., 2003; Tsakris et al., 2006). Nedávno objevená β -laktamáza NDM byla u *A. baumannii* poprvé zjištěna v roce 2010 (Karthikeyan et al., 2010) u izolátu z Indie, který obsahoval též geny *bla*_{OXA-23} a metylázu 16S rRNA typu ArmA způsobující rezistenci k aminoglykosidům. Další méně významné β -laktamázy nalezené v *A. baumannii* uvádí tabulka 1.

2.2.3.2. Rezistence k aminoglykosidům

Klinicky významná rezistence k aminoglykosidům u *A. baumannii* nejčastěji vzniká pomocí získaných enzymů modifikujících aminoglykosidy (AME) ze skupin acetyltransferáz (AAC), fosfotransferáz (APH) nebo nukleotidyltransferáz (ANT) (Shaw et al., 1993). Tyto enzymy modifikují hydroxylové skupiny (adenylace, fosforylace) nebo aminoskupiny (acetylace) molekul aminoglykosidů, což snižuje jejich afinitu k zásahovému místu na ribozomu. Jejich geny mohou být lokalizovány na chromozomu nebo na plazmidu a často tvoří genové kazety, jež jsou součástí integronů třídy 1 (Nemec et al., 2004b). Klasifikace AME je vedle typu enzymové aktivity založena na poloze modifikované skupiny v molekule aminoglykosidu a substrátovém spektru daného enzymu (Shaw et al., 1993). Příkladem je acetyltransferáza AAC(3)-I, která acetyluje aminoskupinu v poloze 3 prvního aminoglykosidového kruhu gentamicinu. Určitý typ AME modifikuje jenom určité aminoglykosidy a kvalitativně komplexní rezistenci lze dosáhnout pouze kombinací různých AME v téže bakteriální buňce (Nemec et

al., 2004b). Z tohoto hlediska efektivnější je enzym ArmA, který metyluje 16S rRNA a tím blokuje zásahové místo pro všechny aminoglykosidy používané v léčbě gramnegativních infekcí (Doi a Arakawa, 2007). Výsledkem je kvantitativně vysoká rezistence k těmto antibiotikům. Gen pro ArmA byl opakovaně prokázán u multirezistentních kmenů *A. baumannii*, a to často v kombinaci s genem pro OXA-23 (Kim et al., 2008; Karthikeyan et al., 2010).

2.2.4. Situace v České republice

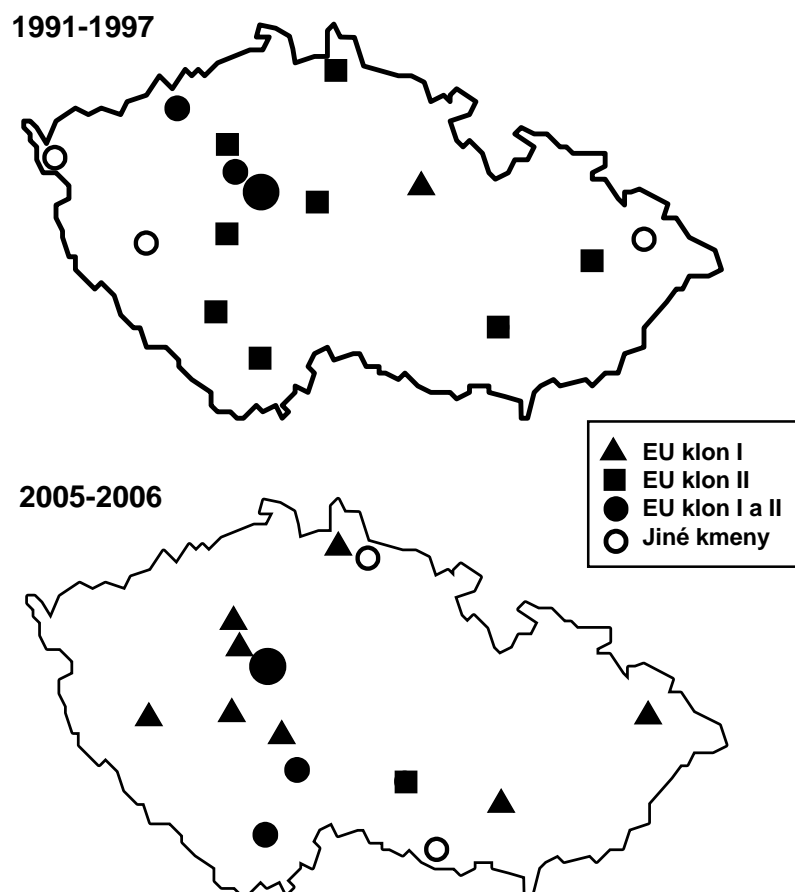
Problematice nemocničních izolátů acinetobakterů s důrazem na epidemiologii multirezistentních kmenů *A. baumannii* se v České republice věnovalo několik rozsáhlých studií realizovaných Laboratoří bakteriální genetiky ve Státním zdravotním ústavu v Praze. První z nich byla retrospektivní studie zaměřená na klinické izoláty komplexu *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* pocházející z let 1991–1997 ze 17 českých a moravských nemocnic. Pomocí ribotypizace bylo z celkem 103 izolátů identifikováno 77 jako *A. baumannii*, 14 jako *Acinetobacter pittii* (tehdy provizorně označený jako DNA skupina 3), 10 jako *Acinetobacter nosocomialis* (tehdejší DNA skupina 13TU) a jeden jako *A. calcoaceticus* (zbývající nezařazený izolát byl později identifikován jako *Acinetobacter seifertii*). Antibiotická multirezistence byla zjištěna pouze u izolátů *A. baumannii* a tyto multirezistentní izoláty patřily podle ribotypů a biochemických vlastností téměř výlučně do dvou skupin odpovídajících epidemickým klonům ECI a ECII popsáných Dijkshoorn et al. (1996). Podstatně početnější byla skupina typu ECI (37 izolátů oproti osmi izolátům odpovídajícím ECII), přičemž izoláty této skupiny byly zachyceny ve většině nemocnic zahrnutých ve studii. Navazující studie realizovaná ve spolupráci s kolegy z holandského Leidenu potvrdila pomocí metody AFLP shodu českých a západoevropských epidemických klonů (Nemec et al., 2004a). Práce z roku 1999 byla po studii Dijkshoorn et al. (1996) prvním dokladem o rozšíření ECI a ECII na území určitého státu.

Výše zmíněné studie prokázaly vysoký stupeň multirezistence našich izolátů, která v různé míře zahrnovala všechna testovaná antibiotika vyjma karbapenemů a netilmicinu. Situace se však změnila po roce 2000, kdy se začaly objevovat kmeny rezistentní ke karbapenemům, do té doby plně účinným lékům volby pro léčbu infekcí vyvolaných multirezistentním acinetobaktery. Tato nepříznivá změna iniciovala prospektivní, populačně genetickou a epidemiologickou studii zaměřenou na nemocniční kmeny acinetobakterů izolované v České republice letech 2005 a 2006 (Nemec et al., 2008). Studie zahrnovala 150 izolátů acinetobak-

terů, z nichž bylo 108 (72 %) identifikováno jako *A. baumannii*. Celkem 66 izolátů *A. baumannii* patřilo k ECII, zatímco do ECI bylo zařazeno pouze pět izolátů; zbývající izoláty byly vesměs genotypově unikátní. Rezistence ke karbapenemům (MIC \geq 8 mg/L) byla zjištěna u 23 izolátů, z toho 20 patřilo do ECII. Rezistentní izoláty a většina izolátů se sníženou citlivostí (MIC ke karbapenemům 2–4 mg/l) nesly geny spojené s karbapenemázovou aktivitou (*bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-24-like} nebo přítomnost *ISAbal* v promotoru *bla*_{OXA-51-like}), které chyběly u plně citlivých izolátů.

Výsledky obou výše zmíněných studií z let 1991–1997 a 2005–2006 jsou s ohledem na distribuci epidemických klonů a původ izolátů porovnány na obr. 1. Zatímco v první studii dominoval ECI, ve druhé studii dominoval ECII. Tento posun v populační struktuře byl spojen s objevením se snížené citlivosti a rezistence ke karbapenemům, na níž se pravděpodobně podílela zvláště nadprodukce chromozomální β -laktamázy typu OXA-51 u kmenů ECII. Tyto studie též ukázaly výraznou variabilitu ve fenotypech a genotypech rezistence k testovaným antibiotikům u izolátů téhož epidemického klonu. Tato variabilita byla zaznamenána především u izolátů ECII v druhé studii, a to navzdory jejich vysoké podobnosti v genotypech (AFLP a makrorestrikční profily). U těchto izolátů bylo zjištěno 21 profilů citlivosti a 17 kombinací genů rezistence. Lze předpokládat, že na tomto jevu se podílí schopnost kmenů ECII efektivně získávat genetické determinanty rezistence horizontálním přenosem nebo jejich genetická nestabilita (Nemec et al., 2008).

Třetí a dosud poslední studie se zaměřila na extenzivně rezistentní izoláty *A. baumannii* zachycené od června 2015 do května 2016 (Radolfová-Křížová et al., 2016). Tato studie byla iniciována záchytem kmene *A. baumannii* s vysokou kvantitativní rezistencí ke všem klinicky využitelným antibiotikům (vyjma kolistinu) v nemocnici v Pardubicích v červnu 2015. V následujících 11 měsících byly zachyceny další 22 klinické izoláty s podobným fenotypem rezistence v šesti českých a moravských nemocnicích. Protože šlo o nový fenotyp rezistence, který nebyl dosud v České republice zaznamenán, byla provedena podrobná analýza, která ukázala, že všechny zmíněné izoláty nesly gen (*armA*) pro metylázu typu ArmA zodpovědnou za rezistenci ke všem klinicky využitelným aminoglykosidům a gen (*bla*_{OXA-23}) pro karbapenemázu typu OXA-23, jež způsobuje kvantitativně vysokou rezistenci ke karbapenemům a dalším β -laktamům. Analýza dvou izolátů pomocí celogenomové sekvenace pak prokázala *ISAbal* v promotoru *bla*_{OXA-23} a gen *armA* lokalizovala v transpozonu Tn1548 uloženém na



Obr. 1. Porovnání výsledků studií zaměřených na nemocniční kmeny *A. baumannii* provedených Laboratoří bakteriální genetiky v SZÚ. Nahoře jsou výsledky pro izoláty z let 1991–1997 (Nemec et al., 1999), dole pak výsledky pro roky 2005–2006 (Nemec et al., 2008). Obrázek je převzat z Nemec (2008).

plazmidu. Všechny 23 izolátů patřilo do ECII a několika subtypů podle makrorestrikčních profilů, které odpovídaly místům izolace. Skupiny místně specifických kmenů se navíc vzájemně lišily přítomností dalších genů rezistence, např. genu pro β -laktamázu TEM-1, karbapenemázu OXA-58 nebo fosfotransferázy APH(3')-I a APH(3')-VI. To potvrzuje výše zmíněnou genetickou variabilitu ECII.

Pro úplnost nutno zmínit i menší studie realizované Laboratoří bakteriální genetiky, které prokázaly výskyt neobvyklých genotypů rezistence v českých nemocnicích. Šlo o kmen *A. baumannii* ECI, který nesl karbapenemázu typu NDM-1 a jenž byl importován s pacientem repatriovaným z egyptské Hurghady v roce 2011 (Nemec a Krizova, 2012). Dále pak o kmen ECII nesoucí β -laktamázy PER-1 a OXA-23 (Křížová et al., 2012) zachycený v Hradci Králové.

V obou těchto případech však šlo pouze o lokální výskyt, aniž by bylo zaznamenáno další šíření kmenů s uvedenými genotypy rezistence.

3. CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo definovat aktuální populaci multirezistentních kmenů *A. baumannii* v České republice ve smyslu populačně-genetických vlastností, epidemiologie a povahy rezistence k antibiotikům. Práce navazuje na předchozí studie Laboratoře bakteriální genetiky Státního zdravotního ústavu v Praze a zaměřuje se na dosud nezpracované bakteriální izoláty z období od konce roku 2016. Reaguje na výskyt extenzivně-rezistentních kmenů náležejících do globálního epidemického klonu ECII, které jsou charakterizovány kvantitativně vysokou rezistencí ke všem klinicky využitelným antibiotikům vyjma polymyxinů a nesou geny pro karbapenemázu OXA-23 a metylázu ArmA. Tyto kmeny byly v Čechách poprvé zachyceny v roce 2015, aby se záhy objevily v několika českých a moravských nemocnicích. Práce tak řeší z lékařského hlediska vysoce významné téma problematiky epidemiologie multirezistentních původců nemocničních infekcí, zaměřujíc se na mikroorganismus, který WHO v současnosti klasifikuje jako nejproblematictější nemocniční patogen ohledně rizika selhání konvenční antimikrobní terapie.

Dílčí cíle:

1. Určení populačně genetických vlastností, citlivosti ke klinicky využitelným antimikrobním látkám a mechanismů rezistence k antibiotikům ze skupiny karbapenemů a aminoglykosidů u multirezistentních izolátů *A. baumannii* získaných Laboratoří bakteriální genetiky z klinických pracovišť od října 2016.
2. Klasifikace izolátů do genotypově definovaných skupin a posouzení možných epidemiologických souvislostí uvnitř těchto skupin.
3. Posouzení epidemiologické situace ve smyslu výskytu a šíření multirezistentních kmenů *A. baumannii* v Oblastní nemoci Příbram a přilehlých zdravotnických zařízeních.
4. Vyhodnotit situaci ohledně aktuálního výskytu extenzivně rezistentních kmenů nesoucích geny pro OXA-23 a ArmA.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Vyšetření citlivosti k antibiotikům

4.1.1. Antibiotika a referenční kmeny

Antibiotika byla vybrána podle doporučení autorů Maqiorakos et al. (2012). Jde o látky, které jsou primárně účinné na plně citlivé kmeny *A. baumannii*, tj. kmeny bez získané (druhotné) rezistence. Výjimkou (z důvodu porovnatelnosti s archivními údaji Laboratoře bakteriální genetiky) bylo použití piperacilinu namísto piperacilinu s tazobaktamem a ofloxacinu namísto ciprofloxacinu. Antibiotika použitá v difuzním diskovém testu uvádí tabulka 2. Navíc byl zařazen kolistin, pro který byla z důvodu nespolehlivosti difuzního testu použita mikrodiluční metoda (viz kapitola 4.1.4). Pro kontrolu metodického postupu při určení citlivosti jsme použili standardní referenční kmeny *Escherichia coli* ATCC 25922 a *P. aeruginosa* ATCC 27853, pro něž jsou známé hodnoty citlivosti (CLSI 2011), a jako dodatečný kontrolní kmen *A. baumannii* NIPH 56.

Tabulka 2. Antibiotika použitá v difuzním diskovém testu a hraniční hodnoty citlivosti a rezistence.

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

* Kategorie rezistentní, citlivý a intermediárně citlivý (hodnoty mezi údaji v tabulce) podle doporučení CLSI (2011) pro *Acinetobacter* spp. vyjma ofloxacinu a trimethoprim/sulfamethoxazolu, pro něž byly použity hodnoty pro *Enterobacteriaceae* (CLSI 2011) a piperacilinu a netilmicinu s hodnotami používanými Laboratoří bakteriální genetiky.

4.1.2. Difuzní diskový test

Je založen na difuzi molekul antibiotika v agarové půdě a následné inhibici růstu bakteriální kultury (CLSI 2011). Pro metodu jsme použili disky s antibiotiky od firmy Oxoid. Z dvacetihodinové bakteriální kultury narostlé na krevním agaru (Oxoid) při 30 °C jsme sterilní kličkou odebrali dvě nebo tři morfologicky typické kolonie a připravili z nich suspenzi ve 4,5 ml fyziologického roztoku. Suspenze odpovídala zákalu 0,5 podle McFarlandovy zákalové stupnice. Suspenzi jsme 100× naředili fyziologickým roztokem. Připravené plotny s Mueller-Hintonovým agarem (Oxoid) jsme přelili 2 ml naředěné bakteriální suspenze a přebytečnou tekutinu odsáli. Po několika minutách jsme pomocí dispenzoru (Oxoid) umístili na plotny antibiotické disky. Plotny jsme inkubovali 20 h při 35 °C a výsledné inhibiční zóny změřili posuvným měřítkem.

4.1.3. Mikrodiluční metoda

Jde o referenční metodu pro vyšetření citlivosti ke kolistinu, u něhož vzhledem k velikosti jeho molekuly a nedostatečné difuzi v agaru nelze použít difuzní diskový test. Metoda se provádí v mikrotitračních destičkách, jejichž jamky obsahují 100 µl Mueller-Hintonova bujónu (Oxoid) s dvojnásobně rostoucí koncentrací kolistinu (v rozmezí 0,125–16 µg/ml). Kontrolní jamky bez kolistinu slouží pro kontrolu růstu. Připravené a při -20 °C skladované destičky jsme temperovali při laboratorní teplotě a poté očkovali bakteriální suspenzí připravenou podle kapitoly 4.1.2 (0,75 µl suspenze na jamku). Destičky se inkubovaly 20 h při 35 °C. Hodnotu MIC jsme odečítali jako nejnižší koncentraci antibiotika, při které nedošlo k viditelnému růstu. Za citlivé byly považovány kmeny s hodnotou MIC ≤2 µg/ml (CLSI 2011).

4.2. Identifikace pomocí MALDI-TOF MS

Jako první krok pro rodovou a druhovou identifikaci bakteriálních izolátů jsme použili metodu založenou na hmotnostní spektrometrii typu MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*). Principem identifikace je porovnání naměřených celobuněčných hmotnostních spekter s identifikační databází, která obsahuje referenční spektra pro známé druhy bakterií (Freiwald & Sauer 2009). Použili jsme přístrojové (Microflex LT) a programové (BioTyper verze 3.1) vybavení firmy Bruker Daltonics a postupovali podle in-

strukcí výrobce. Dvacetihodinovou bakteriální kulturu narostlou na krevním agaru (Oxoid) při 30 °C jsme nanесли na ocelovou analytickou destičku a převrstvili 1 µl roztoku matrice (saturovaný roztok kyseliny α-kyano-4-hydroxyskořicové (Bruker Daltonics) v prostředí roztoku acetonitrilu/H₂O/kyseliny trifluoroctové (Sigma-Aldrich) v objemovém poměru 50/47,5/2,5). Po zaschnutí jsme destičku umístili do komory analyzátoru Microflex LT a postupovali podle protokolu pro automatické měření. Výsledná identifikační skóre jsme interpretovali v souladu s kritérii doporučenými výrobcem.

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

K potvrzení příslušnosti izolátů k *A. baumannii* jsme využili postup založený na faktu, že tento druh nese druhově specifickou, chromozomální β-laktamázu typu OXA-51 (Turton et al., 2006). K průkazu genu pro OXA-51 (*bla*_{OXA-51}) jsme použili konvenční PCR s templátovou DNA připravenou alkalickou lýzí bakteriálních buněk a primery OXA-51F (5' TAATGCTTTGATCGGCCTTG 3') a OXA-51R (5' TGGATTGCACTTCATCTTGG 3'). Bakteriální izoláty uchovávané v bujónu s 50% glycerolem při -80 °C jsme vyočkovali na Mueller-Hintonův agar (Oxoid) a inkubovali 20 h při 30 °C. Do mikrozkuvek o objemu 2 ml jsme přenesli 20 µl lyzujícího roztoku [0,25% (w/v) SDS, 0,05 N hydroxid sodný, H₂O], v němž jsme pomocí sterilní plastové kličky homogenizovali jednu bakteriální kolonii. Suspenzi jsme inkubovali 15 min při 95 °C, krátce centrifugovali při 13 250x g (MIKRO 120, Hettich) a přidali k ní 180 µl H₂O pro molekulární biologii (Sigma-Aldrich). Směs jsme promíchali na stolní třepačce a centrifugovali 5 min při 13 250x g. Supernatant (uchovávan při -20 °C) jsme použili jako zdroj templátové DNA pro PCR. Reakční směs pro jeden vzorek o celkovém objemu 20 µl obsahovala 10 µl komerčního mixu (*Taq* PCR Master Mix Kit, Qiagen), 6,4 µl H₂O pro molekulární analýzu (Sigma-Aldrich), 1 µl 25 nM MgCl₂, 1,6 µl roztoku primerů (2,5 µM) a 1 µl roztoku templátové DNA. PCR probíhala v cykleru (Sensoquest) s těmito parametry: iniciální denaturace 3 min při 94 °C, 34 cyklů (denaturace 50 s při 94 °C, annealing 30 s při 60 °C a elongace 2 min při 72 °C) a terminální elongace 7 min při 72 °C. Očekávaná velikost výsledného amplikonu byla 353 bp.

Výsledek PCR byl analyzován konvenční elektroforetickou separací při použití jednosměrného konstantního napětí. Separace fragmentů DNA probíhala v 1,8% (w/v) agarózovém gelu, který jsme připravili smísením 2,16 g agarózy (Serva) se 120 ml elektroforetického pufru TBE [kyselina boritá (5,5 g/l), Tris (10,8 g/l), EDTA (5,9 g/l), H₂O, pH 8,0], následným

považením a vylitím do elektroforetické formy s hřebenem. Vzorek jsme připravili smícháním 15 µl produktu PCR s 3 µl elektroforetické barvičky (6× DNA Loading Dye, Fermentas). Na první pozici gelu jsme umístili 3,5 µl molekulového standardu (GeneRuler 100 bp Plus, Fermentas). Elektroforetická separace probíhala 90 min při 110 V. Poté jsme gel barvili v roztoku ethidium bromidu, promyli v H₂O a fotografovali zařízením DOC-PRINT VX5 (Vilber Lourmat).

4.4. Identifikace epidemických klonů ECI a ECII pomocí multiplexové PCR

Pro identifikaci dvou hlavních epidemických klonů jsme použili metodu multiplexové PCR podle Turton et al. (2007). Jde o dvě multiplexové sestavy, z nich každá zahrnuje kombinaci primerů pro detekci tří chromozomálních genů (*ompA*, *csuE*, *bla_{OXA-51}*), které jsou specifické pro jejich alelické varianty u příslušného epidemického klonu (tabulka 3). Příprava templátové DNA a reakční směsi pro PCR a program pro PCR byly stejné jako v kapitole 4.3 s výjimkou teploty pro annealing, která byla 52 °C. Separace amplikonů byla provedena elektroforézou v 1,5% (w/v) agarózovém (Serva) gelu při 110 V po dobu 90 min.

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

Klon	Gen	Sekvence	Orientace	Amplikon	Pozitivní kontrola
ECII	<i>ompA</i>	GATGGCGTAAATCGTGGTA	F	355 bp	ANC 4097
		CAACTTTAGCGATTTCTGG	R		
	<i>csuE</i>	CAACTTTAGCGATTTCTGG	F	702 bp	
		TACACCCGGGTTAATCGT	R		
	<i>bla_{OXA-51}</i>	GCGCTTCAAAATCTGATGTA	F	559 bp	
		GCGTATATTTGTTCCATTC	R		
ECI	<i>ompA</i>	GACCTTTCTTATCACAACGA	F	343 bp	ANC 4355
		CAACTTTAGCGATTTCTGG	R		
	<i>csuE</i>	GGCGAACATGACCTATTT	F	580 bp	
		CTTCATGGCTCGTTGGTT	R		
	<i>bla_{OXA-51}</i>	CATCAAGGTCAAACCAA	F	162 bp	
		TAGCCTTTTTCCCATC	R		

4.5. Epidemiologická genotypizace pomocí makrorestrikční analýzy

Jde o zlatý standard fingerprintových metod pro epidemiologickou genotypizaci bakteriálních izolátů (Tenover et al., 1995). Je založena na štěpení genomové DNA pomocí endonukleáz generujících malý počet relativně velkých (>20 kb) restričních fragmentů DNA a jejich následné elektroforetické separaci v pulzním elektrickém poli. Metodiku jsme převzali z předchozí diplomové práce realizované na řešitelském pracovišti (Kladivová, 2014).

Příprava agarových disků. Z bakteriální kultury na Mueller-Hintonově agaru (kultivace 24 h při 30 °C) jsme do mikrozkušavky (1,5 ml) odebrali kličkou biomasu o hmotnosti 10 mg, kterou jsme homogenizovali v 0,5 ml roztoku PIV [NaCl (58,4 g/l), Tris (1,2 g/l), H₂O, pH 7,6] pomocí stolní míchačky a poté centrifugovali 2 min při 13 250x g (centrifuga Universal 320R, Hettich). Odstranili jsme supernatant a resuspendovali pelet v 200 µl PIV. Do mikrozkušavky s 1 200 µl PIV jsme přidali 12 µl vzorku, homogenizovali, roztok přenesli do kyvety a změřili optickou denzitu na spektrofotometru (Shimadzu UV1800). Suspenzi jsme naředili roztokem PIV, jehož potřebné množství v µl jsme vypočítali podle vzorce $(200 \times OD/0,15) - 200$. Z naředěné suspenze jsme odebrali 150 µl do mikrozkušavky a inkubovali 10 min při 42 °C v termobloku. Připravili jsme si 1,5% (w/v) agarózu s nízkým bodem tání (Low Melting Agarose, Bio-Rad) v PIV v množství 150 µl na vzorek a inkubovali ji při 50 °C. Agarózu jsme přidali ke vzorku, směs pečlivě promíchali a rozplnili do formiček na bločky, které jsme umístili na 15 min do 10 °C.

Lýza DNA. Do uzavíratelné plastové zkušavky o objemu 15 ml jsme napipetovali 1 ml lyzujícího roztoku EC [Tris (7,3 g/l), NaCl (0,06 g/l), EDTA (29,2 g/l), Brij 58 (5 g/l), deoxycholát (2 g/l), sarkosyl (5 g/l), H₂O, pH 7,6], přidali 5 µl lysozymu (0,2 g/l, Sigma-Aldrich) a 5 µl RNázy (0,01 g/l, Sigma-Aldrich), přemístili tam agarózové bločky a vše inkubovali 5 h ve vodní lázni při 37 °C. Poté jsme přes gázu slili lyzující roztok, přidali 1 ml roztoku ES [EDTA (146,1 g/l), sarkosyl (1 g/l), H₂O, pH 9,0–9,5] a proteinázu K (0,01 g/l, Sigma) a inkubovali při 50 °C přes noc (nejméně 17 h). Ráno jsme nechali zkušavky zchladnout 10 min při 10 °C, roztok ESP slili přes gázu a přidali 13 ml pufru TE [Tris (1,21 g/l), EDTA (0,29 g/l), H₂O, pH 7,5]. Bločky jsme pětkrát po 30 min promyli na kývací třepačce, přenesli do mikrozkušavek s 1 ml TE a uchovávali při 4 °C.

Restriční štěpení DNA. Na Petriho misku jsme položily agarózový bloček s DNA a odřízly z něj tenký proužek. Pomocí krycího sklíčka jsme proužek přenesli do mikrozkušavky obsa-

hující 100 µl restriční směsi s endonukleázou Apal (New England Biolabs) a směs inkubovali 2 h při 25 °C. Standard molekulových hmotností pro PFGE (Lambda Ladder 48,5 bp, Bio-Rad) jsme inkubovali 2 h při 37 °C v 1 ml TE.

Elektroforéza v pulzním elektrickém poli (PFGE). Pro PFGE jsme použili CHEF-DR III System (Bio-Rad). Připravili jsme 1 % agarózu SeaKem LE (Bio-Rad) a ponechali ji ve vodní lázni při 50 °C. Do elektroforetické vany jsme dali 2 000 ml 0,5× koncentrovaného pufru TBE [kyselina boritá (5,5 g/l), Tris (10,8 g/l), EDTA (5,9 g/l), H₂O, pH 8,0] a nastavili teplotu na 14 °C. Proužky s naštěpenou DNA a standard molekulových hmotností jsme umístili na elektroforetický hřeben a nechali 20 min přilnout. Poté jsme hřeben položili do formy na gel a zalili temperovanou agarózou. Po ztuhnutí gelu jsme hřeben vyjmuli a vzniklé jamky zalili zbylou agarózou. Gel jsme umístili do elektroforetické vany a spustili zařízení. Parametry PFGE byly následující: časové rozmezí změn směru elektrického pole 5–20 s, napětí 6 V/cm, úhel mezi směry elektrického pole 120 °C, teplota 14 °C a celkový čas 19 h. Po skončení PFGE jsme gel barvili v roztoku ethidium bromidu po dobu 45 min a poté 30 min odbarvovali v destilované vodě. Gel jsme fotografovali na zařízení DOC-PRINT VX5 (Vilber Lourmat). Při hodnocení vzájemné podobnosti výsledných restričních profilů smyslu jejich pravděpodobné epidemiologické příbuznosti jsme se řídili doporučením autorů Tenover et al. (1995).

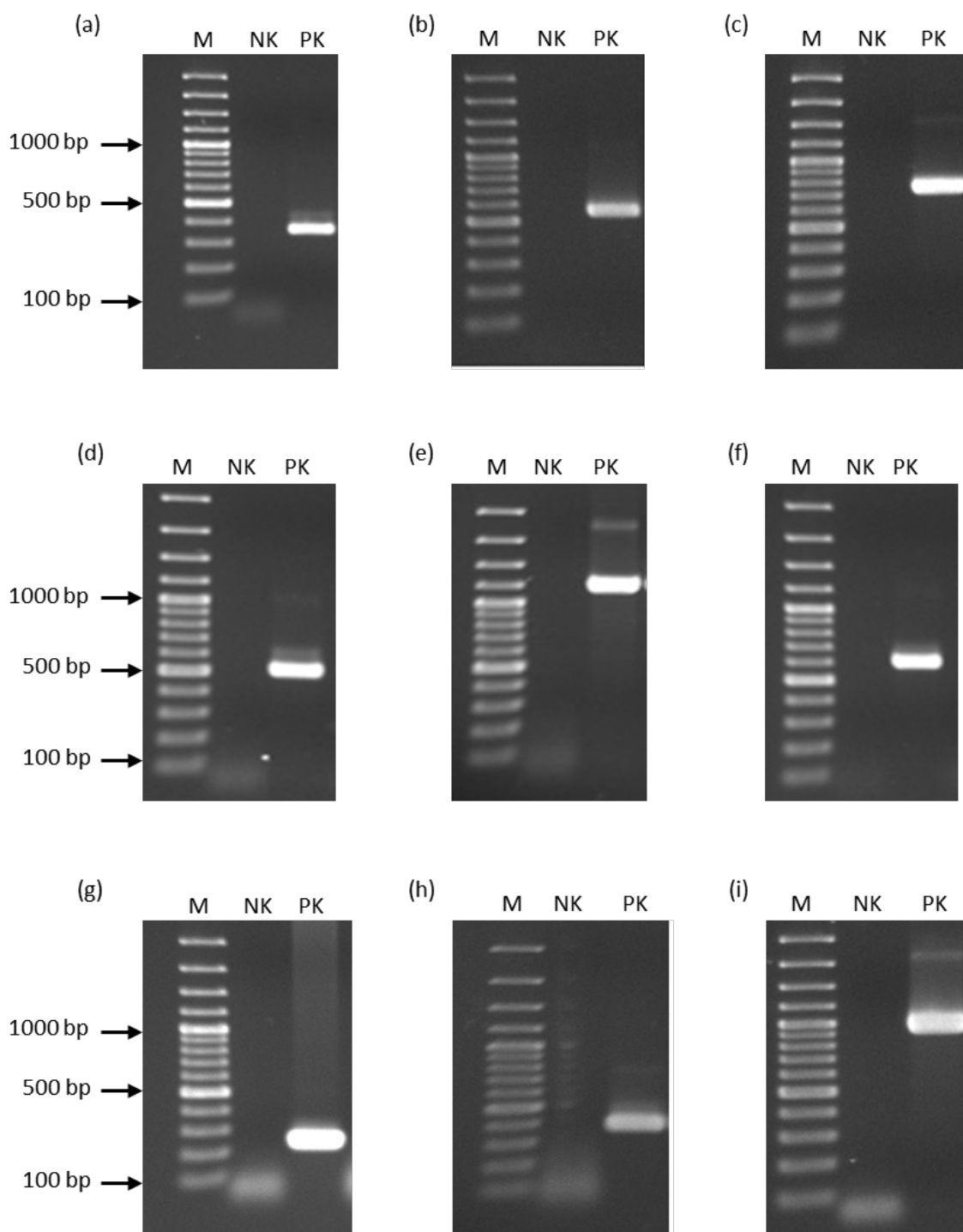
4.6. Průkaz genů rezistence pomocí PCR

Tabulka 4 uvádí seznam genů spojených s rezistencí k β-laktamům a aminoglykosidům, jejichž přítomnost jsme u studovaných izolátů vyšetřili pomocí konvenční PCR. Tabulka uvádí sekvence primerů pro jednotlivé geny a genetické struktury (vazba *ISAb_{a1}* a přilehlých genů *bla_{OXA-51}* nebo *bla_{ADC}*), velikost výsledných ampliconů a pozitivní kontroly, tj. kmeny nesoucí příslušný gen či genetickou strukturu. Uvedeny jsou též metodické odlišnosti od postupu pro PCR uvedeného v kapitole 4.3. Obr. 2 pak ukazuje výsledek PCR pro referenční kmeny (pozitivní kontroly uvedené v tabulce 4), které nesou příslušné geny a genetické struktury.

Tabulka 4. Primery a podmínky PCR pro detekci genů rezistence*.

Gen	Sekvence primeru	Orientace	Amplikon (bp)	Annealing (°C)	Pozitivní kontrola (kmen č.)
<i>ISAb_{a1}</i>	CACGAATGCAGAAGTTG	F	550	58	NIPH 2540
	CGACGAATACTATGACAC	R			
<i>ISAb_{a1+}</i> <i>bla_{ADC}</i>	GTTGCACTTGGTCGAATGAAAA	F	751	50	NIPH 2540
	ACGTCGCGAGTTGAAGTAAGTT	R			
<i>ISAb_{a1+}</i> <i>bla_{OXA-51}</i>	CACGAATGCAGAAGTTG	F	1300	52	NIPH 2650
	TGGATTGCACTTCATCTTGG	R			
<i>bla_{TEM-1}</i>	GGGAATTCTCGGGGAAATGTGCGCGGAAC	F	998	54	NIPH 2514
	GGGATCCGAGTAACTTGGTCTGACAG	R			
<i>bla_{OXA-23}</i>	GATCGGATTGGAGAACCAGA	F	501	53	NIPH 2522
	ATTTCTGACCGCATTTCCAT	R			
<i>bla_{OXA-24/40}</i>	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	F	249	57	NIPH 2980
	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	R			
<i>bla_{OXA-58}</i>	TTTTATCAAATCCAATCGGC	F	900	50	ANC 4131
	TTATAAATAATGAAAAACACC	R			
<i>bla_{PER-1}</i>	ATGAATGTCATTATAAAAAG	F	1000	46	Není
	TTGGGCTTAGGGCAG	R			
<i>bla_{NDM}</i>	TTGCCAATATTATGCACCCG	F	805	44	ANC 4114
	AGCGCAGCTTGTCGGCCAT	R			
<i>bla_{IMP}</i>	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	F	470	45	ANC 3428
	CCAAACYACTASGTTATCT	R			
<i>bla_{VIM}</i>	TTTGGTCGCATATCGCAACG	F	450	45	ANC 3543
	CCATTCAGCCAGATCGGCAT	R			
<i>bla_{GIM}</i>	TCGACACACCTTGGTCTGA	F	477	50	ANC 4116
	AACTTCCAACCTTGCCATGC	R			
<i>armA</i>	AGTTGTTTTCCATTCTGAG	F	590	44	ANC 5452
	TCTCTTCCATTCCCTTCTCC	R			
<i>aacC1</i>	GACATAAGCCTGTTTCGGTT	F	372	55	NIPH 281
	CTCCGAACTCACGACCGA	R			
<i>aacC2</i>	ATGCATACGCGGAAGGC	F	822	46	NIPH 1651
	TGCTGGCACGATCGGAG	R			
<i>aacA4</i>	TATGAGTGGCTAAATCGAT	F	395	50	NIPH 533
	CCCCTTTCTCGTAGCA	R			
<i>aphA1</i>	CGAGCATCAAATGAACTGC	F	623	56	NIPH 281
	GCGTTGCCAATGATGTTACAG	R			
<i>aphA6</i>	ATACAGAGACCACCATACAGT	F	235	50	NIPH 281
	GGACAATCAATAATAGCAAT	R			
<i>aadB</i>	ATCTGCCGCTCTGGAT	F	404	55	NIPH 281
	CGAGCCTGTAGGACT	R			

* MgCl₂ bylo přidáno všude vyjma *bla_{TEM-1}*; u *armA* byl do PCR směsi přidán 1 µl DMSO (namísto 1 µl H₂O).



Obr. 2. Výsledky PCR detekce genetických determinantů rezistence u kontrolních referenčních kmenů *A. baumannii* obsahujících následující geny a genetické struktury (viz kapitola 4.3 a tabulka 4): (a) *bla*_{OXA-51}, (b) *ISAbal*, (c) *ISAbal-bla*_{ADC}, (d) *bla*_{OXA-23}, (e) *ISAbal-bla*_{OXA-51}, (f) *armA*, (g) *aphA6*, (h) *aacC1*, (i) *bla*_{TEM-1}. M, standard molekulových hmotností (GeneRuler 100 bp Plus, Fermentas); NK, negativní kontrola; PK, pozitivní kontrola. Agarózová elektroforéza byla provedena podle kapitoly 4.3.

5. VÝSLEDKY

5.1. Výběr izolátů

Do studie byly zahrnuty multirezistentní izoláty *A. baumannii*, které byly zachyceny ve zdravotnických zařízeních ve Středních Čechách včetně Prahy v období od října 2016 do května 2018. Tyto organizmy byly vybrány ze všech izolátů acinetobakterů zaslaných do Laboratoře bakteriální genetiky z terénních mikrobiologických laboratoří, které byly předběžně zařazeny do *A. baumannii* a jež současně splňovaly kritérium multirezistence, tj. byly rezistentní alespoň k jedné látce z nejméně tří testovaných antibiotických tříd (kapitola 4.1.1, Maqiorakos et al., 2012). Z celkem cca 200 izolátů získaných v uvedeném období bylo pro konečný studijní soubor vybráno 55 izolátů. Studijní soubor navíc zahrnoval tři referenční izoláty (5190, 5452 a 5494) převzaté z předchozí studie řešitelského pracoviště (Radolfová-Křížová et al., 2016). Tyto izoláty patří k nové české populaci ECII nesoucí geny pro *armA* a *bla_{OXA-23}* a reprezentují nečastější makrorestrikční profily DNA zjištěné u této populace.

Původ a další epidemiologické údaje 58 studovaných izolátů shrnuje tabulka 5. Z důvodu ochrany citlivých dat nejsou uvedeny přesné názvy a umístění zdravotnických zařízení ani identita pacientů. Výjimkou, k níž svolilo vedení Oblastní nemocnice Příbram, jsou pracoviště této nemocnice, odtud zároveň pochází nejvíce izolátů. Jde o chirurgické oddělení (18 izolátů), chirurgickou ambulanci (dva izoláty), interní oddělení a ARO (po jednom izolátu). Dalších osm izolátů bylo zasláno ze dvou chirurgických ambulančí na Příbramsku a tři izoláty z jiné nemocnice ve Středočeském kraji. Zbývajících 20 izolátů pocházelo z oddělení intenzivní péče tří pražských nemocnic. Kromě dvou izolátů z nemocničního prostředí šlo o klinické izoláty od hospitalizovaných nebo ambulantních pacientů. Klinické izoláty pak pocházely od různých pacientů vyjma dvou dvojic a jedné trojice konsektivních izolátů od tří pacientů (tabulka 5). Mezi druhy klinického materiálu převažovaly stěry z kožní léze, rány nebo bércového vředu (n=30). Následoval aspirát (n=8), krev nebo krevní katétr (n=7), moč (n=6) a výtěr z krku (n=2); po jednom vzorku bylo z obsahu drénu, stěru z dekubitu a okolí katétru.

Tabulka 5. Epidemiologické údaje studovaných izolátů *A. baumannii*.

Izolát	Vzorek*	Zařízení	Oddělení†	Materiál	Datum odběru
5190‡	1	Nemocnice Pardubice	Kardiologie	Aspirát	15.6.2015
5452‡	2	Nemocnice Ostrava	ARO JIP	Moč	3.8.2015
5494‡	3	Nemocnice Praha 1	Urologie	Moč	9.5.2016
5586	4	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie	Stěr z kožní léze	17.10.2016
5649	5	Nemocnice Praha 1	Infekce JIP	Aspirát	1.12.2016
5650	6	Nemocnice Praha 1	Infekce JIP	Aspirát	5.12.2016
5651	7	Nemocnice Praha 1	Infekce JIP	Aspirát	5.12.2016
5652	8	Nemocnice Praha 1	Infekce JIP	Výtěr krk	8.12.2016
5653	9	Nemocnice Praha 1	Infekce JIP	Stěr z prostředí	19.12.2016
5654	10	Nemocnice Praha 1	Infekce JIP	Stěr z prostředí	19.12.2016
5658	11	Nemocnice Praha 1	Infekce JIP	Aspirát	10.1.2017
5665	12	Nemocnice Praha 1	Infekce JIP	Obsah drénu	27.1.2017
5666	13	Nemocnice Praha 1	Infekce JIP	Aspirát	27.1.2017
5667	14	Nemocnice Praha 1	Infekce JIP	Aspirát	27.1.2017
5668	15	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie	Stěr z kožní léze	30.1.2017
5672	16 (A)	Ambulance 1 (Příbramsko)	Chirurgie amb.	Stěr z kožní léze	10.2.2017
5674	17	Nemocnice Praha 1	Chirurgie JIP	Stěr z kožní léze	21.2.2017
5675	18	Nemocnice Praha 1	Chirurgie JIP	Aspirát	21.2.2017
5676	19	Nemocnice Praha 1	Chirurgie JIP	Výtěr krku	16.2.2017
5677	20 (B)	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie	Stěr z kožní léze	21.2.2017
5683	21 (B)	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie	Stěr z kožní léze	6.3.2017
5687	22 (A)	Ambulance 1 (Příbramsko)	Chirurgie amb.	Stěr z kožní léze	13.3.2017
5689	23	Ambulance 1 (Příbramsko)	Chirurgie amb.	Stěr z kožní léze	24.3.2017
5697	24	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie amb.	Stěr z kožní léze	24.4.2017
5699	25 (C)	Ambulance 1 (Příbramsko)	Chirurgie amb.	Stěr z vředu	26.4.2017
5700	26	Ambulance 2 (Příbram)	Chirurgie amb.	Stěr z vředu	3.5.2017
5703	27	Nemocnice Praha 2	ARO	Stěr z rány	12.5.2017
5704	28 (A)	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie amb.	Stěr z kožní léze	23.5.2017
5706	29	Nemocnice Praha 2	ARO	Moč	24.5.2017
5707	30	Nemocnice Praha 2	ARO	Moč	29.5.2017
5710	31	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie	Stěr z kožní léze	3.7.2017
5711	32	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie	Stěr z rány	3.7.2017
5714	33	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie	Stěr z dekubitu	30.6.2017
5721	34 (C)	Ambulance 1 (Příbramsko)	Chirurgie amb.	Stěr z vředu	19.7.2017
5722	35	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie	Stěr z kožní léze	20.7.2017
5723	36	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie	Stěr z kožní léze	17.7.2017
5726	37	Oblastní nemocnice Příbram	Interna	Moč	20.7.2017
5727	38	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie	Stěr z kožní léze	19.7.2017
5729	39	Ambulance 1 (Příbramsko)	Chirurgie amb.	Stěr z rány	31.7.2017
5740	40	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie	Stěr z kožní léze	14.8.2017
5761	41	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie amb.	Stěr z kožní léze	26.10.2017
5763	42	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie	Stěr z kožní léze	27.10.2017
5769	43	Nemocnice (Středočeský kraj)	JIP	Katétr	6.11.2017
5770	44	Nemocnice (Středočeský kraj)	ARO	Katétr	7.11.2017
5771	45	Nemocnice (Středočeský kraj)	Interna	Katétr	14.11.2017
5774	46	Oblastní nemocnice Příbram	Interna	Stěr z vředu	4.12.2017
5776	47	Oblastní nemocnice Příbram	ARO	Stěr z okolí katétru	1.12.2017
5781	48	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie	Stěr z kožní léze	2.1.2018
5784	49	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie	Moč	5.1.2018
5808	50	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie	Stěr z kožní léze	15.2.2018
5810	51	Ambulance 1 (Příbramsko)	Chirurgie amb.	Stěr z rány	16.2.2018
5812	52	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie	Stěr z kožní léze	21.2.2018
5815	53	Nemocnice Praha 3	JIP	Krev	4.3.2018
5818	54	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie	Stěr z kožní léze	14.3.2018
5820	55	Oblastní nemocnice Příbram	Chirurgie	Stěr z rány	13.3.2018
5855	56	Nemocnice Praha 3	JIP	Krev	21.4.2018
5860	57	Nemocnice Praha 3	JIP	Krev	2.5.2018
5863	58	Nemocnice Praha 3	JIP	Krev	5.5.2018

* Vzorky od téhož pacienty jsou označeny shodným písmenem.

† JIP, jednotka intenzivní péče; ARO, anesteziologicko-resuscitační oddělení; amb., ambulance.

‡ Referenční izoláty nesoucí geny *armA* a *bla_{OXA-23}* převzaté ze studie autorů Radolfová-Křížová et al. (2016).

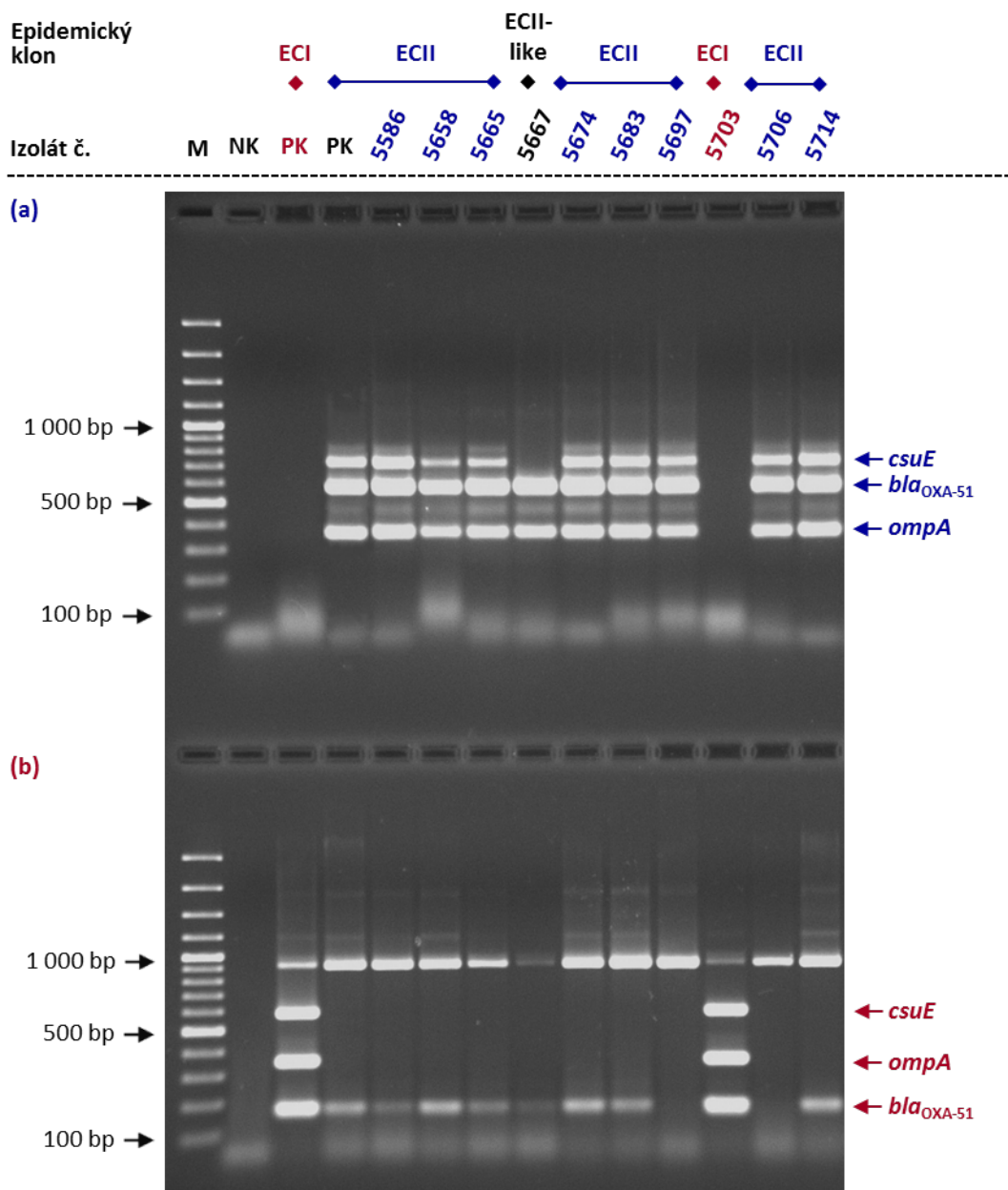
5.2. Identifikace na druhové a klonální úrovni

Výsledky druhové a klonální identifikace uvádí tabulka 6. Metodou MALDI-TOF MS (kapitola 4.2) byly všechny izoláty identifikovány jako *A. baumannii* v první volbě. Identifikace na druhové však nebyla v některých případech spolehlivá (naznačeno písmenem B v identifikačním skóre), což plyne z fylogenetické příbuznosti mezi *A. baumannii* a ostatními druhy komplexu *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*, zvláště *Acinetobacter nosocomialis* (Šedo et al., 2013). Zařazení do druhu *A. baumannii* pak u všech izolátů potvrdil pozitivní výsledek detekce genu pro OXA-51 pomocí PCR (kapitola 4.3).

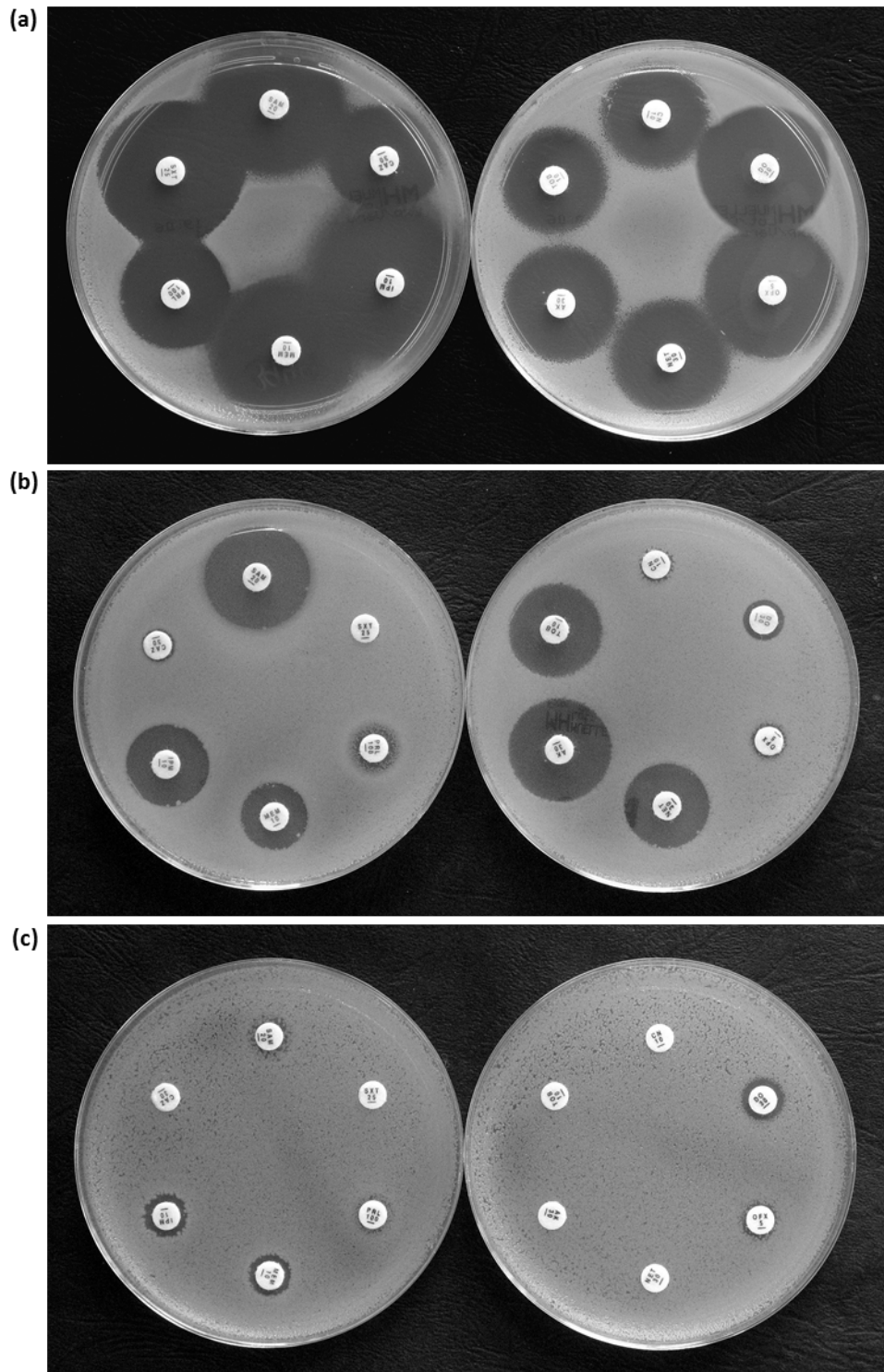
Identifikace hlavních epidemických klonů EC I a EC II metodou multiplexové PCR (kapitola 4.4) byla provedena u 40 izolátů, které reprezentovaly všechny možné kombinace odlišných makrorestrikčních profilů, fenotypů citlivosti a míst izolace. Výsledky pro vybrané izoláty ukazuje obr. 3. Až na čtyři byly všechny izoláty zařazeny do EC II. Jediný izolát (5703) měl profil EC I. Zbývající tři izoláty pocházející z téže nemocnice (Praha 1) pak sdílely unikátní profil charakterizovaný přítomností ampliconů pro *ompA* a *bla*_{OXA-51} specifických pro EC II a absencí ampliconu pro *csuE*. Vzhledem k vysoké podobnosti makrorestrikčních profilů těchto tří izolátů s profily izolátů EC II lze předpokládat, že jde buď o EC II se změněnými cílovými sekvencemi pro použité primery nebo o klonální variantu blízkou EC II. Tento profil jsme označili jako EC II-like.

5.3. Citlivost na antibiotika a vztah mezi genotypem a fenotypem rezistence

Tabulka 6 dále shrnuje výsledky vyšetření citlivosti na antibiotika a detekce genů a genetických struktur zodpovědných za rezistenci k β -laktamovým a aminoglykosidovým antibiotikům, které byly provedeny postupem uvedeným v kapitolách 4.1 a 4.6. Zatímco fenotyp jsme vyšetřili u všech izolátů (příklad viz obr. 4), detekci námi zvolené sestavy genů jsme provedli u podmnožiny izolátů reprezentujících hlavní kombinace makrorestrikčních profilů, fenotypů citlivosti a původu. Výsledky pro referenční izoláty 5190, 5452 a 5494 jsme převzali ze studie autorů Radolfová-Křížová et al. (2016).



Obr. 3. Výsledky multiplexové PCR pro identifikaci hlavních epidemických klonů u vybraných izolátů *A. baumannii*. V horní části (a) jsou výsledky pro kombinaci primerů specifických pro epidemický klon ECII, v dolní části (b) výsledky pro epidemický klon ECI (viz kapitola 4.4). Izolát 5667 má profil ECII vyjma fragmentu pro gen *csuE*. Provedeno podle postupu v kapitole 4.4. PK, referenční kmeny pro ECII (kmen ANC 4355) a ECI (ANC 4097); M, standard molekulových hmotností (GeneRuler 100 bp Plus, Fermentas).



Obr. 4. Vyšetření antibiotické citlivosti izolátů *A. baumannii* difuzním diskovým testem. (a) Plně citlivý referenční kmen ANC 3949; (b) multirezistentní izolát 5700 s *ISAb_{a1}* v promotorové oblasti genů *bla_{ADC}* (rezistence k ceftazidimu) a *bla_{OXA-51}* (snížená citlivost ke karbapenemům) a s genem *aacC1* (rezistence ke gentamicinu); (c) pouze ke kolistinu citlivý izolát 5808 s geny *armA*, *bla_{OXA-23}* a *bla_{TEM-1}*, zodpovědné za rezistenci ke všem β-laktamům a aminoglykosidům. Označení disků: AK, amikacin; CAZ, ceftazidim; CN, gentamicin; DO, doxycyklin; IPM, imipenem; MEM, meropenem; OFX, ofloxacin; PRL, piperacilin; SAM, ampicilin/sulbaktam; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazol; TOB, tobramycin.

Z výsledků uvedených v tabulce 6 je zřejmá vysoká míra kvalitativní (počet antibiotik, k nimž je izolát rezistentní) i kvantitativní (stupeň rezistence k danému antibiotiku) rezistence ke všem klíčovým antibiotikům vyjma kolistinu, jehož MIC byla ≤ 1 mg/l pro všechny testované izoláty. Všechny izoláty byly rezistentní k ceftazidimu, piperacilinu a ofloxacinu a kromě pár výjimek k doxycyklinu a kombinaci trimethoprimu a sulfamethoxazolu. Zásadní, byť očekávaná je malá proporce izolátů citlivých ke karbapenemům, zvláště pak meropenemu (jediný izolát). Výsledky genotypové analýzy potvrdili absenci genů, které byly v Česku dosud zachyceny vzácně nebo vůbec, tj. *bla*_{OXA-24/40}, *bla*_{PER-1}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *aacA4* a *aacC2*, a prokázán nebyl ani *aadB*. Z determinant rezistence ke karbapenemům byly zjištěny geny pro oxacilinázy typu OXA-23 (*bla*_{OXA-23}) a OXA-58 (*bla*_{OXA-58}) a přítomnost *ISAbal* v promotorové oblasti genů pro oxacilinázy typů OXA-51 (*ISAbal-bla*_{OXA-51}) a OXA-23 (*ISAbal-bla*_{OXA-23}). Z determinant rezistence k dalším β -laktamům pak geny pro TEM-1 (*bla*_{TEM-1}) a přítomnost *ISAbal* v promotorové oblasti genu pro chromozomální cefalosporinázu ADC (*ISAbal-bla*_{ADC}). Ohledně rezistence k aminoglykosidům byly zjištěny geny pro fosfotransferázy APH(3')-I (*aphA1*) a APH(3')-VI (*aphA6*), acetytransferázu AAC(3)-Ia (*aacC1*) a metylázu ArmA (*armA*).

Tabulka 7. Očekávaný fenotyp u determinant rezistence prokázaných u studovaných izolátů.

Genetická determinanta	Fenotyp rezistence
<i>armA</i>	GEN, NET, TOB, AMI, kanamycin*
<i>aacC1</i>	GEN
<i>aphA1</i>	Kanamycin*
<i>aphA6</i>	AMI, kanamycin*
<i>ISAbal-bla</i> _{ADC}	CTZ a další β -laktamy
<i>ISAbal-bla</i> _{OXA-51}	Karbapenemy a další β -laktamy†
<i>bla</i> _{TEM-1}	AMS‡
<i>bla</i> _{OXA-23} (<i>ISAbal-bla</i> _{OXA-23})	Karbapenemy a další β -laktamy
<i>bla</i> _{OXA-58}	Karbapenemy a další β -laktamy

* Citlivost na kanamycin nebyla vyšetřena.

† Oproti OXA-23 a OXA-58 obvykle kvantitativně nižší rezistence ke karbapenemům.

‡ Oproti jiným bakteriím způsobuje *bla*_{TEM-1} rezistenci k sulbaktamu, který je spolu s ampicilinem součástí AMS.

Při určení pravděpodobných mechanismů rezistence k β -laktamovým a aminoglykosidovým antibiotikům jsme vycházeli ze vztahu mezi fenotypem a genotypem rezistence u studovaných izolátů, a to, jak uvádí tabulka 7, s ohledem na fenotypy očekávané u prokazaného příslušného genu nebo genetické determinanty. Toto porovnání shrnuje tabulka 8, která dokládá soulad mezi předpokládaným a zjištěným fenotypem citlivosti. Např. u všech izolátů s *armA* byla zjištěna kvantitativně vysoká rezistence ke všem aminoglykosidům, podobně tomu bylo v případě *bla*_{OXA-23} a rezistence ke karbapenemům a ostatním β -laktamům. Nutno však uvést, že v řadě případů byl zjištěný fenotyp odvoditelný z několika genetických determinant, které se současně vyskytovaly ve stejném izolátu. V tomto ohledu je výrazným příkladem izolát 5697 s kvantitativně vysokou rezistencí ke karbapenemům, u něhož byly prokázány tři genetické determinanty potenciálně kódující tuto rezistenci, tj. *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} a *bla*_{OXA-58}. V případě aminoglykosidů jde pak o izoláty současně nesoucí *armA* a geny kódující enzymatickou modifikaci antibiotik (např. izoláty s geny *armA* a *aphA6*), které kódují kvantitativně vysokou rezistenci k amikacinu. Soulad mezi genotypem a fenotypem rezistence na příkladu izolátů 5700 a 5808 ilustruje obr. 4.

Tabulka 8. Zjištěné genotypy a fenotypy rezistence k β -laktamům a aminoglykosidům.

Genotyp	Fenotyp	Počet izolátů
β-laktamy		
<i>ISAbA1-bla</i> _{ADC} , <i>ISAbA1-bla</i> _{OXA51} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{OXA-23} [*] , <i>bla</i> _{OXA-58}	AMS, CTZ, IMI, MER, PIP	1
<i>ISAbA1-bla</i> _{ADC} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{OXA-23} [*] , <i>bla</i> _{OXA-58}	AMS, CTZ, IMI, MER, PIP	1
<i>ISAbA1-bla</i> _{ADC} , <i>ISAbA1-bla</i> _{OXA51} , <i>bla</i> _{OXA-58}	CTZ, IMI, MER, PIP	1
<i>ISAbA1-bla</i> _{ADC} , <i>ISAbA1-bla</i> _{OXA-51}	CTZ, MER, PIP	8
<i>ISAbA1-bla</i> _{ADC} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{OXA-23} [*]	AMS, CTZ, IMI, MER, PIP	5
<i>ISAbA1-bla</i> _{ADC} , <i>bla</i> _{OXA-23} [*] , <i>bla</i> _{OXA-58}	AMS, CTZ, IMI, MER, PIP	1
<i>bla</i> _{OXA-23}	AMS, CTZ, IMI, MER, PIP	10
<i>ISAbA1-bla</i> _{OXA-51}	CTZ, IMI, MER, PIP	2
Aminoglykosidy		
<i>aacC1</i>	GEN	1
<i>aacC1</i> , <i>aphA1</i>	GEN	7
<i>aacC1</i> , <i>aphA1</i>	GEN, NET	1
<i>armA</i> , <i>aphA6</i> , <i>aphA1</i>	GEN, TOB, AMI, NET	6
<i>armA</i> , <i>aphA1</i>	GEN, TOB, AMI, NET	1
<i>armA</i> , <i>aphA6</i>	GEN, TOB, AMI, NET	1
<i>armA</i>	GEN, TOB, AMI, NET	8

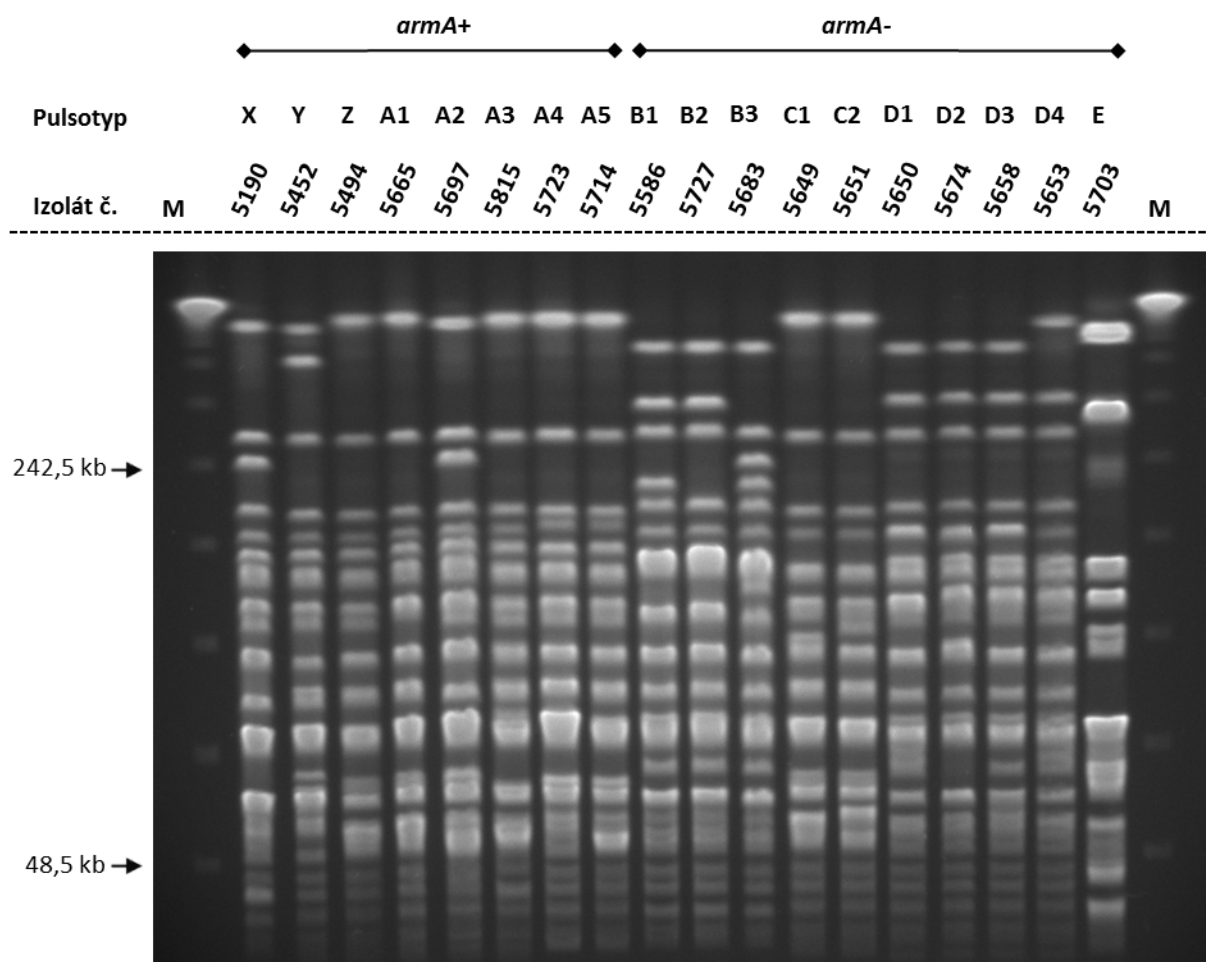
* *bla*_{OXA-23} byl v testovaných případech vždy asociován s *ISAbA1*.

Pouze ve dvou případech jsme zjistili nesoulad mezi zjištěným genotypem a fenotypem. Izolát 5658 byl rezistentní k netilmicinu, byť jsme u něj neprokázali žádný gen kódující rezistenci k tomuto antibiotiku. Vzhledem k tomu, že míra této rezistence byla nižší než u izolátů s *armA*, je možné, že u izolátu 5658 jde o důsledek nadprodukce efluxového systému Ade-ABC, která snižuje citlivost k netilmicinu až k hodnotám rezistence, a to i při absenci dalších mechanismů rezistence k tomuto aminoglykosidu (Magnet et al., 2001; Nemeč et al., 2007). U izolátu 5677 nesoucího gen *aacC1* pak byla zjištěna pouze intermediární citlivost ke gentamicinu, byť přítomnost tohoto genu je obvykle spojena s vysokou rezistencí.

5.4. Skupiny izolátů s pravděpodobnou epidemiologickou vazbou

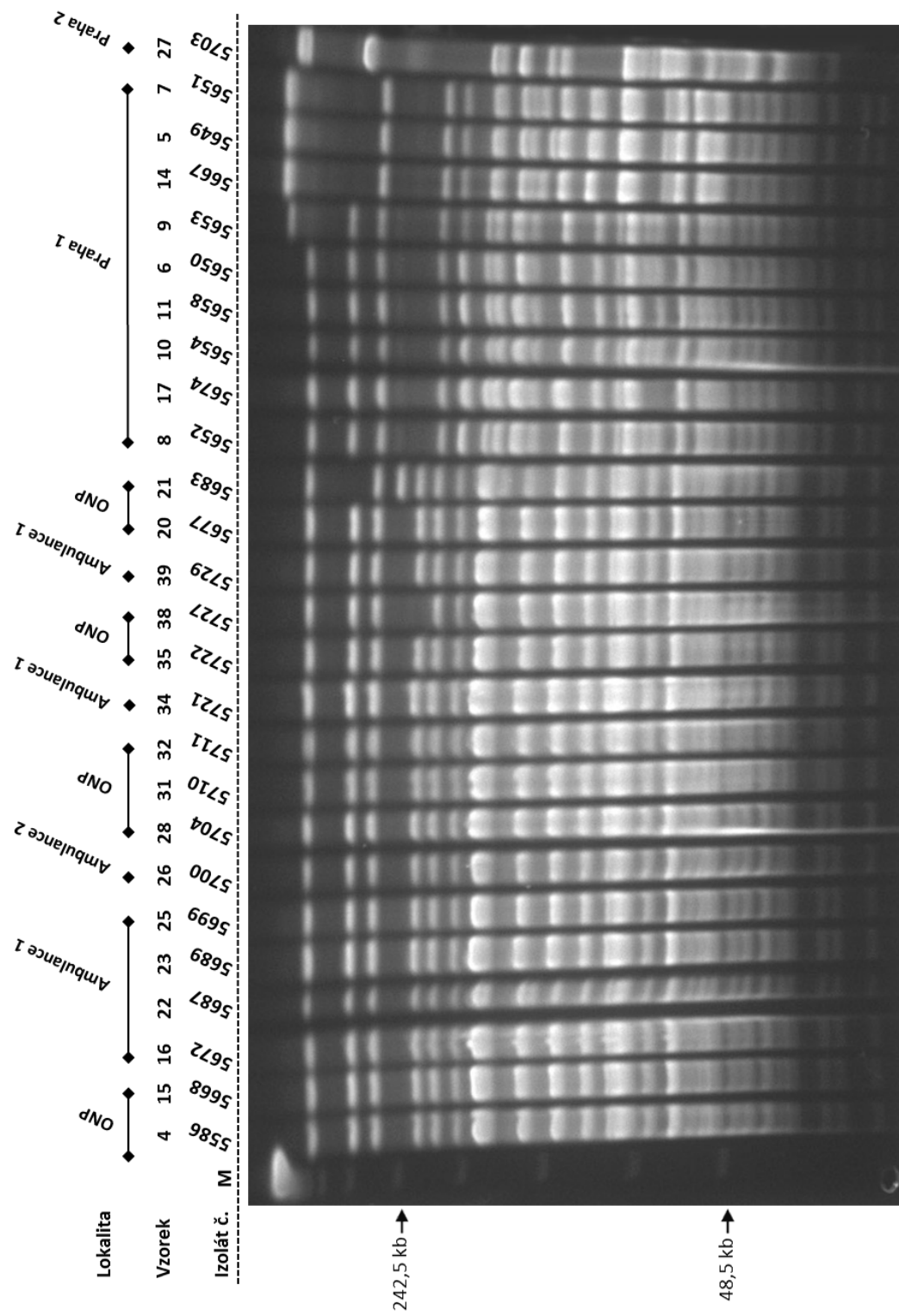
Zásadní otázkou bylo určení možné epidemiologické vazby studovaných izolátů, tj. rozhodnutí o jejich bezprostředním klonálním vztahu neboli o tom, zda studované izoláty patří k populaci téhož kmene, který se šíří v daném prostoru a čase. K relativně spolehlivému určení této vazby je kromě výsledků citlivých genotypizačních a dalších typizačních metod potřebná podrobná znalost epidemiologického kontextu záchytu izolátů. Při rozhodování o epidemiologické vazbě jsme tudíž vycházeli z výsledků genotypizace (multiplexová PCR pro určení klonálních typů, makrorestrikční analýza, určení genotypu rezistence), fenotypu antibiotické citlivosti a dostupných epidemiologických údajů, přičemž klíčovým kritériem byla podobnost makrorestrikčních profilů.

Obr. 5 znázorňuje všechny unikátní makrorestrikční profily (pulzotypy) nalezené u studovaných izolátů s tím, že shodné profily jsou zastoupeny jedním představitelem. Pulzotypy jsou na obrázku seřazeny do pěti skupin podobnosti podle doporučení Tenovera et al. (1995). Každá skupina obsahuje natolik podobné pulzotypy, že nelze spolehlivě vyloučit epidemiologickou vazbu příslušných izolátů. Oproti tomu rozdíly pulzotypů mezi skupinami takovou vazbu vylučují. Obr. 6 pak ilustruje komplexnost situace při hodnocení podobnosti pulzotypů v případě izolátů bez genu *armA* s různou mírou možné epidemiologické vazby, a to včetně epidemiologicky souvisejících izolátů se shodnými profily.



Obr. 5. Makrorestrikční profily genomové DNA (pulsotypy) u studovaných izolátů *A. baumannii*. Klasifikace do typů (A-E) a jejich případných subtypů (1-5) byla provedena podle Tenovera *et al.* (1995). X, Y a Z jsou pulsotypy referenčních kmenů nesoucích gen *armA* (bez indikace podobnosti mezi sebou nebo s novými pulsotypy). Vyznačena je přítomnost resp. nepřítomnost genu *armA* u izolátů s danými pulsotypy. Provedeno podle kapitoly 4.5. M, standard molekulových hmotností (Bio-Rad CHEF DNA Size Standard Ladder 48,5 kb).

Tabulka 9 shrnuje klasifikaci studovaných izolátů do uvedených pěti klonálních skupin (I–V) a jejich případných podskupin podle pulsotypů, genotypu a fenotypu rezistence a původu. Genotyp rezistence byl kompletně vyšetřen pouze u vybraných izolátů, především představitelů vícečetných skupin izolátů se shodným pulsotypem a fenotypem rezistence, u nichž lze s velkou pravděpodobností předpokládat shodu i v nesených genech pro rezistenci. Následující text shrnuje hlavní vlastnosti pěti klonálních skupin.



Obr. 6. Pulzotypy izolátů *A. baumannii* bez genu *armA*. Provedeno podle kapitoly 4.5. M, standard molekulových hmotností (Bio-Rad CHEF DNA Size Standard Ladder 48,5 kb).

Tabulka 9. Klasifikace izolátů do klonálních skupin s možnou epidemiologickou vazbou.

Klonální skupina	Izolát*	Pulzotyp	Lokalita†	Genotyp rezistence	Fenotyp rezistence‡														
					ASM	CTZ	IMI	MER	PIP	GEN	TOB	AMI	NET	OFL	COT	DOX			
I	5665, 5666, 5675, 5676, 5706, 5707, 5769, 5770, 5771	A1	P1, P2, NS	ISAbat1-bla _{ADG} , bla _{TEM-1} , bla _{OXA-23} , bla _{OXA-58} , armA, aphA6, aphA1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
	5697	A2	Pb	ISAbat1-bla _{ADG} , ISAbat1-bla _{OXA51} , bla _{TEM-1} , bla _{OXA-23} , bla _{OXA-58} , armA, aphA1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
	5815, 5855, 5860, 5863	A3	P3	ISAbat1-bla _{ADG} , bla _{OXA-23} , bla _{OXA-58} , armA, aphA6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R/I
	5723, 5726, 5740, 5761, 5763, 5774, 5776, 5781, 5784, 5808, 5810, 5812, 5818, 5820	A4	Pb	ISAbat1-bla _{ADG} , bla _{TEM-1} , bla _{OXA-23} , armA, aphA6, aphA1	R/I/C	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	5714	A5	Pb	bla _{OXA-23} , armAx	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	5586, 5668, 5672, 5677, 5687, 5689, 5699, 5700, 5704, 5710, 5711, 5721, 5722, 5729	B1	Pb	ISAbat1-bla _{ADG} , ISAbat1-bla _{OXA-51} , aacc1, aphA1	C	R	R	R/I/C	R	R/C	C	C	C	C	C	C	R	R	R
	5727	B2	Pb	x	C	R	C	I	R	R	C	C	C	C	C	R	R	R	R
	5683	B3	Pb	x	C	R	C	I	R	I	C	C	C	C	C	R	R	R	R
	5649	C1	P1	bla _{OXA-23} x	R	R	R	R	R	R	C	C	R	R	R	R	R	R	R
	5651, 5667	C2	P1	bla _{OXA-23} x	R	R	R	R	R	R	I/C	C	R	R	R/I	R	R	R	R
IV	5650, 5652, 5654	D1	P1	ISAbat1-bla _{OXA-51} x	C	R	R	R	R	R	C	C	R/I	R	R	R	R	R	
	5674	D2	P1	ISAbat1-bla _{ADG} , ISAbat1-bla _{OXA-51} , bla _{OXA-58} , aacc1	C	R	R	R	R	R	C	C	I	R	R	R	R	R	
	5658	D3	P1	ISAbat1-bla _{ADG} , ISAbat1-bla _{OXA-51} , aacc1, aphA1	C	R	I	R	R	R	C	C	C	R	R	R	R	R	
	5653	D4	P1	ISAbat1-bla _{OXA-51} x	C	R	R	R	R	R	C	C	C	C	R	R	R	R	
	5703	E	P2	x	C	R	R	R	R	R	C	C	C	R	C	R	C	R	

* Číslo izolátů s kompletně vyšetřeným genotypem jsou podtržena, čísla izolátů pouze s částečně vyšetřeným genotypem jsou vyznačena tučně.

† Pb, Příbramsko (Oblastní nemocnice Příbram, Ambulance 1, Ambulance 2); P1, Nemocnice Praha 1; P2, Nemocnice Praha 2; P3, Nemocnice Praha 3; NS, Nemocnice Středočeského kraje.

‡ Zkratky pro antibiotika viz tabulka 2. R, rezistentní; I, intermediárně citlivý; C, citlivý (viz tabulka 2).

x Genotyp rezistence nevyšetřen nebo vyšetřen pouze částečně.

Skupina I. Jde o početně největší (n=29) a klinicko-epidemiologicky nejvýznamnější skupinu, která zahrnuje izoláty ECII pocházející ze všech studovaných nemocnic. Jde o extenzivně rezistentní izoláty s kvantitativně vysokou rezistencí ke všem antibiotikům vyjma plné citlivosti na kolistin a ojedinělé intermediární citlivosti nebo citlivosti na sulbaktam, trimetoprim/sulfamethoxazol nebo doxycyklin. Všechny testované izoláty obsahovaly geny pro ArmA a OXA-23. Jak ukazuje obr. 5, odlišnosti mezi vnitroskupinovými variantami pulzotypů jsou malé a podobně malé rozdíly jsou i mezi těmito variantami a pulzotypy tří archivních referenčních kmenů (5190, 5452 a 5494) izolovaných mezi červnem 2015 a květnem 2016. To omezuje použití těchto profilů pro spolehlivé rozlišení ve smyslu vyloučení epidemiologické vazby. Nicméně shoda pulzotypů u převážné většiny izolátů z téže lokality naznačuje jejich přímou epidemiologickou vazbu uvnitř těchto nemocnic a v případě shody pulzotypů u izolátů z tří nemocnic (Praha1, Praha 2 a nemocnice Středočeského kraje) je velmi pravděpodobné šíření téhož kmene mezi těmito zdravotnickými zařízeními.

Z 16 izolátů pocházejících z Příbramska se dva (5697, 5714) od ostatních částečně liší. Izolát 5714 je oproti ostatním citlivý na trimetoprim/sulfamethoxazol, avšak shoduje se s nimi v přítomnosti genu pro OXA-23 a ArmA a jeho pulzotyp se od ostatních lišil pouze v poloze jednoho až dvou proužků (obr. 5). Vzhledem k tomu, že byl spolu s většinou ostatních izolován v podobném čase na témže nemocničním oddělení, lze předpokládat, že jde o epidemiologicky nevýznamnou variantu populace lokálního epidemického kmene. Oproti tomu měl izolát 5697 odlišnější pulzotyp (obr. 5), jiný genotyp rezistence (tabulka 9) a byl izolován od ambulantního pacienta. V jeho případě je tudíž bezprostřední epidemiologická vazba s ostatními izoláty méně pravděpodobná.

Skupina II. Jde o druhou nejpočetnější skupinu, která zahrnuje 16 izolátů ECII z Příbramska; devět z Oblastní nemocnice Příbram (osm z chirurgického lůžkového oddělení a jeden izolát z chirurgické ambulance), šest z chirurgické ambulance mimo Příbram a jeden z ambulance na příbramské poliklinice. S výjimkou dvou (5727, 5683) se tyto izoláty shodovaly ve všech vlastnostech (vyjma citlivosti ke gentamicinu u 5677) a jde tak zjevně o populaci lokálně se šířícího multirezistentního kmene. U tohoto kmene je rezistence (meropenem) nebo snížená citlivost (imipenem) ke karbapenemům nejspíše způsobena nadprodukcí OXA-51 a rezistence k ceftazidimu nadprodukcí ADC; rezistence ke gentamicinu pak souvisí s přítomným genem pro acelytransferázu AAC(3)-Ia. Izoláty 5727 a 5683 mají pulzotypy, jejichž

odlišnost od pulzotypu ostatních izolátů (obr. 5 a 6) lze interpretovat jako důsledek jediné genetické události (vznik jednoho restričního místa). Též vzhledem ke shodnému místu a času izolace (tabulka 5) tak lze předpokládat, že tyto izoláty patří spolu s ostatními k populaci téhož lokálního kmene. U izolátu 5683 je to podpořeno i tím, že jde o izolát z pacienta, od něhož byl ze stejné kožní léze o dva týdny dříve zachycen typický izolát skupiny II (izolát 5677), který byl stejně jako izolát 5683 oproti ostatním izolátům pouze intermediárně citlivý ke gentamicinu (tabulky 5 a 6).

Skupina III. Jde o tři izoláty z jedné nemocnice (Praha 1) s ojedinělým profilem multiplexové PCR (kapitola 5.2, obr. 3), které náležejí k ECII nebo jsou tomuto klonu blízké. Vzhledem k této zvláštnosti, shodě nebo vysoké podobnosti pulzotypů (obr. 5 a 6) a záchytu na stejném oddělení v krátkém časovém rozpětí (tabulka 5), jde nepochybně izoláty téhož kmene nesoucího gen pro OXA-23. I když u těchto izolátů nebyl kompletně určen genotyp rezistence, přítomnost *armA* lze vyloučit na základě plné citlivosti k tobramycinu.

Skupina IV. Jde o šest izolátů ECII pocházejících z jediné nemocnice (Praha 1), které byly s jedinou výjimkou (izolát 5674) zachyceny během měsíce na témže lůžkovém oddělení. Kromě kolistinu jsou tyto izoláty plně citlivé pouze na tobramycin a amikacin. Byť malé rozdíly mezi čtyřmi pulzotypy nevylučují přímou epidemiologickou vazbu, je tato skupina do jisté míry heterogenní i jinak (izoláty 5674 a 5658 se liší přítomností genů *bla*_{OXA-58} a *aphA1*; 5653 je citlivý na gentamicin). Vzhledem neúplné charakterizaci genotypu rezistence zůstává otázka přímé epidemiologické vazby u této skupiny otevřena.

Skupina V. Jde o jediný izolát z pražské nemocnice, který zároveň jediným zástupcem ECI v této studii. Příslušnost k ECI naznačuje i jeho svébytný pulzotyp (obr. 5) a citlivost na doxycyklin.

5.5. Epidemiologická analýza v Oblastní nemocnici Příbram

Poslední bodem této práce byla podrobná analýza epidemiologické situace a možného epidemického šíření u izolátů zaslaných Laboratoří mikrobiologie a parazitologie v Oblastní nemocnici Příbram. Východiskem pro tento typ analýzy byla dlouhodobá spolupráce této laboratoře vedené prim. MVDr. Petrem Ježkem s Laboratoří bakteriální genetiky, která spočívá v systematickém zasílání izolátů rodu *Acinetobacter* spolu s podrobnými údaji o mikro-

biologickém, epidemiologickém i klinickém kontextu jejich záchytu. Do naší studie byly zařazeny 32 izoláty zaslané touto laboratoří, což tvoří 58 % všech studovaných izolátů a zároveň představuje vzorek populace multirezistentních acinetobakterů z jednoho regionu. Díky spolupráci s místním Týmem pro kontrolu a prevenci infekcí spojených se zdravotní péčí jsme získali podrobnou retrospektivní informaci o délce hospitalizace a dalším epidemiologickém kontextu u pacientů, od nichž pocházely studované izoláty. Vedení nemocnice nám zároveň dalo laskavý souhlas ke zveřejnění místních a časových údajů pro účely této diplomové práce.

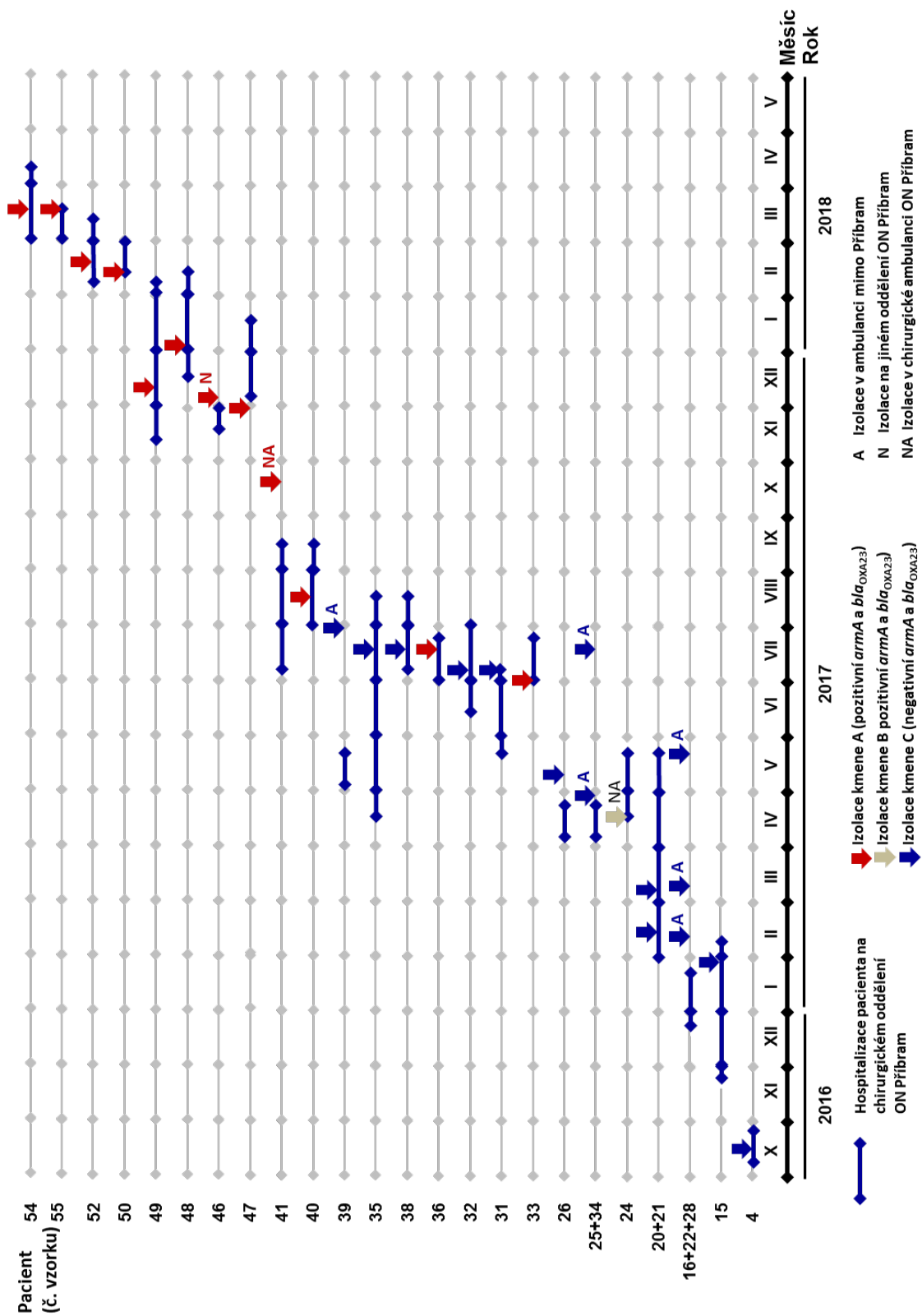
Třicet dva izoláty zaslané příbramskou laboratoří pocházely od 28 pacientů (od dvou pacientů bylo po dvou izolátech, od jednoho tři izoláty). Z 21 izolátů zachycených u pacientů hospitalizovaných v příbramské nemocnici bylo 18 z chirurgického, dva z interního a jeden z anesteziologicko-resuscitačního oddělení. Zbývajících 11 izolátů pocházelo od ambulantních pacientů: tři z chirurgické ambulance příbramské nemocnice, jeden z ambulance na příbramské poliklinice a sedm z chirurgické ambulance na Příbramsku. Odebraným materiálem byly s výjimkou dvou vzorků moči pouze stěry z tělesného povrchu (kožní léze, rány, vředy a okolí katétru). Povaha vzorků naznačuje, že i pokud šlo o klinicky významné nálezy, šlo pouze o lokální a nikoliv systémové infekce. To potvrdily i klinické údaje u pacientech.

Jak plyne z výše uvedeného (kapitola 5.4, tabulky 5 a 9), 32 izoláty z příbramské laboratoře jsme pomocí genotypizace s jedinou výjimkou klasifikovali do dvou skupin, z nichž každá s vysokou pravděpodobností zahrnuje izoláty jednoho lokálně/regionálně se šířícího kmene. Jako kmen A jsme označili 15 izolátů náležejících do klonální skupiny I; jde o extenzivně rezistentní izoláty s pulzotypy A4 a A5, které nesou geny pro ArmA a OXA-23. Kmen B (klonální skupina I, pulzotyp A2, izolát 5697), který též nese tyto geny, představuje ojedinělý záchyt v chirurgické ambulanci příbramské nemocnice bez přímé epidemiologické vazby s kmenem A. Kmen C pak zahrnuje 16 multirezistentních izolátů klonální skupiny II.

Epidemiologickou situaci s ohledem na pacienty hospitalizované v období od října 2016 do dubna 2018 na lůžkovém chirurgickém oddělení příbramské nemocnice graficky shrnuje obr. 7. Obrázek formou časové osy pro jednotlivé pacienty udává dobu hospitalizace na oddělení i čas odběru vzorků, z nichž byl izolován epidemický kmen, a to včetně odběrů mimo dobu a místo hospitalizace. Multirezistentní kmen C byl poprvé zachycen v říjnu 2016 a naposledy v červenci 2017, přičemž jeho izolace v mezidobí byly od pacientů, jejichž hospitali-

zace tvoří nepřerušenu řadu ve smyslu časové návaznosti nebo překryvu. V sedmi případech byl kmen C zachycen až v následné ambulantní péči po ukončení hospitalizace. Analogickou situaci představuje výskyt kmene A, který byl izolován v období mezi červencem 2017 a březnem 2018. Jistá časová prodleva (září až listopad 2017) mezi hospitalizacemi pacientů s pozitivním nálezem může být dána metodicky (negativní kultivační výsledek u kolonizovaného pacienta). I u kmene A došlo k izolaci po ukončení hospitalizace, a to po přesunu na jiné oddělení (anesteziologicko-resuscitační oddělení) a v ambulanci příbramské nemocnice. Nutno zmínit, že kmen A byl poprvé izolován z pacienta, který byl v ten samý den přeložen z pražské nemocnice (v této studii označena jako Nemocnice Praha 1), v níž byly izoláty nesoucí *armA* a *bla_{OXA-23}* a mající pulzotypy téměř shodné s kmenem A již dříve zachyceny (tabulky 5 a 9, obr. 5). Kmen B byl jedinkrát zachycen v dubnu 2017, ale navzdory tomu, že daný pacient posléze na chirurgickém oddělení hospitalizován, další jeho izolace nenásledovaly.

Z výše uvedeného plyne, že šíření multirezistentních a extenzivně rezistentních kmenů *A. baumannii* v příbramské nemocnici a okolí byl zprostředkován přesuny a pohybem kolonizovaných pacientů. Hlavním zdrojem této kolonizace bylo lůžkové chirurgické oddělení, kde se ve sledovaném období po sobě vyskytly dva epidemické kmeny přednostně infikující nebo kolonizující kožní léze. Po propuštění z nemocnice se tito pacienti stali možným zdrojem dalšího šíření těchto organizmů. Na závěr nutno dodat, že výsledky naší analýzy podpořily zpřísnění hygienických a protiepidemických opatření na chirurgickém oddělení. V období od března do července 2018 pak na tomto oddělení nebyly multirezistentní ani extenzivně rezistentní *A. baumannii* izolovány (prim. MVDr. P. Ježek, osobní sdělení).



Obr. 7. Časový záznam hospitalizace jednotlivých pacientů na chirurgickém lůžkovém oddělení Oblastní nemocnice Příbram s vyznačením doby záchytu studovaných izolátů. Vodorovné čáry představující jednotlivé pacienty jsou označeny číslem příslušného vzorku (viz tabulka 5). Kmeny A (pulzotypy A4 a A5) a B (pulzotyp A2) patří do extenzivně rezistentní klonální skupiny I, kmen C (pulzotypy B1-B3) do multirezistentní skupiny II (kapitola 5.4, tabulka 9).

6. DISKUZE

Předložená studie byla motivována nedávnou změnou v populaci nemocničních kmenů *A. baumannii* v České republice, která byla zaznamenána v roce 2015 a spočívala v objevení se extenzivně rezistentních izolátů globálního epidemického klonu ECII nesoucích kombinaci genů pro metylázu *ArmA* a karbapenemázu *OXA-23*. Jak ukázala studie Radolfové-Křížové et al. (2016), první izolát s tímto genotypem rezistence byl zachycen v červnu 2015 v pardubické nemocnici. V následujících 11 měsících byly podobné kmeny izolovány v šesti nemocnicích, konkrétně v Hradci Králové, Frýdku-Místku, Karviné, Ostravě, Praze a Tanvaldu (Radolfová-Křížová et al., 2016). Tyto izoláty pocházely z klinického materiálu hospitalizovaných pacientů, včetně sputa, tracheálního aspirátu, krve, ran a moči. Jejich charakteristickým rysem byla kvantitativně vysoká rezistence ke všem klinicky využitelným antibiotikům (imipenem, meropenem, ampicilin-sulbaktam, ceftazidim, cefotaxim, cefepim, piperacilin-tazobaktam, aztreonam, amikacin, gentamicin, netilmicin, tobramycin, ciprofloxacin, ofloxacin a doxycyklin). Výjimku představoval kolistin, který si ve všech případech zachoval plnou účinnost, a kotrimoxazol (trimethoprim/sulfamethoxazol) a tigecyklin, k nimž bylo několik izolátů intermediárně citlivých. Nutno zdůraznit, že k identifikaci prvního izolátu této extenzivně-rezistentní skupiny došlo v kontextu systematického sledování populace *A. baumannii* řešitelským pracovištěm od počátku 90. let minulého století (kapitola 2.2.4), a rozšíření kmenů této skupiny u nás před rokem 2015 je tudíž velmi nepravděpodobné.

Výsledky předkládané studie ukazují, že šíření kmenů ECII s geny *armA* a *bla*_{OXA-23} v České republice pokračuje. Z 55 multirezistentních izolátů zachycených v osmi zdravotnických zařízeních středočeského regionu mezi říjnem 2016 a květnem 2018 jich 29 patřilo k této extenzivně rezistentní skupině a tyto izoláty byly zachyceny na všech lokalitách. Naše výsledky ukazují, že jde o geneticky velmi příbuzné organizmy se shodnými nebo velmi podobnými typizačními profily. Epidemický potenciál těchto kmenů ve smyslu jejich šíření uvnitř zdravotnických zařízení i mezi nimi dokládají výsledky genotypizace (5.4) i epidemiologické údaje (kapitola 5.5). Shoda nebo vysoká podobnost typizačních profilů byla prokázána mezi izoláty s *armA/bla*_{OXA-23} různého původu též ve studii Radolfové-Křížové et al. (2016) a porovnání tří referenčních kmenů z této studie s našimi izoláty potvrzuje genetickou příbuznost izolátů obou studií. Tuzemská populace *A. baumannii* nesoucí *armA/bla*_{OXA-23} se z genotypového hlediska tak jeví jako geneticky vnitřně sourodá byť ne zcela homogenní skupina, která se

zřetelně odlišuje od našich ostatních kmenů *A. baumannii*, a to včetně kmenů náležejících ke stejnému globálnímu klonu ECII, která tuto kombinací genů neobsahují.

Metyláza typu ArmA představuje vysoce efektivní singulární mechanismus rezistence, který je založen na modifikaci zásahového místa na 16S rRNA, jenž je společné pro antibiotika gentamicinové a kanamycinové řady, a eliminuje tak účinek všech aminoglykosidů používaných v nemocniční péči (Doi a Arakawa, 2007). Gen pro AmA byl zjištěn na plazmidu polského izolátu *Citrobacter freundii* z roku 1996 (Doi et al., 2016) a poté byl identifikován v Evropě i Asii u dalších druhů čeledi *Enterobacteriaceae* (Galimand et al., 2003; Gonzalez-Zorn et al., 2005). U *A. baumannii* byl *armA* prokázán u korejských izolátů již z roku 2003 (Lee et al., 2006).

Karbapenemáza typu OXA-23 je velmi účinný mechanismus rezistence, který eliminuje účinnost karbapenemů a většiny dalších β -laktamových antibiotik. Oproti *armA* je téměř výlučně vázána na rod *Acinetobacter*, kde má i svůj původ (kapitola 2.2.3.1). Gen pro OXA-23 je mezi kmeny *A. baumannii* i jiných druhů acinetobakterů je celosvětově rozšířen (Mugnier et al., 2010), nicméně systematické studie řešitelského pracoviště jeho výskyt v České republice až do roku 2010 neprokázaly. První doklady o výskytu *bla*_{OXA-23} u nás jsou teprve z let 2011–2012 (Křížová et al., 2012; Nemeč a Krizova, 2012; Senkyrikova et al., 2013). V těchto případech však šlo o kmeny *A. baumannii* nesoucí pouze *bla*_{OXA-23} a nikoliv *armA*.

Kombinace genů pro ArmA a OXA-23 představuje vysoce efektivní ochranu kmenů *A. baumannii* proti aminoglykosidům a β -laktamům, dvěma nejvýznamnějším skupinám antibiotik používaných v léčbě nemocničních infekcí. V Evropě byla u *A. baumannii* tato kombinace zjištěna poprvé u norských izolátů z let 2007 a 2009 (Karah et al., 2011). Následovaly nálezy v italských nemocnicích v letech 2009 (Monza a Balsamo; Brigante et al., 2012), 2009–2011 (Terst; Milan et al., 2016) a 2014–2015 (sicilská Katánie; Caio et al., 2018) a v Bulharsku (Strateva et al., 2012). Téměř ve všech těchto případech přitom šlo, tak jako v naší studii, o izoláty ECII. Z mimoevropských zemí, kde byly kmeny *A. baumannii* s *armA/bla*_{OXA-23} identifikovány, lze uvést Jemen (Bakour et al., 2014), Indii (Karthikeyan et al., 2010) nebo Koreu (Hong et al., 2013). Publikované zprávy tak naznačují dosud geograficky omezené rozšíření *A. baumannii* s *armA/bla*_{OXA-23} a zdůrazňují význam našich nálezů přinejmenším v evropském kontextu.

Je potřebné zmínit dvě metodická omezení předložené studie. První zahrnuje výběr a reprezentativnost studovaného vzorku populace. Vzhledem k tomu, že šlo o retrospektivní

analýzu početně i geograficky omezeného populačního vzorku získaného náhodně během referenční činnosti řešitelského pracoviště, nelze z našich výsledků vyvozovat závěry ohledně proporce výskytu kmenů s *armA/blaOXA-23* v celkové populaci *A. baumannii* ani míry celorepublikového rozšíření, jako tomu bylo u předchozí prospektivní studie (Nemec et al., 2008). Vysoké zastoupení těchto kmenů v naší studii a jejich výskyt na všech studovaných lokalitách nicméně svědčí o jejich pokračujícím šíření.

Druhým omezením je výpovědní hodnota výsledků typizačních metod ve smyslu poznání časoprostorové trajektorie, po níž se epidemické kmene šíří. Tyto metody v principu umožňují pouze vyloučení přímé epidemiologické vazby, zatímco její potvrzení je spojeno pouze s různou mírou pravděpodobnosti (van Belkum et al., 2007). Výpovědní hodnota typizačních metod je určena její rozlišovací schopností, tj. pravděpodobností odlišit epidemiologicky nepříbuzné kmene (Hunter a Gaston, 1988). Spolehlivost tohoto rozlišení je funkcí počtu typů v populaci a jejich proporce ve studovaném kontextu (Hunter a Gaston, 1988). V případě epidemického rozšíření určitého typu klesá účinnost metody, přičemž mohou vznikat vzájemně velmi podobné typové varianty, které rozhodnutí o epidemiologické vazbě komplikují. Příkladem tohoto problému je shoda či vysoká podobnost makrorestrikčních profilů zjištěných u izolátů s *armA/blaOXA-23* z téže lokality i lokalit odlišných. Samotné porovnání těchto profilů má omezenou výpovědní hodnotu, neboť nelze spolehlivě rozhodnout, zda drobný rozdíl v profilech odráží nezávislý původ izolátů, či jde o důsledek aktuální změny v populaci epidemického kmene. V těchto případech lze přihlídnout k dalším znakům, např. genotypu rezistence. Ale i zde může být zjištěný rozdíl důsledkem získání nebo ztráty genetické struktury v populaci epidemického kmene. Příkladem je vysoká míra nestability genu *aphA6* (rezistence k amikacinu) prokázaná řešitelským pracovištěm u kmene ECII rezistentního ke karbapenemům (Nemec et al., 2006). Zmíněné metodické meze lze zmírnit moderními vysoce citlivými metodami, které jsou založeny na porovnání celogenomových sekvencí (Fitzpatrick et al., 2016).

Klíčovým kritériem pro rozhodnutí o epidemiologické vazbě mezi bakteriálními izoláty na lokální úrovni zůstává přesná znalost epidemiologického kontextu jejich záchytu. Teprve ty vytvářejí náležitý interpretační rámec pro výsledky mikrobiologické analýzy. V tomto smyslu považujeme za zvláště přínosnou mikrobiologicko-epidemiologickou analýzu v Oblastní nemocnici Příbram (kapitola 5.5). Tato analýza umožnila rozlišit dvě po sobě následující epide-

mické epizody, které by v případě absence mikrobiologické analýzy mohly být považovány za epizodu jedinou. Dále pak ukázala, že kolonizace pacientů kmeny získanými během hospitalizace může přetrvávat i po propuštění z nemocnice a představovat tak riziko pro jejich další šíření. V případě extenzivně rezistentních kmenů, u nichž jsou možnosti antibiotické léčby vyvolaných infekcí dramaticky omezeny či neexistují, zůstává náležitá epidemiologicko-mikrobiologická analýza jedním z mála postupů, které umožňují kontrolu těchto infekcí.

7. SOUHRN

V předložené práci byla provedena mikrobiologicko-epidemiologická analýza 55 multirezistentních izolátů *A. baumannii*, které byly zachyceny v osmi zdravotnických zařízeních ve Středočeském kraji a Praze v říjnu 2016 až květnu 2018. U těchto izolátů byla provedena identifikace na druhové a klonální úrovni, kmenová genotypizace, určení fenotypu a genotypu rezistence k antibiotikům a klasifikace do skupin izolátů s pravděpodobnou epidemiologickou vazbou. Hlavní výsledky s ohledem na vytýčené cíle (kapitola 3) jsou:

1. S jedinou výjimkou (klon ECI) byly všechny izoláty identifikovány jako ECII (n=51) nebo skupina příbuzná klonu ECII (n=3). Celkem 29 izolátů bylo extenzivně rezistentních (plná citlivost zachována pouze pro kolistin) a tyto izoláty nesly geny pro metylázu ArmA (rezistence ke všem aminoglykosidům) a oxacilinázu OXA-23 (rezistence ke karbapenemům a dalším β -laktamům). Zbývajících 26 izolátů bylo multirezistentních a neneslo gen pro ArmA a většinou ani pro OXA-23. Z ostatních genetických determinant rezistence k β -laktamům byly v různé proporce a kombinacích zjištěny geny pro OXA-58, TEM-1 a přítomnost *ISAbal1* v promotorové oblasti chromozomálních genů pro OXA-51 a ADC; ohledně rezistence k aminoglykosidům pak geny pro fosfotransferázy APH(3')-I a APH(3')-VI a acetyltransferázu AAC(3)-Ia.

2. Primárně podle výsledků makrorestrikční analýzy genomové DNA a dále pak podle genotypu rezistence a dalších údajů byly izoláty klasifikovány do pěti genotypově vzájemně odlišných, ale vnitřně kohezních homogenních skupin, které byly v některých případech rozděleny do podskupin. Každá z těchto skupin obsahovala izoláty nebo podskupiny izolátů s vysoce pravděpodobnou epidemiologickou vazbou. Nejvýznamnější skupina zahrnovala všechny extenzivně rezistentní izoláty s geny pro ArmA a OXA-23 zachycené ve všech hlavních lokalitách.

3. Podrobná mikrobiologicko-epidemiologická analýza v Oblastní nemocnici Příbram a regionálně přílehlých ambulancích prokázala epidemické šíření dvou kmenů. První zahrnoval 15 multirezistentních izolátů od pacientů hospitalizovaných na chirurgickém lůžkovém oddělení mezi říjnem 2016 a červencem 2017, zatímco ke druhému kmenu patřilo 16 extenzivně rezistentních izolátů od pacientů téhož oddělení z července 2017 až března 2018. Pravděpodobnost epidemiologické vazby izolátů u obou kmenů podpořila časová návaznost hospitalizace kolonizovaných pacientů. V některých případech byly tyto kmeny izolovány až při kontrole v následné ambulantní péči.

4. Výsledky prokázaly pokračující výskyt a šíření extenzivně rezistentních kmenů ECII nenesoucích geny ArmA a OXA-23, které byly poprvé zachyceny v České republice v červnu 2015 a záhy se rozšířily v českých a moravských nemocnicích. Tyto kmeny jsou rezistentní ke všem klinicky využitelným antibiotikům vyjma kolistinu a mají značný potenciál šířit se mezi zdravotnickými zařízeními, a to zvláště skrze přesuny kolonizovaných pacientů.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Álvarez-Pérez, S., Lievens, B., Jacquemyn, H., Herrera, CM. (2013). *Acinetobacter nectaris* sp. nov. and *Acinetobacter boissieri* sp. nov., isolated from floral nectar of wild Mediterranean insect-pollinated plants *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 1532–1539.

Ambler, R.P. (1980). The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 289: 321–331.

Bakour, S., Alsharapy, S.A., Touati, A., Rolain, J.M. (2014). Characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates carrying bla(OXA-23) carbapenemase and 16S rRNA methylase armA genes in Yemen. *Microb. Drug. Resist.* 20: 604–609.

Bartual, S.G., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, M.A., Wisplinghoff, H., Rodríguez-Valera, F. (2005). Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4382–4390.

Baumann, P., Doudoroff, M., Stanier, R. Y. (1968). A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J. Bacteriol.* 95: 1520–1541.

Bou, G., Oliver, A., Martínez- Beltran, J. (2000). OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1556–1561.

Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.E., Gilbert, D. et al. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 48: 1–12.

Brigante, G., Migliavacca, R., Bramati, S., Motta, E., Nucleo, E., et al. (2012). Emergence and spread of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone producing both the carbapenemase OXA-23 and the 16S rRNA methylase ArmA. *J. Med. Microbiol.* 61: 653–661.

Brown, S., Young, H.K., Amyes, S. G. (2005). Characterisation of OXA- 51, novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin. Microbiol. Infect.* 11: 15–23.

CLSI. (2011). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 17th informational supplement M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

Caio, C., Maugeri, G., Zingali, T., Gona, F., Stefani, S., Mezzatesta, M.L. (2018). Extensively drug-resistant ArmaA-producing *Acinetobacter baumannii* in an Italian intensive care unit. *New Microbiol.* 41: 159–161.

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

D'Arezzo, S., Capone, A., Petrosillo, N., Visca, P., Ballardini, M. (2009). Epidemic multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* related to European Clonal Types I and II in Rome (Italy). *Clin. Microbiol. Infect.* 15: 347–357.

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

Da Silva, G.J., van Der Reijden, T., Domingues, S., Mendonça, N., Petersen, K., Dijkshoorn, L. (2014). Characterization of a novel international clonal complex (CC32) of *Acinetobacter baumannii* with epidemic potential. *Epidemiol. Infect.* 142: 1554–1558.

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

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

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

Dijkshoorn, L., Nemec, A. (2008). The diversity of the genus *Acinetobacter*. In: Gerischer U, ed. *Acinetobacter Molecular Biology*. Norfolk UK: Caister Academic Press. 1–34.

- Dijkshoorn, L., Nemec, A., Seifert, H. (2007). An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 939–951.
- Doi, Y., Arakawa, Y. (2007). 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin. Infect. Dis.* 45: 88–94.
- Doi, Y., Wachino, J., Arakawa, Y. (2016). Aminoglycoside resistance: the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 30, 523-537.
- Falagas, M.E., Bliziotis, I.A. (2007). Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int. J. Antimicrob. Agents.* 29: 630–636.
- Fitzpatrick, M.A., Ozer, E.A., Hauser, A.R. (2016). Utility of whole-genome sequencing in characterizing *Acinetobacter* epidemiology and analyzing hospital outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 54: 593–612.
- Freiwald, A., Sauer, S. (2009). Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 4: 732–742.
- Galimand, M., Courvalin, P., Lambert, T. (2003). Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 2565–2571.
- Gogou, V., Pournaras, S., Giannouli, M., Voulgari, E., Piperaki, E.T. et al. (2011). Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000- 09). *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 2767–2772.
- Gonzalez-Zorn, B., Teshager, T., Casas, M., Porrero, M.C., Moreno, M.A. et al. (2005). *armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 954–956.
- Héritier, C., Poirel, L., Nordmann, P. (2006). Cephalosporinase overexpression resulting from insertion of IS*Aba1* in *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 12: 123–130.
- Higgins, P.G., Dammhayn, C., Hackel, M., Seifert, H. (2010). Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65: 233–238.
- Higgins, P.G., Pérez-Llarena, F.J., Zander, E., Fernández, A., Bou, G., Seifert, H. (2013). OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57: 2121–2126.

Higgins, P.G., Poirel, L., Lehmann, M., Nordmann, P., Seifert, H. (2009). OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 5035–5038.

Higgins, P.G., Prior, K., Harmsen, D., Seifert, H. (2017). Development and evaluation of a core genome multilocus typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One.* 12: e0179228.

Hong, S.B., Shin, K.S., Ha, J., Han, K. (2013). Co-existence of *bla*_{OXA-23} and *armA* in multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from a hospital in South Korea. *J. Med. Microbiol.* 62: 836–844.

Houang, E.T., Chu, Y.W., Lo, W. S., Chu, K.Y., Cheng, A.F. (2003). Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (*arr-2*) and metallo- β -lactamase (*bla*_{IMP-4}) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1382–1390.

Hunter, P.R., Gaston, M.A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2465–2466.

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

Karah, N., Haldorsen, B., Hermansen, N.O., Tveten, Y., Ragnhildstveit, E. et al. (2011). Emergence of OXA-carbapenemase- and 16S rRNA methylase-producing international clones of *Acinetobacter baumannii* in Norway. *J. Med. Microbiol.* 60: 515–521.

Karthikeyan, K., Thirunarayan, M.A., Krishnan, P. (2010). Coexistence of *bla*_{OXA-23} with *bla*_{NDM-1} and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J. Antimicrob. Chemother.* 65: 2253–2254.

Kim, J.W., Heo, S.T., Jin, J.S., Choi, C. H., Lee, Y.C. et al. (2008). Characterization of *Acinetobacter baumannii* carrying *bla*_{OXA-23}, *bla*_{PER-1} and *armA* in a Korean hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* 14: 716–718.

Kladivová, L. (2014). Role efluxového systému AdeABC v rezistenci *Acinetobacter baumannii* k aminoglykozidům. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha.

Kořpa, M., Wałaszek, M., Gniadek, A., Wolak, Z., Dobroś, W. (2018). Incidence, Microbiological Profile and Risk Factors of Healthcare-Associated Infections in Intensive Care Units: A 10 Year Observation in a Provincial Hospital in Southern Poland. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 15: pii: E112.

Krizova, L., McGinnis, J., Maixnerova, M., Nemeč, M., Poirel, L. et al. (2015). *Acinetobacter variabilis* sp. nov. (formerly DNA group 15 *sensu* Tjernberg & Ursing), isolated from humans and animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65: 857–863.

Křížová, L., Paterová, P., Nemeč, A. (2012). Výskyt kmene *Acinetobacter baumannii* rezistentního ke karbapenemům a nesoucího geny *bla*_{OXA-23} a *bla*_{PER-1} ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Kniha abstrakt. 25. Pečenkovy epidemiologické dny. Harrachov 19.–21. 9. 2012. Str. 107.

Lee, H., Yong, D., Yum, J.H., Roh, K.H., Lee, K. et al. (2006). Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 56: 305–312.

Lowy, F.D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* 111, 1265–1273.

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

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

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

Milan, A., Furlanis, L., Cian, F., Bressan, R., Luzzati, R., et al. (2016). Epidemic dissemination of a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clone carrying *armA* two years after its first isolation in an Italian hospital. *Microb. Drug Res.* 22: 668–674.

Mugnier, P.D., Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P. (2010). Worldwide dissemination of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.* 16: 35–40.

Nemec, A. (2008). Multirezistentní *Acinetobacter baumannii*. *Klin. Mikrobiol. Infekc. Lek.* 14: 162–167.

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

Nemec, A., Dolzani, L., Brisse, S., van den Broek, P., Dijkshoorn, L. (2004b). Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J. Med. Microbiol.* 53: 1233–1240.

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

Nemec, A., Krizova, L. (2012). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the NDM-1 gene, Czech Republic, 2011. *Euro. Surveill.* 17): pii=20121.

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

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

Nemec, A., Maixnerová, M., van der Reijden, T.J.K., Jindrák, V., Smíšek, J., Dijkshoorn, L. (2006). Instability of amikacin resistance in a carbapenem-resistant strain of *Acinetobacter baumannii* isolated during a hospital outbreak. Programme and Abstract Book. The 7th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*: *Acinetobacter 2006*. Str. 18.

Nemec, A., Maixnerová, M., van der Reijden, T.J.K., van den Broek, P.J., Dijkshoorn, L. (2007). Relationship between the AdeABC efflux system gene content, netilmicin susceptibility and multidrug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 60: 483–489.

Paton, R., Miles, R.S., Hood, J., Amyes, S. G., Miles, R.S., Amyes, S. G. (1993). ARI1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2: 81–87.

Peleg, A.Y., Seifert, H., Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21: 538–582.

Poirel, L., Figueiredo, S., Cattoir, V., Carattoli, A., Nordmann, P. (2008). *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 1252–1256.

Poirel, L., Marqué, S., Héritier, C., Segonds, C., Chabanon, G., Nordmann, P. (2005). OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 202–208.

Poirel, L., Nordmann, P. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 12: 826–836.

Quinteira, S., Grosso, F., Ramos, H., Peixe, L. (2007). Molecular epidemiology of imipenem-resistant *Acinetobacter haemolyticus* and *Acinetobacter baumannii* isolates carrying plasmid-mediated OXA-40 from a Portuguese hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 3465–3466.

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

Roca, I., Espinal, P., Vila-Farres, X., Vila, J. (2012). The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front. Microbiol.* 3: 148.

Rossolini, G.M., Mantengoli, E. (2008). Antimicrobial resistance in Europe and its potential impact on empirical therapy. *Clin. Microbiol. Infect.* 14: 2–8.

Ruiz, M., Marti, S., Fernandez-Cuenca, F., Pascual, A., Vila, J. (2007). High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 1192–1198.

Senkyrikova, M., Husickova, V., Chroma, M., Sauer, P., Bardon, J., Kolar, M. (2013). *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 detected in the Czech Republic. *Springerplus* 2: 296.

Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S., Miller, G.H. (1993) Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57: 138–163.

Stietz, M.S., Ramírez, M.S., Vilacoba, E., Merkier, A.K., Limansky, A.S. et al. (2013). *Acinetobacter baumannii* extensively drug resistant lineages in Buenos Aires hospitals differ from the international clones I-III. *Infect. Genet. Evol.* 14: 294–301.

Strateva, T., Markova, B., Marteva-Proevska, Y., Ivanova, D., Mitov, I. (2012). Wide-spread dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase and ArmA 16S ribosomal RNA methylase in a Bulgarian university hospital. *Braz. J. Infect. Dis.* 16: 307–310.

Šedo, O., Nemeč, A., Křížová, L., Kačalová, M., Zdráhal, Z. (2013). Improvement of MALDI-TOF MS profiling for the differentiation of species within the *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* complex. *Syst. Appl. Microbiol.* 36: 572–578.

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

Talbot, G.H., Bradley, J., Edwards, J.E. Jr, Gilbert, D., Scheld, M., Bartlett, J.G. (2006). Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 42: 657–668.

Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E. et al. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233–2239.

- Tsakris, A., Ikonomidis, A., Pournaras, S., Tzouveleakis, L.S., Sofianou, D. et al. (2006). VIM-1 metallo- β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infect. Dis.* 12: 981–983.
- Turton, J.F., Gabriel, S.N., Valderrey, C., Kaufmann, M.E., Pitt, T.L. (2007) Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 807–815.
- Turton, J.F., Ward, M.E., Woodford, N., Kaufmann, M.E., Pike, R. et al. (2006). The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 258: 72–77.
- Turton, J.F., Woodford, N., Glover, J., Yarde, S., Kaufmann, M.E., Pitt, T.L. (2006). Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. *J. Clin. Microbiol.* 44: 2974–2976.
- Van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B. et al. (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 13(Suppl 3): 1–46.
- Van Dessel, H., Dijkshoorn, L., van der Reijden, T., Bakker, N., Paauw, A. et al. (2004). Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res. Microbiol.* 155: 105–112.
- Vila, J., Pachón, J. (2011). *Acinetobacter baumannii* resistant to everything: what should we do? *Clin. Microbiol. Infect.* 17: 955–956.
- Wong, D., Nielsen, T.B., Bonomo, R.A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., Spellberg, B. (2017). Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* 30: 409–447.
- Wright, G.D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 175–186.
- Yoon, E.J., Goussard, S., Touchon, M., Krizova, L., Cerqueira, G. et al. (2014). Origin in *Acinetobacter guillouiae* and dissemination of the aminoglycoside-modifying enzyme Aph(3′)-VI. *mBio* 5: e01972–14.
- Zhao, W.H., Hu, Z.Q. (2012). *Acinetobacter*: a potential reservoir and dispenser for β -lactamases. *Crit. Rev. Microbiol.* 38: 30–51.