

# Rezistence k aminoglykozidům u nemocničních kmenů *Acinetobacter baumannii* v České republice

A. NEMEC<sup>1,2</sup>, M. MAIXNEROVÁ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centrum epidemiologie a mikrobiologie SZÚ, <sup>2</sup>Ústav lékařské mikrobiologie, 3. lékařská fakulta UK Praha

## SOUHRN

Nemec A., Maixnerová M.: **Rezistence k aminoglykozidům u nemocničních kmenů *Acinetobacter baumannii* v České republice.**

**Cíl:** Prostudování povahy rezistence k aminoglykozidům u klinicky významných multirezistentních (MR) kmenů *Acinetobacter baumannii* z České republiky.

**Materiál a metody:** Studováno bylo 70 MR nemocničních kmenů z let 1991–2001, zařazených do panevropských klonů I ( $n = 41$ ) a II ( $n = 21$ ) a skupiny ostatních MR kmenů ( $n = 8$ ). Kontrolní skupinu tvořilo 15 přirozeně citlivých kmenů. Citlivost na aminoglykozidy byla vyšetřena diskovým difuzním testem a dilučním agarovým testem. Pomocí PCR byla stanovena přítomnost genů pro šest enzymů modifikujících aminoglykozidy a genu *adeB*, kódujícího složku efluxového systému AdeABC.

**Výsledky:** Rezistence MR kmenů k aminoglykozidům byla následující: kanamycin (93 %), gentamicin (87 %), amikacin (47 %), tobramycin (31 %) a netilmicin (17 %). Hodnoty minimálních inhibičních koncentrací pro netilmicin byly u 46 (66 %) MR kmenů 8–16 mg/l, zatímco u kontrolních citlivých kmenů dosahovaly 0,5–1,0 mg/l. Alespoň jeden gen pro modifikující enzym byl zjištěn u 66 (94 %) MR kmenů: *aphA1* ( $n = 56$ ), *aacC1* ( $n = 52$ ), *aphA6* ( $n = 39$ ), *aadB* ( $n = 20$ ). Přítomnost těchto genů a fenotypy rezistence ke kanamycinu, gentamicinu, tobramycinu a amikacinu byly téměř vždy v souladu. Geny pro enzymy modifikující netilmicin (*aacC2*, *aacA4*) nebyly prokázány. Celkem 56 (80 %) MR kmenů obsahovalo dva až čtyři různých genů v 8 kombinacích. Klony I a II sdílely všechny studované geny (s výjimkou *aadB* nevyskytujícího se u klonu I). Gen *adeB* byl prokázán u všech MR a osmi kontrolních citlivých kmenů.

**Závěr:** Na klinicky významné rezistenci k aminoglykozidům se u české nemocniční populace *A. baumannii* se významně podílejí enzymy pro modifikaci kanamycinu, gentamicinu, amikacinu a tobramycinu. Geny pro tyto enzymy se mohou horizontálně šířit a tvořit různé kombinace vedoucí ke komplexní rezistenci k vysokým koncentracím antibiotik. Role efluxového systému AdeABC ve snížení citlivosti k netilmicinu je pravděpodobná a vyžaduje další studium.

**Klíčová slova:** *Acinetobacter baumannii*, rezistence k aminoglykozidům, geny pro modifikující enzymy, efluxová pumpa, epidemické klony, Česká republika.

## SUMMARY

Nemec A., Maixnerová M.: **Aminoglycoside resistance of *Acinetobacter baumannii* hospital strains in the Czech Republic.**

**Objective:** To investigate the nature of aminoglycoside resistance of clinically important multidrug-resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* strains from the Czech Republic.

**Material and methods:** Seventy MDR hospital strains from 1991–2001 classified into pan-European clones I ( $n = 41$ ) and II ( $n = 21$ ) and a group of other MDR strains ( $n = 8$ ) were studied. Fifteen other strains wild-type susceptible to aminoglycosides were used as controls. Susceptibility to aminoglycosides was determined by the disk diffusion and agar dilution tests. The presence of six genes encoding different aminoglycoside-modifying enzymes (AME) and of the *adeB* gene encoding a component of the AdeABC efflux pump was detected using PCR.

**Results:** MDR strains showed the following pattern of resistance to aminoglycosides: kanamycin (93 %; inhibition zone diameters  $\leq 13$  mm), gentamicin (87 %; MICs  $\geq 16$  mg/l), amikacin (47 %; MICs  $\geq 64$  mg/l), tobramycin (31 %; MICs  $\geq 16$  mg/l) and netilmicin (17 %; MICs  $\geq 32$  mg/l). Forty-six (66 %) MDR strains had netilmicin MICs of 8–16 mg/l in contrast to 0.5–1.0 mg/l found for control susceptible strains. The presence of at least one of the following AME genes was detected in 66 (94 %) MDR strains: *aphA1* ( $n = 56$ ), *aacC1* ( $n = 52$ ), *aphA6* ( $n = 39$ ) and *aadB* ( $n = 20$ ). The presence of these genes and phenotypes of resistance to kanamycin, gentamicin, tobramycin and amikacin were in good agreement. The genes encoding netilmicin-modifying enzymes (*aacC2*, *aacA4*) were not detected in any strain. Fifty-six (80 %) MDR strains comprised two to four different AME genes in eight combinations. Clones I and II shared all of the genes studied (with the exception of *aadB* not detected in clone I). The gene *adeB* was found in all MDR strains and eight of 15 control susceptible strains.

**Conclusion:** Clinically relevant aminoglycoside resistance of Czech *A. baumannii* strains is significantly associated with the genes encoding enzymatic modification of kanamycin, gentamicin, amikacin and tobramycin. These genes can spread horizontally and emerge in different combinations leading to high-level resistance to multiple aminoglycosides. The AdeABC pump is likely to play a role in the intermediate susceptibility to netilmicin but further study is needed in this regard.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, aminoglycoside resistance, genes for modifying enzymes, efflux pump, epidemic clones, Czech Republic.

*Klin mikrobiol inf lék 2004;10(5):223–228*

**Adresa:** RNDr. Alexandr Nemeč, PhD., Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10, tel.: 267 082 266, fax: 272 730 428, e-mail: anemec@szu.cz

Došlo do redakce: 23. 8. 2004

Přijato k tisku: 14. 9. 2004

## Úvod

*Acinetobacter baumannii* je původcem nemocničních infekcí, postihujících zvláště kriticky nemocné pacienty v intenzivní péči [1]. Léčbu těchto infekcí komplikuje častá rezistence acinetobakterů k většině klinicky používaných antibiotik [2,3], jež v posledních letech zahrnuje i původně účinné karbapenemy [4]. Obavy ze selhání antibiotické léčby vedou ke hledání nových léčebných a preventivních postupů [5], jejichž předpokladem je podrobná znalost molekulární povahy, genetiky a epidemiologie rezistence.

Předchozí studie prokázaly u rodu *Acinetobacter* značnou rozmanitost mechanismů rezistence k aminoglykozidům [6,7]. Klinickou rezistenci často způsobuje enzymatická modifikace (inaktivace) aminoglykozidů acetyltransferázami (AAC), nukleotidyltransferázami (ANT, AAD) nebo fosfotransferázami (APH) [6]. Tyto enzymy mají mnoho strukturálně a funkčně odlišných forem. Funkční rozdíly zahrnují polohu modifikované chemické skupiny v molekule antibiotika a účinnost této modifikace u různých aminoglykozidů. Klinicky významnou rezistenci působí také snížená propustnost buněčné stěny, která brání dosažení účinné koncentrace antibiotika v místě cílové struktury [7]. Na rozdíl od modifikujících enzymů bývá tato rezistence kvantitativně nižší a nespecifická, tj. zahrnuje všechny aminoglykozidy a další antibiotika. Podobně, nedávno popsán efluxový systém AdeABC, snižuje citlivost k řadě antibiotik včetně aminoglykozidů [8]. Informace o významu a rozšíření tohoto systému u klinických izolátů však dosud chybí.

Všechny zmíněné mechanismy rezistence se vyskytují u *A. baumannii*, který zahrnuje převážnou většinu klinicky významných a multirezistentních (MR) izolátů acinetobakterů [8–11]. Nedávné studie identifikovaly mezi evropskými MR a epidemickými kmeny *A. baumannii* tři klonální uskupení. Klony I a II byly popsány u izolátů ze severozápadní Evropy z let 1982–1990 [12] a tyto klony převažovaly v období 1991–2001 mezi nemocničními kmeny v České republice [13,14]. Klon III byl popsán u kmenů izolovaných v západní Evropě a Španělsku v letech 1997–1998 [15]. Srovnávací analýza determinant rezistence u stabilních klonálních populací nabízí možnost studia vzniku a šíření multirezistence u *A. baumannii*.

Cílem této práce bylo prostudovat povahu rezistence k aminoglykozidům u nemocničních kmenů *A. baumannii* z České republiky. Byly vyšetřeny fenotypy citlivosti ke klinicky významným aminoglykozidům a přítomnost genů pro modifikující enzymy a efluxový systém AdeABC; výsledky byly porovnány s klasifikací kmenů do klonálních uskupení provedenou v předchozích studiích [13,14].

## Materiál a metody

**Kmeny.** Studovaný soubor obsahoval 85 kmenů *A. baumannii* z České republiky, které byly podrobně taxonomicky a epidemiologicky charakterizovány v předchozích sděleních [13,14]. Šlo o klinicky významné izoláty z let 1991–2001 pocházející z 19 nemocnic ve 13 městech. Kmeny byly zařazeny do MR klonů I ( $n = 41$ ) a II ( $n = 21$ ), skupiny ostatních MR kmenů ( $n = 8$ ) a skupiny citlivých ( $n = 15$ ) kmenů [13,14]. Poslední skupina zahrnovala kmeny s přirozenou (*wild-type*) citlivostí k aminoglykozidům, které jsou dále označovány jako *přirozeně citlivé* (pro odlišení od citlivosti k jednotlivým antibiotikům). Údaje o původu a vlastnostech kmenů jsou dostupné na <http://www.szu.cz/cem/supplement/04/ankmil1.pdf>.

**Vyšetření citlivosti na antibiotika.** Diskovou difúzní metodou, standardizovanou podle NCCLS [16], byla vyšetřena citlivost na ( $\mu\text{g}/\text{disk}$ ): kanamycin (30), gentamicin (10), netilmicin (30), tobramycin (10), amikacin (30) (Oxoid) a isepamicin (30) (Bio-Rad). Minimální inhibiční koncentrace (MIK) pro gentamicin, netilmicin, tobramycin a amikacin (MAST) byly stanoveny agarovou diluční metodou podle NCCLS [17]. Půdy s Mueller-Hintonovým agarem (Oxoid) byly inkubovány 18–20 h při 36,5–37,0 °C. Všechna vyšetření byla provedena dvakrát a při neshodě výsledků dvakrát opakována. Pokud se MIK i po opakovaném vyšetření lišily, byla použita vyšší hodnota (rozdíly činily nejvýše jedno ředění). Kmeny byly klasifikovány jako citlivé, intermediální nebo rezistentní podle kritérií NCCLS [16,17].

**Průkaz genů pro rezistenci k aminoglykozidům.** Přítomnost genů pro šest modifikujících enzymů a efluxový systém AdeABC byla vyšetřena pomocí PCR (*tabulka 1*).

Tabulka 1  
Studované geny pro rezistenci k aminoglykozidům

Gen	Protein	Fenotyp rezistence*	Primery pro PCR (reference)
<i>aacC1</i>	AAC(3)-Ia	Gen	Noppe-Leclercq et al. (1999) [18]
<i>aphA1</i>	APH(3')-Ia	Kan	Noppe-Leclercq et al. (1999) [18]
<i>aphA6</i>	APH(3')-VIa	Kan, Ami, Ise	Vila et al. (1999) [10]
<i>aadB</i>	ANT(2'')-Ia	Kan, Gen, Tob	Noppe-Leclercq et al. (1999) [18]
<i>aacC2</i>	AAC(3)-IIa	Gen, Tob, Net	Noppe-Leclercq et al. (1999) [18]
<i>aacA4</i>	AAC(6')-Ib	Kan, Tob, Ami, Net	Noppe-Leclercq et al. (1999) [18]
<i>adeB</i>	AdeB	(Gen), (Net)	Magnet et al. (2001) [8]

\* Uvedena jsou pouze antibiotika použita v této studii: Ami, amikacin; Gen, gentamicin; Ise, isepamicin; Kan, kanamycin; Net, netilmicin; Tob, tobramycin (platí i pro *tabulku 5*). Závorky označují intermediální citlivost.

Modifikující enzymy byly vybrány na základě literárních údajů a výsledků pilotní studie, provedené ve spolupráci s dr. G. Millerem (Schering-Plough Institute) pro 30 českých izolátů *A. baumannii*. Pro detekci genů byly použity primery popsané v literatuře (tabulka 1). Každá reakční směs (20  $\mu$ l) obsahovala 10  $\mu$ l Taq PCR Master Mix (Qiagen), 0,2  $\mu$ M primeru a 1,5  $\mu$ l roztoku templátové DNA, získané alkalickou lýzou [19]. Parametry PCR byly: 2 min při 94 °C a 30 cyklů 30 s při 94 °C, 30 s při 55 °C a 60 s při 72 °C. Amplifikovaná DNA byla detekována horizontální elektroforézou v 2% agarózovém gelu.

## Výsledky

V tabulce 2 je uvedena citlivost studovaných MR kmenů ke klinicky významným aminoglykozidům, tabulka 3 shrnuje výskyt jednotlivých genů pro rezistenci. *Přirozeně citlivé* kmeny neobsahovaly žádný ze studovaných genů pro modifikující enzymy. Údaje o citlivosti jednotlivých kmenů jsou dostupné na <http://www.szu.cz/cem/supplement/04/ankmil1.pdf>.

**Kanamycin.** Průměry inhibičních zón (IZ) měly bimodální rozložení: 20 kmenů mělo IZ v rozmezí 22–25 mm, zatímco 64 kmenů netvořilo žádnou zónu. Celkem 65 (93 %) MR kmenů bylo rezistentních ke kanamycinu a všechny tyto kmeny obsahovaly alespoň jeden gen pro enzym modifikující kanamycin: *aphA1* ( $n = 56$ ), *aphA6* ( $n = 39$ ) a *aadB* ( $n = 20$ ). Tyto geny neobsahovaly žádný kmen citlivý ke kanamycinu. Zóna 11 mm u jediného kmene obsahujícího pouze *aadB* odpovídá nižší inaktivační účinnosti nukleotidyltransferázy ANT(2'')-Ia.

**Gentamicin (tabulka 4a).** Kvalitativní interpretace průměrů IZ a MIK se shodovaly. Celkem 61 MR kmenů bylo rezistentních a osm MR kmenů mělo ve srovnání s *přirozeně citlivými* kmeny snížené hodnoty citlivosti (IZ 14–17 mm, MIK 2–8 mg/l). Z genů pro enzymy modifikující gentamicin byly zjištěny *aacC1* a *aadB*. S výjimkou tří kmenů byl alespoň jeden z těchto genů prokázán u všech kmenů rezistentních ke gentamicinu.

**Tobramycin (tabulka 4b).** Kvalitativní interpretace průměrů IZ a MIK se shodovaly s výjimkou čtyř kmenů, které byly intermediálně citlivé podle MIK (8 mg/l) a citlivé podle IZ (15–16 mm). Gen *aadB* se s výjimkou dvou kmenů vyskytoval u všech kmenů rezistentních k tobramycinu a nebyl přítomen v žádném z ostatních kmenů.

**Amikacin (tabulka 4c), Isepamicin.** Rozložení hodnot citlivosti a jejich kvalitativní interpretace pro amikacin a isepamicin se shodovaly (údaje pro isepamicin nejsou uvedeny). Interpretace průměrů IZ a MIK pro amikacin se lišila pouze u pěti kmenů, které byly intermediálně citlivé podle MIK (32 mg/l) a rezistentní podle IZ (12–14 mm). Gen pro modifikaci amikacinu (*aphA6*) byl zjištěn u všech kmenů rezistentních k amikacinu podle MIK i IZ (s výjimkou jednoho kmene s MIK 128 mg/l), u pěti kmenů rezistentních podle IZ a intermediálně citlivých podle MIK a u dvou kmenů s MIK 8–16 mg/l.

**Netilmicin (tabulka 4d).** Téměř všechny MR kmeny měly MIK vyšší než *přirozeně citlivé* kmeny, s maximem kolem breakpointu pro citlivost 46 (66 %) MR kmenů mělo MIK 8–16 mg/l. MIK 64 mg/l (IZ 11 mm) byla zjištěna u dvou kmenů, MIK > 64 mg/l (žádná IZ) u jediného kmene. Kvalitativní interpretace průměrů IZ a MIK se lišila u 18 kmenů: pět kmenů bylo rezistentních podle MIK (32 mg/l) a intermediálně citlivých podle IZ (13–14 mm), 13 kmenů bylo intermediálně citlivých podle MIK (16 mg/l) a citlivých podle IZ (15–16 mm). U žádného kmene nebyly prokázány geny pro inaktivaci netilmicinu (*aacC2*, *aacA4*).

**Kombinace genů pro modifikující enzymy.** Tabulka 5 shrnuje kombinace genů pro modifikující enzymy, zjištěné u jednotlivých MR kmenů. Celkem 56 (80 %) MR kmenů obsahovalo dva až čtyři různé geny, 10 kmenů neslo po jednom genu a u čtyř kmenů nebyl žádný gen prokázán.

**Efluxový systém AdeABC.** Všechny MR kmeny a osm *přirozeně citlivých* kmenů obsahovalo *adeB*, u sedmi *přirozeně citlivých* kmenů nebyl tento gen prokázán. Přítomnost *adeB* neměla u *přirozeně citlivých* kmenů žádný vliv na hodnoty MIK ani průměrů IZ.

Tabulka 2  
Citlivost multirezistentních kmenů *A. baumannii* k aminoglykozidům podle minimálních inhibičních koncentrací

Antibiotikum	Breakpoint (mg/l) podle NCCLS [17]	Počet citlivých kmenů (n = 70)
Gentamicin	≤ 4	7 (10 %)
Tobramycin	≤ 4	44 (63 %)
Amikacin	≤ 16	32 (46 %)
Netilmicin	≤ 8	43 (61 %)

Tabulka 3  
Výskyt genů pro rezistenci k aminoglykozidům u multirezistentních kmenů *A. baumannii*

Gen	Klon I (n = 41)	Klon II (n = 21)	Ostatní MR kmeny (n = 8)	Celkem kmenů (n = 70)
<i>aacC1</i>	36*	16	0	52 (74 %)
<i>aphA1</i>	34	16	6	56 (80 %)
<i>aphA6</i>	32	6	1	39 (56 %)
<i>aadB</i>	16	0	4	20 (29 %)
<i>aacC2</i>	0	0	0	0
<i>aacA4</i>	0	0	0	0
<i>adeB</i>	41	21	8	70 (100%)

\* Uvedeny jsou počty kmenů obsahujících příslušný gen.

## Diskuze

Z výsledků této studie plyne, že klinicky významná rezistence k aminoglykozidům je u českých kmenů *A. baumannii* převážně způsobena enzymatickou modifikací antibiotik acetyltransferázou AAC(3)-Ia, nukleotidyltransferázou ANT(2'')-Ia a fosfotransferázami APH(3')-Ia a APH(3')-VIa. Geny pro tyto enzymy se mohou u jednotlivých kmenů různě kombinovat, což přispívá ke komplexnosti a výši rezistence. Přítomnost těchto genů se shodovala s fenotypem rezistence pro kanamycin, gentamicin, tobramycin,

amikacin a isepamicin. Pouze u čtyř kmenů s vysokou rezistencí k těmto antibiotikům nebyl zjištěn gen pro odpovídající modifikující enzym. V těchto případech může jít o sníženou propustnost buněčné stěny, nadměrnou expresi efluxového systému, neznámý mechanismus rezistence nebo o kombinace těchto faktorů. Citlivost k amikacinu zjištěná u dvou kmenů s genem pro APH(3')-VIa může naopak plynout z nedostatečné genové exprese, nebo vyšší propustnosti buněčné stěny.

Magnet et al. ve své práci z roku 2001 popsali novou ef-

Tabulka 4

Distribuce hodnot citlivosti u přirozeně citlivých a multirezistentních kmenů *A. baumannii*, členěných podle přítomnosti genů pro inaktivaci příslušných aminoglykozidů

## a) Gentamicin

Kmeny	MIK (mg/l)* [průměr inhibičních zón (mm)]					Celkem kmenů
	16→32 [NZ-11]	8 [14-15]	4 [15-17]	1-2 [17-20]	0,25-0,5 [20-22]	
MR + <i>aacC1/aadB</i> **	58	0	0	0	0	58
MR - <i>aacC1/aadB</i>	3	2	5	2	0	12
Přirozeně citlivé	0	0	0	0	15	15

## b) Tobramycin

Kmeny	MIK (mg/l)* [průměr inhibičních zón (mm)]					Celkem kmenů
	16→16 [NZ-11]	8 [15-16]	4 [16-17]	2 [18-21]	0,5-1 [21-22]	
MR + <i>aadB</i>	20	0	0	0	0	20
MR - <i>aadB</i>	2	4	3	31	10	50
Přirozeně citlivé	0	0	0	0	15	15

## c) Amikacin

Kmeny	MIK (mg/l)* [průměr inhibičních zón (mm)]					Celkem kmenů
	64→128 [NZ-12]	32 [12-14]	8-16 [16-19]	2-4 [20-23]	0,5-1 [22-23]	
MR + <i>aphA6</i>	32	5	2	0	0	39
MR - <i>aphA6</i>	1	0	3	23	4	31
Přirozeně citlivé	0	0	0	0	15	15

## d) Netilmicin

Kmeny	MIK (mg/l)* [průměr inhibičních zón (mm)]					Celkem kmenů
	32→64 [NZ-14]	16 [14-16]	8 [16-19]	2-4 [19-23]	0,5-1 [23-25]	
MR	12	15	31	9	3	70
Přirozeně citlivé	0	0	0	0	15	15

\* První sloupec uvádí počty kmenů s MIK pro rezistenci, druhý sloupec kmeny s MIK pro intermediální citlivost a ostatní sloupce kmeny s MIK pro citlivost [17]. NZ – žádná inhibiční zóna.

\*\* Multirezistentní (MR) kmeny obsahující alespoň jeden z uvedených genů.

luxovou pumpu (AdeABC), která u studovaného kmene *A. baumannii* snižovala citlivost k aminoglykozidům a dalším antibiotikům [8]. Tato pumpa je zvláště účinná pro hydrofóbní aminoglykozidy a může tudíž představovat dosud neprostudovaný typ rezistence (AAC(3)-?) spojený s intermediální citlivostí k netilmicinu a gentamicinu, který je široce rozšířený u *A. baumannii* [7]. Naše studie prokázala gen pro AdeB u všech MR kmenů. V souladu s tím je zjištění, že tyto kmeny obvykle měly intermediální nebo sníženou citlivost k netilmicinu a že jejich MIK pro ostatní aminoglykozidy (po vyloučení rezistence způsobené enzymatickou modifikací) odpovídaly údajům ze zmíněné studie [8]. Gen *adeA* se však vyskytoval i u osmi z 15 kmenů s MIK přirozeně citlivé populace, u nichž neměl vliv na kvantitativní hodnoty citlivosti. Vysvětlení tohoto jevu nabízí právě uveřejněná práce, jejíž autoři studovali citlivý kmen *A. baumannii*, obsahující geny pro pumpu AdeABC [20]. Molekulární analýza spontánních mutant rezistentních ke gentamicinu odvozených z tohoto kmene ukázala, že původní citlivý fenotyp byl důsledkem striktní regulace dvousložkovým systémem AdeRS. Spontánní mutace v genech pro tento systém vedly ke konstitutivní expresi pumpy a rezistenci, resp. snížené citlivosti. Naše výsledky ohledně netilmicinu naznačují, že konstitutivně exprimovaná pumpa se pravidelně vyskytuje u MR kmenů, které disponují dalšími mechanismy rezistence, vyskytujícími se u různých kmenů v různých kombinacích. Aktivace efluxového systému tak může být prvním krokem, umožňujícím přežívání původně dobře citlivých kmenů v prostředí s antibiotiky, na něž navazuje akvizice specifických a vysoce účinných mechanismů rezistence.

České MR kmeny neobsahovaly geny pro enzymy inaktivující netilmicin (AAC(3)-IIa, AAC(6')-Ib), které jsou běžně rozšířené u kmenů acinetobakterů v jiných zemích [6,7]

a které se vyskytují i u západoevropských kmenů *A. baumannii* náležejících do klonů I a II [21]. Rozdíly mezi geograficky oddělenými populacemi klonálně příbuzných kmenů mohou plynout z lokálních odlišností ve složení dostupných genů, nebo v aplikaci jednotlivých antibiotik [7]. Absence, nebo nízký výskyt genů pro enzymatickou modifikaci netilmicinu tak může souviset s dlouhodobě nízkou spotřebou tohoto antibiotika v České republice.

Studované české MR kmeny *A. baumannii* patřily většinou do panevropských klonů I a II, které byly původně popsány mezi izoláty ze severozápadní Evropy z 80. let [12–14]. Uvnitř těchto klonů existuje určitá typová variabilita (v biotypech, sérotypech či plazmidových profilech), která je pravděpodobně důsledkem postupné diverzifikace spojené s jejich šířením [13,14]. Naše výsledky ukazují, že tato variabilita zahrnuje i geny pro rezistenci k aminoglykozidům. S výjimkou *aadB* se všechny geny, i některé jejich kombinace, vyskytovaly u kmenů obou klonálních linií a lze tudíž předpokládat, že mezi populacemi dvou nejrozšířenějších klonů, sdílejících stejné prostředí, dochází k horizontálnímu přenosu genů. Tento předpoklad podporuje zjištění, že u obou klonů se vyskytují shodné strukturální typy integrónů nesoucích *aacC1* [21].

Výsledky vyšetření citlivosti ukázaly, že aminoglykozidy mají pouze omezenou hodnotu pro léčbu infekcí vyvolaných MR kmeny *A. baumannii*. Gentamicin je v podstatě neúčinný, a to díky častému výskytu modifikujících enzymů i poměrně vysokým hodnotám MIK u MR kmenů bez těchto enzymů (pravděpodobně způsobených derepresí efluxové pumpy). Počet kmenů plně rezistentních k netilmicinu byl nejnižší, ale klinická účinnost tohoto antibiotika zůstává otázkou, protože MIK většiny MR kmenů se pohybuje kolem breakpointu pro citlivost. Příznivější rozložení hodnot MIK měly tobramycin a amikacin. Protože rezistenci k to-

Tabulka 5  
Sestavy genů pro modifikující enzymy u jednotlivých multirezistentních kmenů *A. baumannii*

Sestava genů	Asociovaný fenotyp rezistence	Klon I (n = 41)	Klon II (n = 21)	Ostatní MR kmeny (n = 8)	Celkem kmenů (n = 70)
<i>aacC1, aphA1, aphA6, aadB</i>	Gen, Kan, Ami, Ise, Tob	11	0	0	11 (16 %)
<i>aacC1, aphA1, aphA6</i>	Gen, Kan, Ami, Ise	15	5	0	20 (29 %)
<i>aacC1, aphA1, aadB</i>	Gen, Kan, Tob	2	0	0	2 (3 %)
<i>aacC1, aphA6, aadB</i>	Gen, Kan, Ami, Ise, Tob	1	0	0	1 (1 %)
<i>aacC1, aphA6</i>	Gen, Kan, Ami, Ise	1	0	0	1 (1 %)
<i>aacC1, aphA1</i>	Gen, Kan	6	10	0	16 (23 %)
<i>aphA6, aadB</i>	Gen, Kan, Ami, Ise, Tob	2	0	1	3 (4 %)
<i>aphA1, aadB</i>	Gen, Kan, Tob	0	0	2	2 (3 %)
<i>aacC1</i>	Gen	0	1	0	1 (1 %)
<i>aphA6</i>	Kan, Ami, Ise	2	1	0	3 (4 %)
<i>aphA1</i>	Kan	0	1	4	5 (7 %)
<i>aadB</i>	Gen, Kan, Tob	0	0	1	1 (1 %)
–	–	1	3	0	4 (6 %)

bramycinu a amikacinu u českých kmenů způsobují většínou různé enzymy (ANT(2'')-Ia, APH(3')-VIa), mohou být tato antibiotika vzájemnou alternativou při léčbě infekcí vyvolaných MR kmeny *A. baumannii*.

### Závěr

Klinickou rezistenci k aminoglykozidům u českých kmenů *A. baumannii* způsobuje především inaktivace antibiotik modifikujícími enzymy AAC(3)-Ia, APH(3')-Ia, APH(3')-VIa a ANT(2'')-Ia. Geny pro tyto enzymy se mohou v jednotlivých kmenech různě kombinovat a zajišťovat tak komplexní rezistenci k vysokým koncentracím aminoglykozidů. I když geny pro modifikaci netilmicinu nebyly zjištěny, pohybuje se citlivost většiny MR kmenů k tomuto antibiotiku na hranici klinické použitelnosti. Role efluxové pumpy AdeABC ve snížené citlivosti k netilmicinu a dalším antibiotikům je pravděpodobná a vyžaduje další studium. Účinnost aminoglykozidů na české MR kmeny je celkově nízká a může být dále snižována horizontálním šířením genů pro rezistenci pod selekčním tlakem antibiotik.

*Studie byla součástí projektu 310/01/1540 Grantové agentury České republiky.*

### Literatura

- Bergogne-Bérézin E, Towner K. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:148–165.
- Bergogne-Bérézin E. The increasing significance of outbreaks of *Acinetobacter* spp.: the need for control and new agents. *J Hosp Infect* 1995;30:441–452.
- Nemec A, Janda J, Melter O, Dijkshoorn L. Genotypic and phenotypic similarity of multiresistant *Acinetobacter baumannii* isolates in the Czech republic. *J Med Microbiol* 1999;48:287–296.
- Turner PJ, Greenhalgh JM, MYSTIC Study Group (Europe). The activity of meropenem and comparators against *Acinetobacter* strains isolated from European hospitals, 1997–2000. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:563–567.
- Urban C, Mariano N, Rahal JJ, et al. Polymyxin B-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolate susceptible to recombinant BPI<sub>21</sub> and cecropin P1. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:994–995.
- Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 1993;57:138–163.
- Miller GH, Sabatelli FJ, Naples L, Hare RS, Shaw KJ. The most frequently occurring aminoglycoside mechanisms – combined results of surveys in eight regions of the world. *J Chemother* 1995;7(Suppl 2):17–30.
- Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3375–3380.
- Vila J, Marcos A, Marco F, et al. In vitro antimicrobial production of beta-lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:138–141.
- Vila J, Ruiz J, Navia M, et al. Spread of amikacin resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemic strain. *J Clin Microbiol* 1999; 37:758–761.
- Seward RJ, Lambert T, Towner KJ. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. *J Med Microbiol* 1998;47:455–462.
- Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, et al. Comparison of outbreak and non-outbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 1996;34:1519–1525.
- Nemec A, van der Reijden TJK, Dijkshoorn L. Multirezistentní klony *Acinetobacter baumannii* v České republice. *Klin Mikrobiol Inf Léč* 2003;9:130–137.
- Nemec A, Dijkshoorn L, van der Reijden TJK. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. *J Med Microbiol* 2004;53:147–153.
- van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, et al. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res Microbiol* 2004;155:105–112.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard, 7th ed. (document M2–A7). Wayne, PA: NCCLS, 2000.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard, 6th ed. (document M7–A6). Wayne, PA: NCCLS, 2003.
- Noppe-Leclercq I, Wallet F, Haentjens S, et al. PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for *Acinetobacter baumannii*. *Res Microbiol* 1999;150:317–322.
- Nemec A, Dijkshoorn L, Ježek P. Recognition of two novel phenons of the genus *Acinetobacter* among non-glucose-acidifying isolates from human specimens. *J Clin Microbiol* 2000;38:3937–3941.
- Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3298–3304.
- Nemec A, Dolzani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside resistance genes and their association with class I integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol* 2004;53:1233–1240.