

Využití diskového difuzního testu v epidemiologické typizaci multirezistentních kmenů *Acinetobacter baumannii*

A. NEMEC

Státní zdravotní ústav, Praha

SOUHRN

Nemec A.: Využití diskového difuzního testu v epidemiologické typizaci multirezistentních kmenů *Acinetobacter baumannii*.

Cíl: Vyhodnotit účinnost diskového difuzního testu pro epidemiologickou typizaci nemocničních kmenů komplexu *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*.

Metodika: Antibiotika pro typizaci byla vybrána z 18 preparátů podle distribučních charakteristik a vzájemné korelace u epidemiologicky heterogenního souboru kmenů (n = 103). Sestavy průměrů inhibičních zón (kvantitativní antibiogramy) byly porovnány pomocí shlukové analýzy s euklidovskou vzdáleností (E) jako koeficientem podobnosti. Rozlišovací účinnost kvantitativního antibiogramu a dalších epidemiologických markerů byla vypočtena pomocí diskriminačního indexu (D) pro 57 epidemiologicky nesouvisejících kmenů. Stabilita a epidemiologická konkordance byla analyzována u devíti skupin, z nichž každá zahrnovala pouze izoláty s epidemiologickou vazbou (n = 46).

Výsledky: Typizační sestava zahrnovala 11 antibiotik (ampicilin+sulbaktam, piperacilin, ceftazidim, imipenem, ko-trimoxazol, ofloxacin, gentamicin, tobramycin, amikacin, netilmicin a tetracyklin). Reprodukovatelnost kvantitativního antibiogramu byla 97 % při E ≤ 8. Ve srovnání s ribotypizací a biotypizací dosáhla tato metoda nejvyšší rozlišovací účinnost pro multirezistentní kmeny *A. baumannii* (D = 0,95). Výsledkem numerické analýzy kvantitativních antibiogramů u 46 multirezistentních izolátů *A. baumannii* bylo osm zřetelně odlišených shluků. Sedm shluků zahrnovalo pouze izoláty s epidemiologickou vazbou a shodným genotypem, jeden shluk obsahoval izoláty dvou biochemicky i genotypově odlišných skupin a dva izoláty zůstaly z důvodu nestability rezistence nezařazeny.

Závěr: Analýza kvantitativních antibiogramů je vhodnou metodou typizace multirezistentních kmenů *A. baumannii*. Má vysokou rozlišovací účinnost a umožňuje diferencovat kmeny s podobným genotypem. Meze metody vyplývají z nestability markerů rezistence a fenotypové konvergence.

SUMMARY

Nemec A.: Use of the disk diffusion test for epidemiological typing of multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains.

Objective: To assess the efficacy of the disk diffusion test in epidemiological typing of hospital strains of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex.

Methods: The antibiotics for typing were selected from 18 drugs according to the distribution characteristics and correlation in 103 epidemiologically unrelated strains. Sets of inhibition zone diameters, i.e. quantitative antibiograms, were compared using cluster analysis with Euclidian distance as the criterion of similarity. To evaluate the discriminatory power of the quantitative antibiogram and other phenotypic and genotypic markers, discrimination indices (D) were calculated from the data obtained with 57 epidemiologically unrelated strains. Stability and epidemiologic concordance were tested in nine groups of epidemiologically related *A. baumannii* isolates (n = 46).

Results: Eleven antibiotics were selected for typing: ampicillin+sulbactam, piperacillin, ceftazidime, imipenem, co-trimoxazole, ofloxacin, gentamicin, tobramycin, amikacin, netilmicin and tetracycline. The reproducibility of the quantitative antibiograms was 97 % at the Euclidian distance lower than or equal to 8. Compared to ribotyping and biotyping, the discriminatory power of quantitative antibiogram typing was highest for the multiresistant strains of *A. baumannii* (D = 0,95). Numerical analysis of the antibiograms of 46 multiresistant *A. baumannii* isolates yielded eight distinct clusters which correlated with the epidemiological data and genotypic properties of the isolates. Each of seven clusters grouped only epidemiologically related isolates, while one cluster united the isolates belonging to two genetically and epidemiologically distinct groups, and two isolates remained unclustered due to their instability in resistance.

Conclusion: The similarity analysis of quantitative antibiograms is a suitable tool for typing multiresistant strains of *A. baumannii*, having a high discriminatory power and potential for differentiating strains with similar genotypes. Limits to the method are given by the instability of the resistance markers and phenotypic convergence.

Klin mikrobiol inf lek 1999;5(9-10):287-297

Adresa: RNDr. Alexandr Nemeč, Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10,
tel. 02/67 08 22 66, fax 02/72 73 04 28, e-mail: anemec@szu.cz

Došlo do redakce: 5. 10. 1999

Přijato k tisku: 20. 10. 1999

Úvod

Bakterie rodu *Acinetobacter* patří k významným původcům nemocničních infekcí. Kolonizují a infikují dýchací a močový trakt, popálené plochy a rány, mohou vyvolávat meningitidy a sepse [1]. Největší riziko představují pro pacienty vyžadující intenzivní péči spojenou s invazivními léčebnými a diagnostickými zákroky. Na anesteziologicko-resuscitačních odděleních a jednotkách intenzivní péče způsobují až 8 % všech infekcí bakteriální etiologie [2]. Opakovaně bylo doloženo hromadné šíření kmenů, a to v podobě epidemického i dlouhodobého endemického výskytu [3,4,5].

Epidemické a endemické kmeny jsou často rezistentní k řadě původně účinných antibiotik, zvl. ze skupin β-laktamů, aminoglykosidů a fluorochinolonů [3].

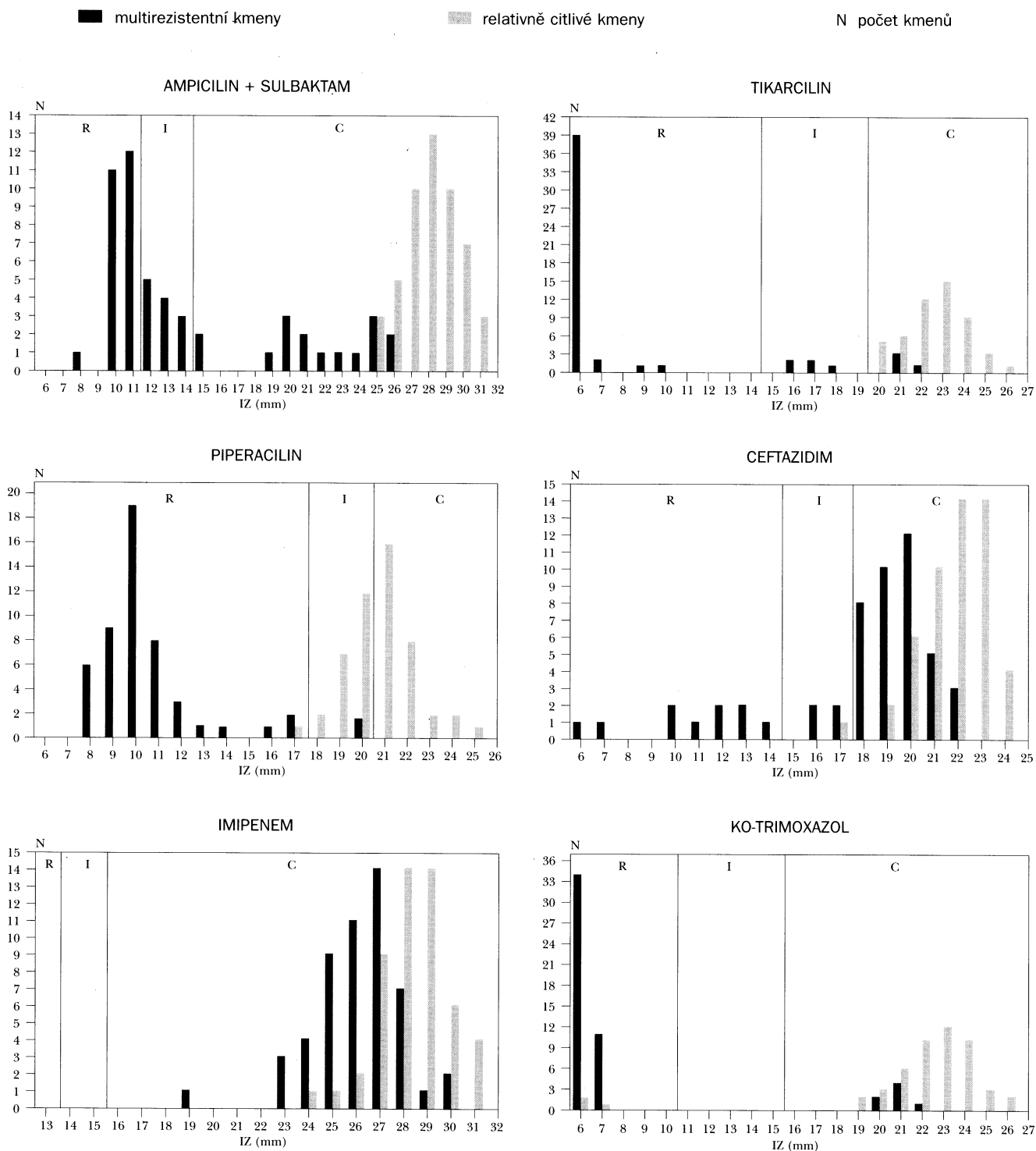
Klinicky a epidemiologicky nejvýznamnější skupinou rodu je komplex *A. calcoaceticus-A. baumannii* (*Acb*), který výrazně převažuje mezi nemocničními kmeny acinetobakterů [6,7,8]. Komplex *Acb* zahrnuje čtyři fenotypově podobné avšak genotypově distinktní druhy, resp. genomospecies: *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, genomospecies 3 a genomospecies 13TU [9]. Nejčastěji je izolován *A. baumannii*, k němuž patří převážná většina

na multirezistentních a hromadně se vyskytujících kmenů [8,10]. Komplexní subspecifická analýza nemocničních kmenů pocházejících z různých míst severozápadní Evropy prokázala, že většina epidemických kmenů *A. baumannii* náleží do dvou genotypově diskrétních skupin, tzv. epidemických klonů I a II [11]. Multirezistentní kmeny s podobnými vlastnostmi se často izolují i v České republice [10].

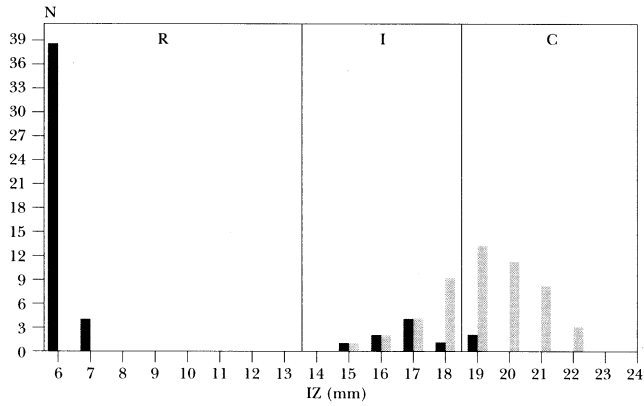
Předpokladem účinné kontroly nemocničních infekcí je dostupnost typizační metody umožňující rychlé a spolehlivé odlišení izolátů epidemického, resp. endemického kmene od ostatních kmenů téhož druhu. Nejúčinnější jsou metody strukturální analýzy genomu, zvláště makrorestrikční analýza DNA spojená se separací DNA v pulzním elektrickém poli [4,12], ribotypizace [12,13] nebo metody založené na polymerázové řetězové reakci

Obr. 1

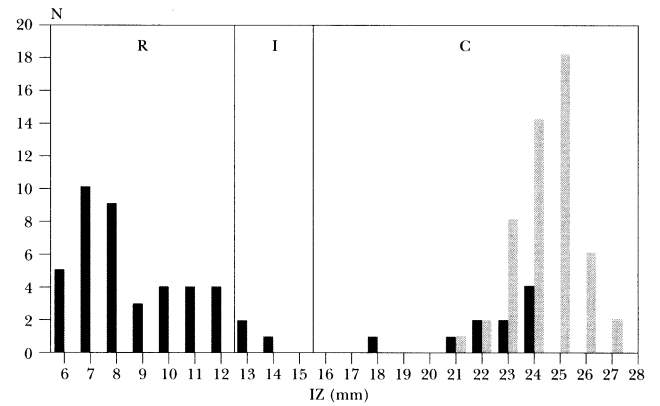
Distribuce průměrů inhibičních zón u 52 multirezistentních a 51 relativně citlivých kmenů komplexu *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*. Kmeny jsou kategorizovány na rezistentní (R), intermediálně citlivé (I) a citlivé (C) podle hraničních průměrů inhibičních zón (IZ) doporučených NCCLS



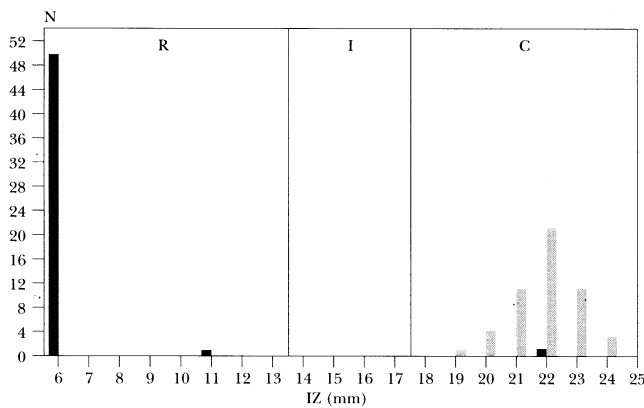
NALIDIXOVÁ KYSELINA



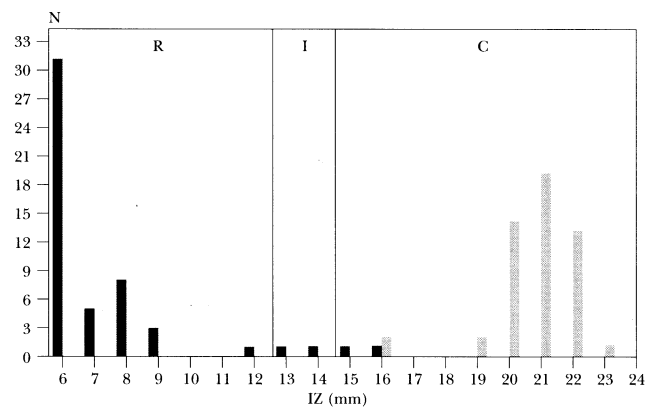
OFLOXACIN



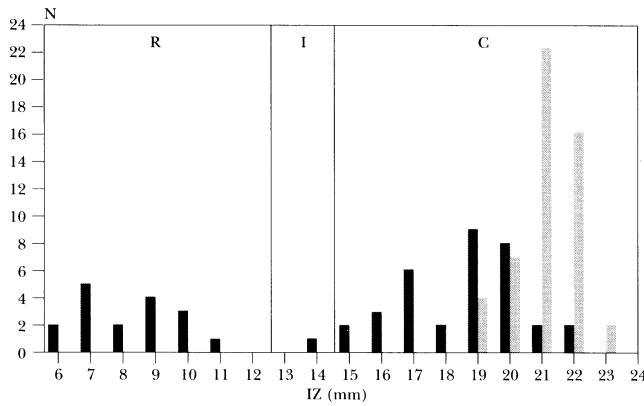
KANAMYCIN



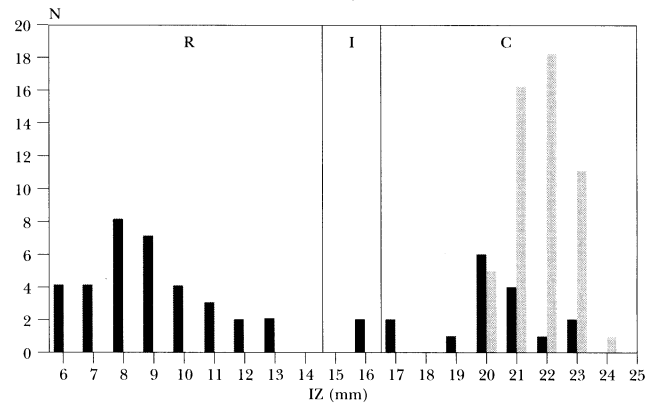
GENTAMICIN



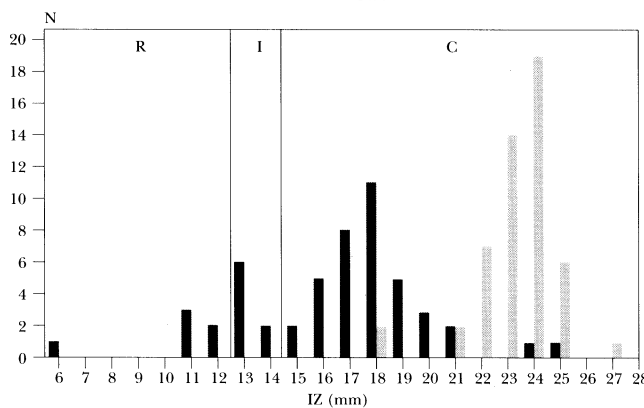
TOBRAMYCIN



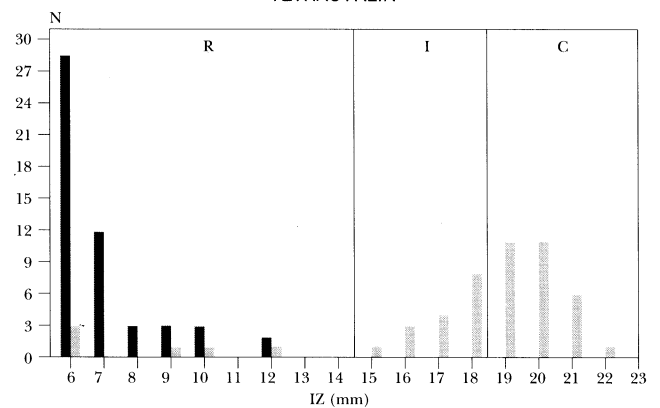
AMIKACIN



NETILMICIN



TETRACYKLIN



[4,14]. Tyto metody však vyžadují nákladné přístrojové a materiálové vybavení a nejsou dostupné pro rutinní klinické laboratoře. Vyšetření citlivosti pomocí diskového difuzního testu je oproti tomu ekonomicky nenáročné a jeho výsledky jsou dostupné již v první etapě bakteriologické analýzy.

Cílem této studie bylo vyhodnotit účinnost diskového difuzního testu pro epidemiologickou typizaci nemocničních kmenů komplexu *Acb*. Kvantitativní výsledky testu a jejich kvalitativní interpretace byly analyzovány podle doporučení Evropské studijní skupiny pro epidemiologické markery [15]. Podle distribučních charakteristik 18 antibiotik a jejich vzájemné korelace u epidemiologicky heterogenního souboru kmenů byla vybrána typizační sestava, u níž byla stanovena reprodukovatelnost a rozlišovací účinnost. Stabilita a epidemiologická konkordance byla testována na devíti skupinách epidemiologicky souvisejících izolátů.

Materiál a metody

Kmeny. Soubor *A* zahrnoval 103 kmenů komplexu *Acb*, které byly detailně fenotypově a genotypově charakterizovány v předchozím sdělení [10]. Soubor byl vybrán z více než 400 klinických izolátů komplexu *Acb* zaslaných do Státního zdravotního ústavu v letech 1991 - 1997 tak, aby zahrnoval kmeny maximálně heterogenní v čase a místě izolace. Všechny kmeny byly izolovány z klinického materiálu hospitalizovaných pacientů a pocházely ze 40 nemocničních oddělení ve 14 městech. 77 kmenů bylo identifikováno jako *A. baumannii*, 14 jako genomspesies 3, 10 jako genomspesies 13TU, 1 jako *A. calcoaceticus* a 1 kmen nebyl jednoznačně zařazen. Podle kvalitativní citlivosti k osmi antibiotikům

(ampicilin-sulbaktam, tikarcilin, ceftazidim, ofloxacin, ko-trimoxazol, gentamicin, tobramycin a amikacin) byly v souboru rozlišeny dvě skupiny: 1) *multirezistentní* kmeny (n = 52, pouze *A. baumannii*) rezistentní nejméně ke dvěma antibiotikům (průměrně pět až šest rezistencí na kmen) a 2) *relativně citlivé* kmeny (n = 51) citlivé ke všem antibiotikům (n = 48) nebo rezistentní pouze ke ko-trimoxazolu (n = 3).

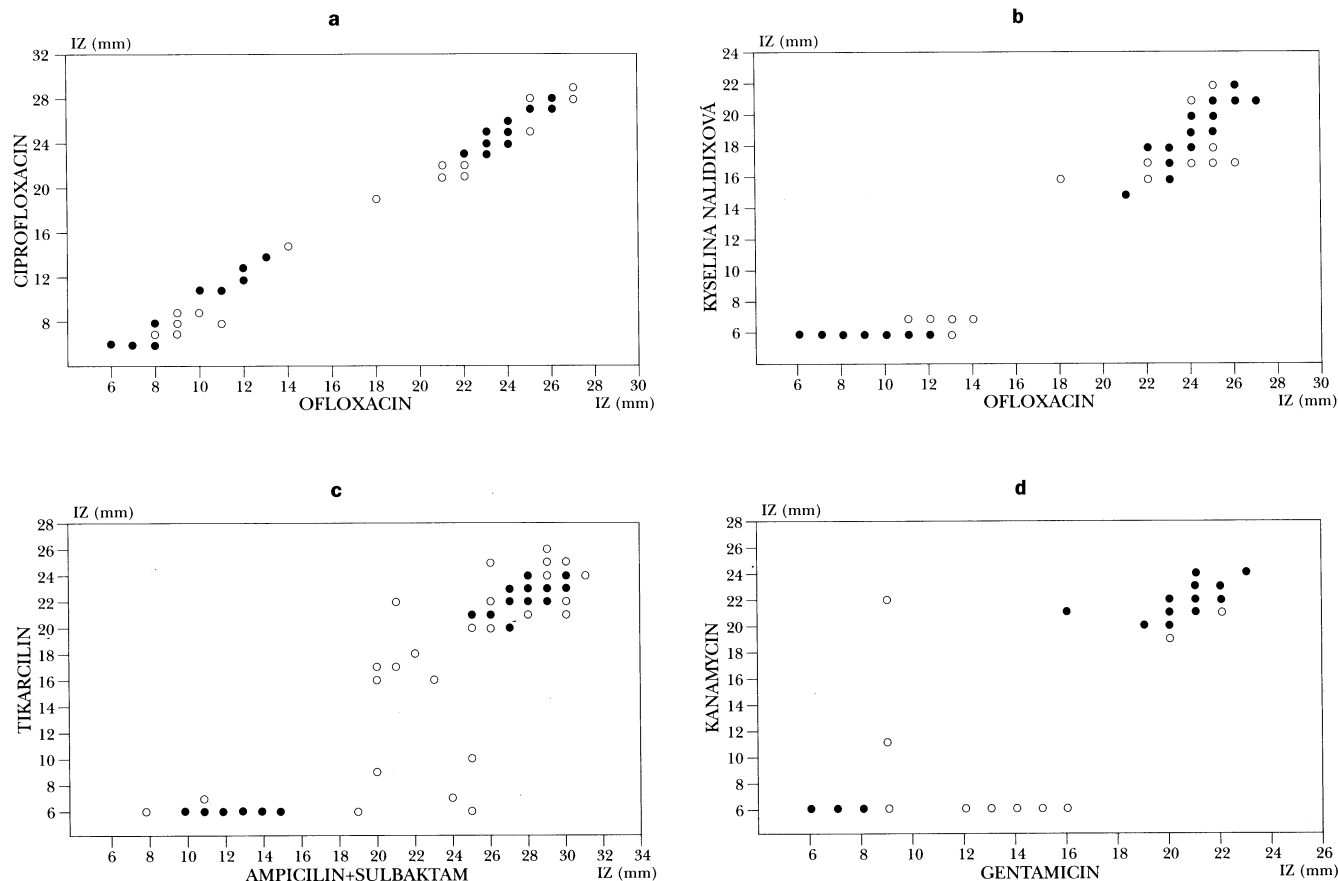
Soubor *B* zahrnoval devět skupin, z nichž každá obsahovala čtyři až šest izolátů komplexu *Acb* pocházejících z téhož nemocničního oddělení (tabulka 1). Izoláty byly zachyceny během explozivního nebo endemického výskytu či během systematického monitorování multirezistentních kmenů acinetobakterů a jejich epidemiologická vazba byla předběžně ověřena restrikční analýzou buněčné DNA pomocí endonukleázy *HindIII*.

Ribotypizace. Buněčná DNA izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí [13] byla štěpena restrikční endonukleázou *EcoRI*. Elektroforeticky rozdělená DNA byla vakuově přenesena na nylonovou membránu (Zeta-Probe, Bio-Rad) a hybridizována s rDNA značenou digoxigeninem, která byla připravena reverzní transkripcí z 16S-23S rRNA (Boehringer) [10]. Fragменты DNA s navázanou sondou byly imunochemicky detekovány soupravou DIG Nucleic Acid Detection Kit (Boehringer). Druhá identifikace byla provedena porovnáním *EcoRI* profilů studovaných izolátů s profily referenčních kmenů komplexu *Acb* [13]. Ribotyp definovaný pro účely subspecifické analýzy zahrnoval pouze identické profily.

Biotypizace a číselné označení jednotlivých biotypů byly provedeny podle typizačního schématu Bouveta a Grimonta, založeném

Obr. 2

Rozložení průměrů inhibičních zón u dvojic antibiotik s největší korelací
○ hodnoty zjištěné u jediného kmene ● hodnoty zjištěné u dvou nebo více kmenů



Tabulka 1
Původ epidemiologicky souvisejících izolátů komplexu *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*

| Skupina | Izoláty č. | Lokalita | Oddělení | Převažující materiál | Časové rozmezí izolace |
|---------|------------------------------|---------------|---------------|----------------------|------------------------|
| A | 220, 221, 222, 223 | Kladno | novorozenecké | sputum | 22. 1. - 24. 3. 1993 |
| B | 154, 160, 162, 167, 172, 186 | Praha | popáleninové | různý | 3. 8. - 22. 10. 1993 |
| C | 359, 360, 361, 362, 363 | Plzeň | ARO | sputum | 29. 8. - 3. 9. 1994 |
| D | 307, 340, 342, 343, 349, 350 | Ostrava | popáleninové | stěr z popáleniny | 25. 1. - 27. 5. 1994 |
| E | 302, 304, 317, 318, 354 | Kladno | ARO | sputum | 27. 6. - 9. 9. 1994 |
| F | 656, 657, 658, 659, 660, 661 | Praha | neurologické | sputum | 1. 4. - 4. 4. 1996 |
| G | 481, 718, 719, 723, 729 | Č. Budějovice | ARO | sputum | 3. 3. - 23. 8. 1997 |
| H | 720, 721, 731, 865 | Č. Budějovice | pediatrické | sputum | 30. 7. - 29. 11. 1997 |
| I | 471, 480, 691, 867, 869 | Č. Budějovice | ARO | různý | 20. 1. - 28. 11. 1997 |

na rozdílech v utilizaci levulinátu, citrkonátu, fenylacetátu (L-fenylalaninu), 4-hydroxybenzoátu a L-tartrátu [7].

Makrorestrikční analýza (PFGE). Pro přípravu chromozomální DNA v agarózových bločcích byla modifikována metoda podle de Lencastre et al. [16]. 0,5 ml bujonové (TSB, Difco) kultury (kultivace 16 h při 30 °C) bylo zahuštěno centrifugací, sediment promyt v 0,5 ml pufru PIV (10 mM Tris pH 8,0, 1 M NaCl) a koncentrace buněk byla upravena na OD₅₉₀ = 8,0. Agarózy disky o objemu 20 µl byly připraveny z buněčné suspenze smíchané v ekvivalentním poměru se 100 µl 1% agarózy (Low-gelling-temperature, Sea Plaque, FMC Bioproducts). Disky byly inkubovány 3 h při 37 °C v 1 ml pufru EC (6 mM Tris pH 8,0, 1 M NaCl, 0,1M EDTA pH 8,0, 0,2% deoxycholat sodný, 0,5% Sarkosyl) obsahujícím lysozym (100 µg/ml), lysostafin (50 µg/ml) a RNázu A (50 µg/ml), poté 17 h při 50 °C v roztoku proteinázy K (1 mg/ml) v 1 ml pufru ES (0,5 M EDTA pH 9,0, 1% Sarkosyl) a nakonec pětkrát promyty ve 13 ml pufru TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7,5). DNA byla štěpena restriční endonukleázou *Apa*I (New England BioLabs) a restriční fragmenty byly separovány v 1% agaróze (SeaKem LE, FMC Bioproducts) a TBE pufru (45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá, 1 mM EDTA pH 8,0) na zařízení CHEF-DR III (Bio-Rad). Elektroforéza probíhala 20 h při 14 °C a lineárním zvyšování délky pulzů od 4 do 28 s. Jako molekulový standard byl použit 50 kb λ DNA ladder (New England BioLabs). Podobnost profilů byla interpretována podle doporučení Tenovera et al. [17].

Antibiogram. Citivost na 18 antibiotik byla vyšetřena diskovou difuzní metodou na Mueller Hinton agaru (Oxoid) standardizovanou podle NCCLS [18]. Testovány byly (µg/disk): ampicilin (10), ampicilin+sulbaktam (10 + 10), áztreonam (30), cefotaxim (30), ceftazidim (30), imipenem (10), piperacilin (100), tikarcilin (75), amikacin (30), gentamicin (10), kanamycin (30), netilmicin (30), tobramycin (10), tetracyklin (30), ciprofloxacín (5), kyselina nalidixová (30), ofloxacin (5) a ko-trimoxazol (sulfametoxazol + trimetoprim: 23,75 + 1,25) (Oxoid). Půdy byly inkubovány 18 - 20 hodin při 37 °C, průměry inhibičních zón (IZ) byly měřeny posuvným měřítkem. Jako standard pro stanovení reprodukovatelnosti jednotlivých měření byl použit relativně citlivý kmen *A. baumannii* 56, u souboru B navíc multirezistentní kmen *A. baumannii* 470. Kmeny byly klasifikovány jako citlivé, intermediárně citlivé nebo rezistentní podle kritérií NCCLS [18].

Terminologie. Termín „antibiotikum“ je použit pro všechny studované látky s antibakteriální aktivitou a jejich dvojkombinace. „Kvantitativní antibiogram“ je sestava průměrů IZ (y mm) k testovaným antibiotikům.

Výpočet podobnosti a statistická analýza. Statistické výpočty byly provedeny v programovém prostředí Statistica 5.1 (StatSoft).

Korelace mezi průměry IZ pro jednotlivá antibiotika byla vypočtena pomocí Spearmanova koeficientu (r). K vyjádření podobnosti kvantitativních antibiogramů byla použita euklidovská vzdálenost (E) udávající vzdálenost ve vícerozměrném prostoru, na jehož souřadnicích jsou vyneseny průměry IZ pro jednotlivá antibiotika [19]. Shlukovací metodou pro konstrukci fenogramů byla UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Averages). Rozlišovací účinnost (*discriminatory power*) byla vyjádřena pomocí diskriminačního indexu [20]:

$$D = 1 - 1/N(N-1) \sum_{j=1}^N a_j$$

kde N je celkový počet kmenů v testovaném souboru a a_j je počet kmenů, které nelze odlišit od j -tého kmene. D vyjadřuje pravděpodobnost, s níž budou odlišeny dva náhodně vybrané kmeny z testovaného souboru, a nabývá hodnot v intervalu $<0,1>$ (při $D = 1$ lze vzájemně odlišit všechny kmeny). Za hraniční hodnotu pro statistickou použitelnost metody je považována $D = 0,9$ [21].

Výsledky Soubor A

Distribuce průměrů inhibičních zón. Obrázek 1 ukazuje rozložení citlivosti pro 14 antibiotik, u nichž byla zřetelně odlišena relativně citlivá a rezistentní populace. Pouze v případě imipenemu tvořily všechny kmeny nediferencovaný shluk v citlivé oblasti. U ampicilinu, cefotaximu a áztreonamu nebylo rozlišení na populace zjevné a všechny kmeny byly podle hraničních průměrů IZ kategorizovány jako rezistentní nebo intermediárně citlivé. Rozlišení kmenů na *multirezistentní* a *relativně citlivé* vymezilo populace primárně citlivých kmenů s přibližně normálním rozložením hodnot. Interpretace citlivosti podle hraničních průměrů IZ neodpovídala vždy rozložení naměřených hodnot. Například u ampicilinu+sulbaktamu byly kmeny tvořící diskrétní populaci se sníženou citlivostí zařazeny do všech tří kategorií citlivosti a u kyseliny nalidixové, piperacilinu a tetracyklinu byla značná část relativně citlivé populace klasifikována jako intermediárně citlivá.

Korelační analýza. Nejvyšší korelace byla zjištěna u dvojic: ofloxacin a ciprofloxacín ($r = 0,98$), ofloxacin a nalidixová kyselina ($r = 0,92$), ciprofloxacín a nalidixová kyselina ($r = 0,91$), tikarcilin a ampicilin+sulbaktam ($r = 0,90$), kanamycin a gentamicin ($r = 0,89$), piperacilin a tikarcilin ($r = 0,89$), tikarcilin a kanamycin ($r = 0,89$). Na obr. 2a a 2b je znázorněno vzájemné rozložení průměrů IZ pro chinolonová antibiotika. Hodnoty pro ciprofloxacín a ofloxacin korelovaly v celé kvantitativní škále; rozdíl mezi ofloxacinem a nalidixovou kyselinou (podobně mezi ciprofloxacínem a nalidixovou kyselinou) byl dán pouze nižším rozlišením rezistentních kmenů kyselinou nalidixovou. V případě β-laktamů byla

podobná závislost zjištěna u kombinace ampicilin+sulbaktam a tikarcilinu (obr. 2c), v případě aminoglykosidů u gentamicinu a kanamycinu (obr. 2d). Rezistentní kmeny byly méně rozlišeny tikarcilinem a kanamycinem. Pouze jediný kmen byl rezistentní ke gentamicinu a citlivý ke kanamycinu.

Typizační sestava. Podle distribuce průměrů IZ a korelace chemicky příbuzných preparátů a s přihlédnutím ke klinické použitelnosti bylo pro typizaci vybráno 11 antibiotik (ampicilin+sulbaktam, piperacilin, ceftazidim, imipenem, ko-trimoxazol, ofloxacin, gentamicin, tobramycin, amikacin, netilmicin a tetracyklin). Z původní sestavy byly kromě neúčinného ampicilinu, aztreonamu a cefotaximu vyřazeny ciprofloxacin, nalidixová kyselina, tikarcilin a kanamycin, a to z důvodu zmíněné vysoké korelace s jinými antibiotiky a nižší diferenciací rezistentních kmenů.

Reprodukovatelnost. Na obr. 3 je znázorněna distribuce euklidovských vzdáleností vypočtených pro dvojice nezávislých vyšetření u 65 kmenů. Hodnoty E byly u 63 kmenů menší než 8, pouze ve dvou případech (kmeny č. 48 a 78) byly výrazně vyšší ($E = 17,5$, resp. 16,7). $E = 8$, při níž bylo dosaženo 97% reprodukovatelnosti, byla zvolena za hraniční hodnotu, pod níž lze rozdíly považovat za

náhodné a nevýznamné pro rozlišení kmenů. Reprodukovatelnost profilů rezistence stanovených podle hraničních průměrů pro tutéž sestavu experimentálních údajů byla při požadavku naprosté shody profilů pouhých 83 %. Důvodem byl většinou rozdíl v rezistenci k jednomu antibiotiku, vyplývající z drobných oscilací kolem hraničních průměrů. Pokud byl kritériem pro rozlišení profilů rozdíl v rezistenci nejméně ke dvěma antibiotikům, dosáhla reprodukovatelnost 98 %.

V tabulce 2 jsou uvedeny průměry IZ pro izoláty reprezentující „rezistentní“ a „citlivé“ subpopulace kmenů č. 48 a 78. Zatímco u ostatních kmenů dosahovaly rozdíly průměrů IZ při opakovaném vyšetření 1 - 3 mm (výjimečně 4 mm), byly u těchto kmenů zjištěny rozdíly odpovídající vzdálenosti rezistentní a citlivé populace komplexu *Acb* (viz obr. 1). V případě 48a/48b byl tento rozdíl pouze u ko-trimoxazolu, u 78a/78b současně u některých β -laktamových antibiotik (ampicilin+sulbaktam, tikarcilin, piperacilin) a aminoglykosidů (kanamycin, gentamicin). Obě subpopulace bylo možno z původních kultur získat opakovaně; u kmene 78 vždy s kvantitativním antibiogramem odpovídajícím buď izolátu 78a, nebo 78b. Makrorestrikční analýza DNA pomocí *ApaI* vyloučila

Tabulka 2
Průměry inhibičních zón (v mm) u subpopulací kmenů 48 a 78

| Kmen č. | AMS | TIC | PIP | CTZ | CTX | IMI | AZT | COT | NAL | OFL | KAN | GEN | TOB | AMI | NET | TET |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 48a | 15 | 6 | 11 | 20 | 16 | 28 | 11 | 6 | 18 | 23 | 6 | 6 | 17 | 18 | 13 | 6 |
| 48b | 12 | 6 | 12 | 22 | 17 | 29 | 12 | 24 | 18 | 24 | 6 | 6 | 18 | 18 | 14 | 6 |
| 78a | 15 | 6 | 13 | 21 | 14 | 30 | 8 | 6 | 7 | 13 | 6 | 9 | 22 | 23 | 22 | 6 |
| 78b | 26 | 21 | 20 | 20 | 13 | 28 | 8 | 6 | 7 | 13 | 23 | 19 | 21 | 23 | 20 | 6 |

Zkratky: AMS ampicilin + sulbaktam; TIC tikarcilin; PIP piperacilin; CTZ ceftazidim; CTX cefotaxim; IMI imipenem; AZT aztreonam; COT ko-trimoxazol; NAL nalidixová kyselina; OFL ofloxacin; KAN kanamycin; GEN gentamicin; TOB tobramycin; AMI amikacin; NET netilmicin; TET tetracyklin

Tabulka 3
Hodnoty diskriminačního indexu pro čtyři typizační metody

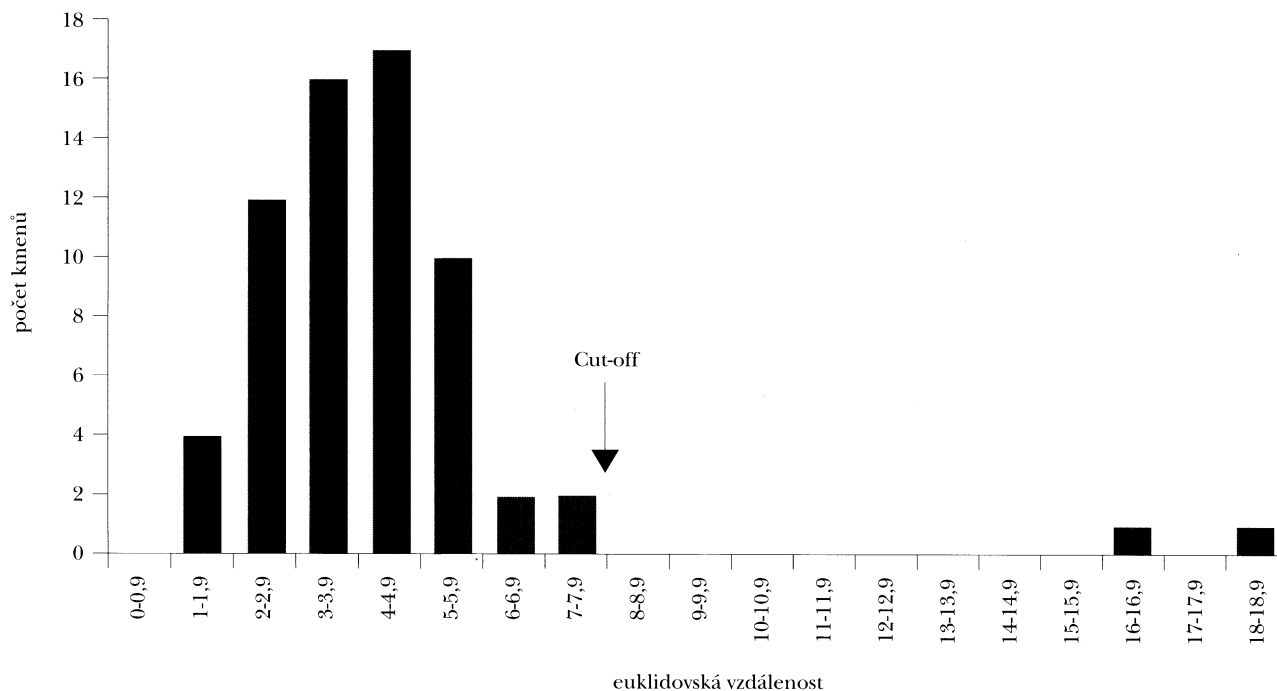
| Epidemiologický marker | Multirezistentní a relativně citlivé kmeny (n = 57) | Multirezistentní kmeny (n = 35) |
|---------------------------|--|------------------------------------|
| Kvantitativní antibiogram | 0,905 | 0,951 |
| Profil rezistence | 0,799 | 0,818 |
| <i>EcoRI</i> ribotyp | 0,814 | 0,523 |
| Biotyp | 0,795 | 0,674 |

Tabulka 4
Genotypové a biochemické vlastnosti epidemiologicky souvisejících izolátů

| Skupina | Počet izolátů | Klon | <i>EcoRI</i> ribotyp | <i>ApaI</i> PFGE | Biotyp |
|---------|---------------|------|----------------------|------------------|--------|
| A | 4 | II | B | a | 2 |
| B | 6 | I | A | b | 6 |
| C | 5 | I | A | c | 6 |
| D | 6 | I | A | d | 11* |
| E | 5 | | D | e | 6 |
| F | 6 | | C | f | 2 |
| G | 5 | I | A | g | 6 |
| H | 4 | | C | h | 2 |
| I | 5 | II | B | i | 2 |

* jeden izolát nerostl na žádném z testovaných substrátů

Obr. 3
Distribuce euklidovských vzdáleností pro dvojice nezávislých vyšetření kvantitativního antibiogramu u 65 kmenů komplexu *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*



v obou případech možnost kontaminace jiným kmenem: 48a/48b měly shodné profily, u 78a/78b byl zjištěn rozdíl pouze ve velikosti největšího fragmentu.

Rozlišovací účinnost. Rozlišovací účinnost typizační sestavy byla stanovena pro 35 *multirezistentních* a 22 *relativně citlivých* kmenů *A. baumannii*, vybraných ze souboru A tak, aby každou lokalitu reprezentoval pouze jeden kmen s určitou kombinací genotypových markerů (*EcoRI* ribotyp, plazmidový profil) a biotypu. Tím se snížila pravděpodobnost, že v souboru budou zahrnuty mnohočetné izoláty endemických kmenů. Na obr. 4 je uveden fenogram podle kvantitativních antibiogramů s vyznačením ribotypů a biotypů. Na hladině $E = 8$ bylo rozlišeno 8 shluků a 17 jednotlivých kmenů. Zatímco většina *relativně citlivých* kmenů tvořila jediný shluk, byly *multirezistentní* kmeny klasifikovány do šesti menších shluků a 15 jednotlivých kmenů. S tím kontrastovala biochemická a genotypová heterogenita *relativně citlivých* kmenů a nízká diverzita *multirezistentních* kmenů. V tabulce 3 jsou uvedeny hodnoty diskriminačního indexu pro typizaci podle kvantitativních antibiogramů a profilů rezistence, ribotypizaci a biotypizaci. Pouze u kvantitativního antibiogramu byly dosaženy přijatelné hodnoty indexu pro celý soubor a *multirezistentní* kmeny.

Soubor B

Vlastnosti a klonální příslušnost. Podle *EcoRI* ribotypů byly všechny izoláty identifikovány jako *A. baumannii*. Z tabulky 4 je zřejmé, že izoláty každé skupiny byly genotypově a biochemicky homogenní. Jedinou výjimkou byl izolát č. 350, který na rozdíl od ostatních izolátů skupiny D nerostl na žádném substrátu. V několika případech byly u izolátů téže skupiny zjištěny rozdíly v *Apal* profilech. Tyto rozdíly se týkaly polohy nejvýše tří fragmentů a byly vysvětlitelné jako důsledek jediné genetické události (např. ztráty nebo vytvoření cílové sekvence pro restrikční endonukleázu). Oproti tomu byly rozdíly mezi profily různých skupin větší a epidemiologicky nesouvisející izoláty mohly být spolehlivě od-

lišeny (viz obr. 5). *EcoRI* ribotyp a biotypy zjištěné u skupin B, C, D a G odpovídaly epidemickému klonu I, vlastnosti skupin A a I epidemickému klonu II.

Kvantitativní antibiogram. Na obr. 6 je znázorněn fenogram podle průměrů IZ. Výsledky pro referenční kmeny č. 56 a 470 se shlukovaly na hladině $E = 4$. Shluky odpovídající jednotlivým skupinám epidemiologicky souvisejících izolátů byly rozlišeny při $E = 6 - 7$. Shluky 1 - 7 zahrnovaly pouze epidemiologicky související izoláty se shodným genotypem; shluk 8 obsahoval izoláty biochemicky i genotypově odlišných skupin B a I. Dva izoláty zůstaly nezařazené. Izolát č. 659 se k ostatním izolátům skupiny E připojoval na hladině $E = 12$ a lišil se od nich pouze citlivostí na amikacin ($IZ = 22$ mm oproti 7 mm u ostatních izolátů). Druhý nezařazený izolát, č. 222, se lišil od ostatních izolátů skupiny A kvantitativní i kvalitativní citlivostí na všechny aminoglykosidy a chinolony a některá β -laktamová antibiotika. S výjimkou piperacilinu byl ke všem antibiotikům citlivější s průměrem IZ u některých antibiotik dokonce větším, než je běžné u citlivých kmenů (např. $IZ = 30$ mm pro ofloxacin, $IZ = 25$ mm pro amikacin). Tento izolát jako jediný nepocházel z klinického materiálu, ale byl izolován z respirátoru během epidemie na novorozeneckém oddělení.

Diskuze

Kvalitativní interpretace průměrů IZ nebo minimálních inhibičních koncentrací (MIK) je běžnou součástí studií zabývajících se typizací nemocničních kmenů acinetobakterů [10,22,23]. Použití pevných interpretačních kritérií pro tento účel je však problematické. 1) Jsou-li hodnoty citlivosti blízké hraničním hodnotám, mohou být příbuzné izoláty při chybě, která i za důsledné standardizace činí u diskového testu 1 - 3 mm, zařazené do různých vzorců rezistence. 2) Hraniční hodnoty definované pro terapeutické účely nemusejí být v souladu s rozložením kvantitativní citlivosti u studované bakteriální populace (v této studii např. ampicilin+sulbaktam, piperacilin). 3) Kvalitativní kategorizace vede ke ztrátě infor-

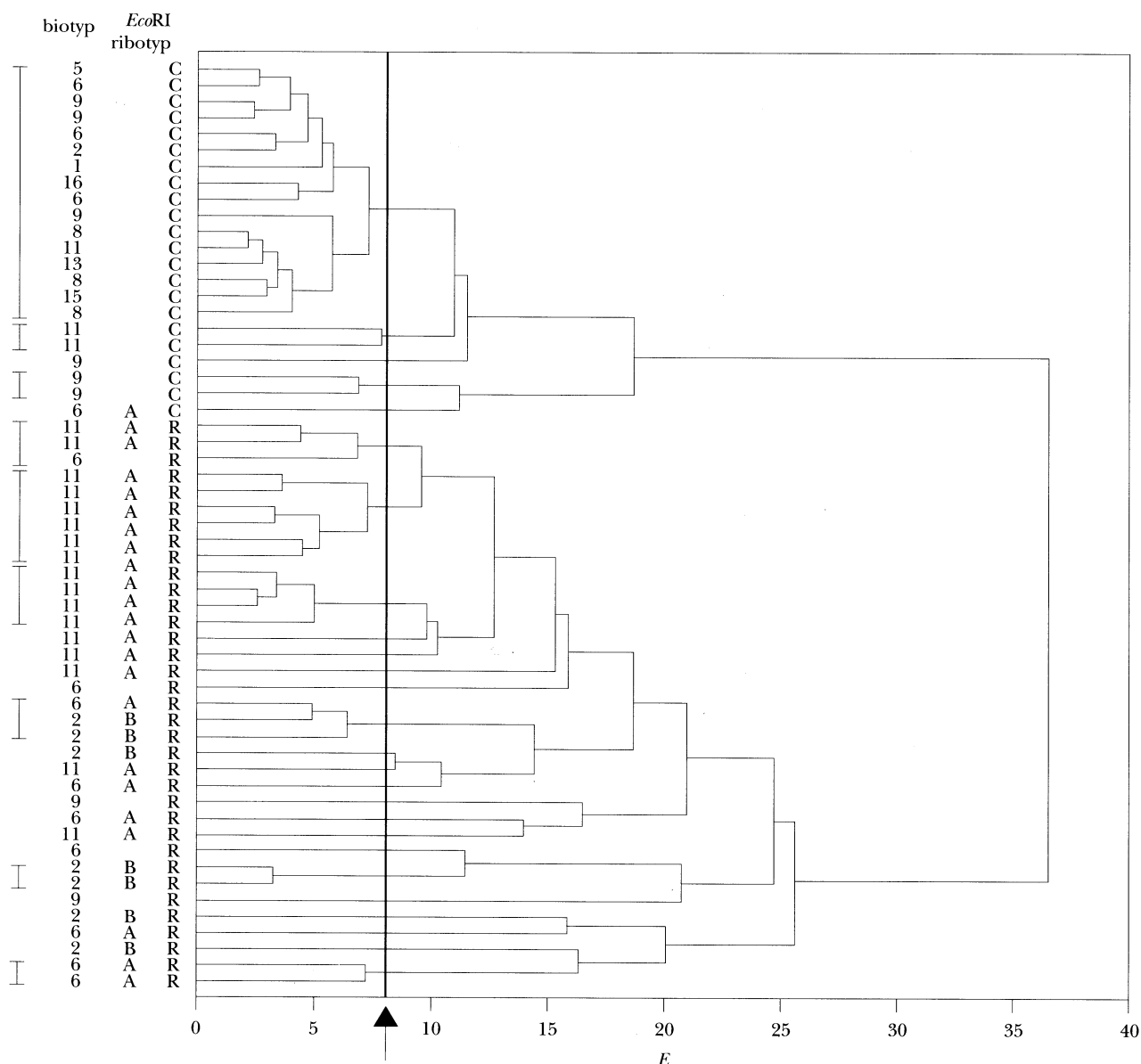
mace. Z uvedených výsledků vyplývá, že průměry IZ multirezistentních kmenů se u řady antibiotik pohybují v širokém rozmezí (např. fluorochinolony, aminoglykosidy, ceftazidim, ampicilin+sulbaktam), které může být východiskem pro citlivější rozlišení kmenů.

Problémům s hraničními hodnotami se lze vyhnout přímým porovnáním kvantitativních hodnot citlivosti. Pro zvýšení účinnosti antibiogramu při surveillance nemocničních infekcí navrhli Giacca et al. numerickou analýzu průměrů IZ v diskovém difuzním testu [24]. Tento postup byl použit i pro typizaci nemocničních kmenů acinetobakterů [25,26], avšak bez definovaného výběru antibiotik a stanovení základních parametrů vyjadřujících statistickou spolehlivost metody [15].

Typizační sestava určená pro klinickou laboratoř musí zahrnovat pouze běžná antibiotika, jejichž počet však nemá být menší než 10 [27]. Vyloučena mají být primárně neúčinná antibiotika a preparáty, u nichž se neočekává vznik rezistence (např. polymyxiny). Při výběru diskriminující sestavy je nutné vycházet ze znalosti distribuce sekundární rezistence u populace reprezentující relevantní klinicko-epidemiologický a geografický kontext [15]. Vysoká prevalence určitých typů rezistence může omezit rozlišovací účinnost metody. Vazbu lze očekávat u chemicky příbuzných antibiotik se společným molekulárním základem rezistence, což se v této studii potvrdilo u chinolonových antibiotik. Korelační analýza prokázala také vazbu kanamycinu a tikarcilinu, tj. mezi preparáty, u nichž nelze předpokládat společný mechanismus rezistence. Tato vazba

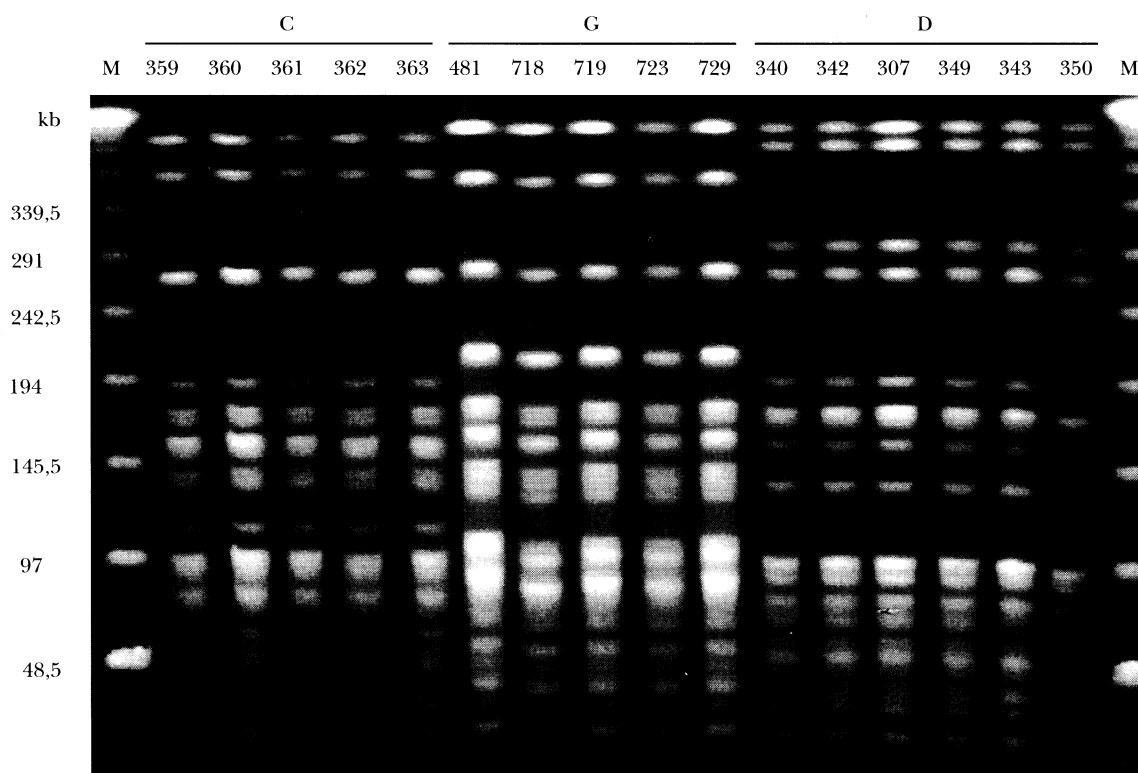
Obr. 4

Fenogram podle průměrů inhičních zón pro 11 antibiotik u 57 epidemiologicky nesouvisejících kmenů *A. baumannii*. Koeficientem podobnosti byla euklidovská vzdálenost (E), shlukovací metodou UPGMA. Kmeny jsou rozlišeny na multirezistentní (R) a relativně citlivé (C), výsledky biotypizace a ribotypizace byly převzaty z předchozího sdělení [10]. *EcoRI* ribotyp A odpovídá epidemickému klonu I, ribotyp B klonu II, ostatní kmeny měly jedinečné ribotypy. Úsečky vymezují shluky definované na hladině $E=8$



Obr. 5

Makrorestrikční analýza tří skupin epidemiologicky souvisejících izolátů *A. baumannii* náležejících do epidemického klonu I. Chromozomální DNA byla štěpena enzymem *Apal* a restriční fragmenty separovány v pulzním elektrickém poli na zařízení CHEF. M - standard molekulových hmotností



může být dána společnou strukturní organizací genů pro rezistenci, např. ve formě transpozónů [28]) nebo integrónů [29]. V souladu s touto představou je i výskyt subpopulací kmene č. 78, lišících se citlivostí právě k těmto antibiotikům. Citlivá subpopulace v takovém případě mohla vzniknout jako důsledek jednoduché genetické události současně postihující oba typy rezistence.

Rozlišovací účinnost kvantitativní analýzy citlivosti byla pro multirezistentní kmeny vysoká. Při porovnání s typizací podle profilů rezistence, biotypizací a ribotypizací dosáhla pouze tato metoda limitní hodnoty diskriminačního indexu a účinností rozlišit skupiny epidemiologicky souvisejících izolátů se podobala makrorestrikční analýze DNA. Zvláště významná je možnost rozlišení kmenů náležejících do panevropského epidemického klonu I. Tento klon zahrnoval 9 ze 14 epidemických kmenů *A. baumannii* izolovaných v širokém regionu severozápadní Evropy [11] a 54 % multirezistentních kmenů komplexu *Acb* izolovaných v České republice [10]. Z vysoké prevalence vyplývá reálná možnost současného výskytu klonálně příbuzných kmenů různého původu a jejich společného šíření. Tyto kmeny přitom nelze rozlišit ani jinak účinnými metodami molekulové analýzy - ribotypizací, RAPD nebo stanovením proteinových profilů vnější membrány [11,30].

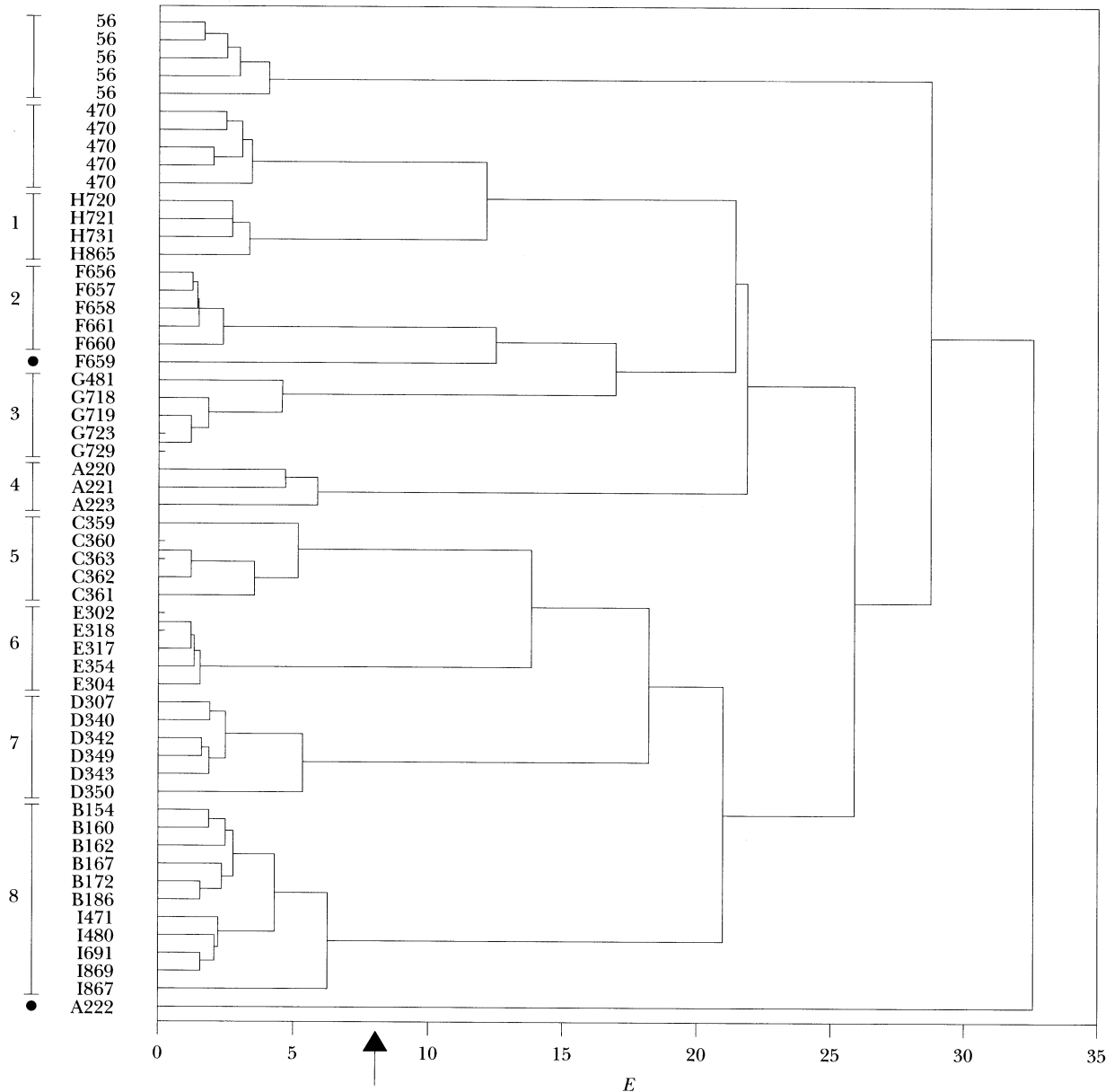
Pouze v jediném případě nebylo možno separovat dvě epidemiologicky odlišné skupiny izolátů, které zároveň reprezentovaly

různé epidemické klony. Tato tzv. fenotypová konvergence může být důsledkem podobného selekčního tlaku antibiotik. Při jejím vzniku se může uplatňovat postupný vývoj multirezistence kumulací chromozomálních mutací a horizontálně přenášených genů pro rezistenci. Jinou cestou může být jednorázový horizontální přenos hotových genových sestav. Tuto možnost naznačuje průkaz identických sestav genů pro rezistenci k aminoglykosidům (*aac(3) Ia*, *aph(3')-I*) u dvou genotypově a biochemicky odlišných kmenů (Dr. G. H. Miller, osobní sdělení), které byly zachyceny ve stejném období na Klinice popáleninové medicíny v Praze. Přestože každý z těchto kmenů náležel k jinému epidemickému klonu, nebylo je možno spolehlivě rozlišit podle hodnot MIK k 21 antibiotikům [5].

Hlavní námitkou proti samostatnému použití antibiogramu jako epidemiologického markeru bývá jeho nedostatečná stabilita, která může vést k chybnému vyloučení epidemiologické vazby [25]. V této studii byla nestabilita prokázána u dvou skupin epidemiologicky souvisejících izolátů. Z vyšší citlivosti a ojedinělého zachytu aberantních izolátů lze v obou případech usuzovat na ztrátu rezistence. U prvního izolátu, který se lišil pouze citlivostí k amikacinu, se mohla uplatnit alterace specifického mechanismu rezistence, pravděpodobně fosfotransferázy APh(3')-VI, která je hlavní příčinou rezistence k amikacinu u acinetobakterů [31]. Druhý izolát se lišil ve většině antibiotik s průměry IZ často pře-

Obr. 6

Fenogram podle průměrů inhibičních zón pro 11 antibiotik u 46 nemocničních izolátů *A. baumannii*. Koeficientem podobnosti byla euklidovská vzdálenost (E), shlukovací metodou UPGMA. Úsečkami jsou vymezeny shluky definované na hladině $E=8$, nezařazené izoláty jsou označeny tečkami. Písmena označují skupiny epidemiologicky souvisejících izolátů, kmeny č. 56 a 470 jsou standardy pro stanovení reprodukovatelnosti jednotlivých vyšetření



sahujícími hodnoty běžné u citlivých kmenů. Lze usuzovat, že takto atypický celkový posun citlivosti souvisí s místem záchytu izolátu (respirátor) a účinkem vnějších fyzikálních nebo chemických faktorů. S nestabilitou markerů rezistence pravděpodobně souvisí i výskyt rezistentních a citlivých subpopulací zjištěných při opakovaném vyšetření u dvou kmenů. Tento jev může ve svém důsledku nejen zkraslit závěry epidemiologické analýzy, ale i nepříznivě ovlivnit predikci terapeuticky účinných antibiotik.

Závěr

Kvantitativní antibiogram je v kombinaci se shlukovou analýzou vhodnou metodou typizace multirezistentních kmenů *A. bauman-*

nii. Při vhodném výběru markerů rezistence a standardním postupu se vyznačuje vysokou rozlišovací účinností a schopností diferencovat kmeny s podobným genotypem. Je to ekonomicky nenáročná a rychlá metoda, kterou lze v praxi využít k analýze epidemických situací i systematickému monitorování multirezistentních kmenů. Může mít zásadní význam pro včasné rozpoznání epidemiologicky závažné situace, nelze ji však považovat za kritérium definitivní. Prokázaná nestabilita a fenotypová konvergence mohou být zdrojem interpretačních chyb. Nejistá je účinnost metody v komplexní endemické situaci, tj. při paralelním výskytu a šíření většího množství kmenů, a zcela nespolehlivé je rozlišení citlivých kmenů. V podobných situacích je nezbytné použít někte-

rou z dalších metod subspecifické analýzy (např. makrorestrikční analýzy DNA) nebo jejich kombinace.

Poděkování

Studie byla součástí projektu č. 310/98/1602 Grantové agentury České republiky a č. 3486-3 Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví. Za laskavé poskytnutí kmenů autor děkuje RNDr. A. Andělové (Ostrava), MUDr. T. Bergerové (Plzeň), MUDr. M. Horníkové (České Budějovice), MUDr. A. Steinerové (Kladno), RNDr. V. Toršové (Ostrava) a MUDr. J. Vránkové (FNKV Praha). Dík patří dále K. Gavurové za vynikající technickou spolupráci a prof. MUDr. J. Schindlerovi za kritickou revizi rukopisu.

Literatura

1. Itzhak L, Rubinstein E. *Acinetobacter* infections - overview of clinical features. In: Bergorne-Bérézin E, Joly-Guillou ML, Towner KJ, eds. *Acinetobacter* microbiology, epidemiology, infections, management. CRC Press Inc 1996:101-115.
2. Vincent J, Bihari DJ, Suter PM, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe, results of the European prevalence of infection in intensive care (EPIC) study. *JAMA* 1995;274:639-644.
3. 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.
4. Struelens MJ, Carlier E, Maes N, et al. Nosocomial colonization and infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting. *J Hosp Infect* 1993;25:15-32.
5. Nemeč A, Urbášková P, Grimont F, et al. Identifikace a typizace nemocničních kmenů komplexu *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii*. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 1996;45:74-85.
6. Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* 1989;97:595-605.
7. Bouvet PJM, Grimont PAD. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann Inst Pasteur/Microbiol* 1987;138:569-578.
8. Nemeč A. Taxonomie rodu *Acinetobacter*. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 1996;45:23-29.
9. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 1991;29:277-282.
10. Nemeč A, Janda J, Melter O, Dijkshoorn L. Genotypic and phenotypic similarity of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in the Czech republic. *J Med Microbiol* 1999;48:287-296.
11. 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.
12. Seifert H, Gerner-Smidt P. Comparison of ribotyping and pulsed-field electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. *J Clin Microbiol* 1995;33:1402-1407.
13. Gerner-Smidt P. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol* 1992;30:2680-2685.
14. Grundmann HJ, Towner KJ, Dijkshoorn L, et al. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 1997;35:3071-3077.
15. Struelens MJ, the ESGEM. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect* 1996;2:2-11.
16. de Lencastre H, Couto I, Santos I, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in a Portuguese hospital: characterization of clonal types by a combination of a DNA typing methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:64-73.
17. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-2239.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Sixth informational supplement M100-S6. Villanova, PA: NCCLS, 1995.
19. Schindler J. Automatická diagnostika bakterií. Praha, Avicenum 1984:46-49.
20. Hunter PR. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J Clin Microbiol* 1990;28:1903-1905.
21. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of the diversity. *J Clin Microbiol* 1988;26:2465-2466.
22. Seltnmann G, Beer W, Claus H, Seifert H. Comparative classification of *Acinetobacter baumannii* strains using seven different typing methods. *Zbl Bakt* 1995;282:372-383.
23. Giamanco A, Vieu JF, Bouvet PJM, et al. A comparative assay of epidemiological markers for *Acinetobacter* strains isolated in a hospital. *Zbl Bakt* 1989;272:231-241.
24. Giacca M, Menzo S, Trojan S, Monti-Bragadin C. Cluster analysis of antibiotic susceptibility patterns of clinical isolates as a tool in nosocomial infection surveillance. *Eur J Epidemiol* 1987;3:155-163.
25. Dijkshoorn L, Aucken HM, Gerner-Smidt P, Kaufmann ME, Ursing J, Pitt TL. Correlation of typing methods for *Acinetobacter* isolates from hospital outbreaks. *J Clin Microbiol* 1993;31:702-705.
26. García-Arata MI, Gerner-Smidt P, López-Brea M. Epidemiological study of *Acinetobacter* species isolated from an intensive care unit. *APMIS* 1997;105:131-138.
27. Dijkshoorn L. Antibiogram typing combined with cluster analysis. In: Bergorne-Bérézin E, Joly-Guillou ML, Towner KJ, eds. *Acinetobacter* microbiology, epidemiology, infections, management. CRC Press Inc, 1996:247-248.
28. Devaud M, Kayser FH, Bachi B. Transposon-mediated multiple antibiotic resistance in *Acinetobacter* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;22:323-329.
29. Vila J, Casals C, Ruiz J, Navia M, Gallardo F. Integron mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. In: Abstracts of the 8th European congress on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Infect* 1997;2, Suppl 2:294.
30. Nemeč A. Multiresistant clones of *Acinetobacter baumannii* in the Czech republic [abstract P.3.5.3.]. In: Abstracts presented at the 4th international conference of the Hospital infection society. *J Hosp Infect* 1998;40 Suppl A.
31. Lambert T, Gerbaud G, Courvalin P. Transferable amikacin resistance in *Acinetobacter* spp. due to a new type of 3'-aminoglycoside phosphotransferase. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:15-19.

ZACHYCENO NA INTERNETU

Virus západonilské horečky - šířící se patogen?

V září a v říjnu t.r. byl virus západonilské horečky hitem na Internetu, v odborném tisku i v masmédiích. Nikoliv neprávem, protože vše nasvědčuje tomu, že tento virus je typickým „nově se šířícím“ patogenem (jeho přítomnost byla prokázána i v České republice). Je to asi nejrozšířenější z flavivirů s výskytem v Africe, Evropě a Asii. Zájem o virus vzbudila epidemie encefalitidy, která proběhla od druhé poloviny srpna do září t.r. na severovýchodním pobřeží USA, konkrétně v městě a státě New York. Z 56 onemocnělých 7 zemřelo. V téže době bylo pozorováno hromadné hynutí ptáků a drobná epizootie u koní. Infekce byla u zvířat prokázána i ve státech New Jersey a Connecticut. Jako agens byl u lidských i zvířecích nákaz (po vyloučení encefalitidy St. Louis) potvrzen virus západonilské horečky. Virus byl izolován též z odchycených komárů. Jde vůbec o první výskyt infekce tímto virem na západní polokouli a možná cesta importu nákazy se prošetřuje, uvažuje se o přenosu tažnými ptáky, případně ilegálně pašovanými ptáky. Letos bylo diagnostikována tato infekce (encefalitická forma) vůbec poprvé také v Nepálu. Podle zprávy ve skupině Promed měla letos proběhnout v okolí Volgogradu epidemie s 550 onemocněnými a 33 úmrtími. V paměti je ještě epidemie (kolem 500 onemocnělých), která proběhla před 3 roky v Rumunsku s úmrtností kolem 8 - 10 %. Letos bylo též publikováno sdělení (Hubálek et al) o průkazu přítomnosti viru v ČR (jižní Morava) v r. 1997 s pravděpodobným onemocněním 5 osob.

Vše nasvědčuje tomu, že se sporadickými případy, případně lokálním vzplanutím či epidemií je třeba počítat nejen v tropech a subtropích, ale i v zemích mírného klimatického pásma a revidovat zvyklosti ochrany před komáry.

Prameny: MMWR 1999;48: 890-2, MMWR 1999;48:944-6, Hubálek Z, et al. *Emerg Infect Dis* 1999;5:594-5 a 643-50 a řada sdělení v diskuzní skupině Promed (promed@promed.isid.harvard.edu) v září a říjnu t.r. Všechny citace jsou v plném znění dostupné na síti v archivech příslušných pramenů.

Nozokomiální přenos malárie ve V. Británii

Na jednotce pro infekční nemoci v městské nemocnici v Nottinghamu se vyskytly tři případy malárie *Pl. falciparum* u pacientů, kteří neopustili Anglii. Diagnózy byly laboratorně ověřeny. Dva nemocní přežili, třetí zemřel na cerebrální formu. Šetření neprokázalo přítomnost anophelidů v nemocnici ani v okolí a vedlo k závěru, že infekce byla nejspíše přenesena při prostříkávání intravenózních kanyl. Zdrojem byl jiný pacient, který byl v rozhodné době též hospitalizován s malárií získanou v Africe.

Prameny: Promed (promed@osi.oracle.com) file 990930135047, Eurosurveillance Weekly 1.4.1999.