

Identifikace a typizace nemocničních kmenů komplexu *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii*

A. Nemeč¹, P. Urbášková¹, F. Grimont², J. Vránková³, O. Melter³, J. Schindler^{1,3}

¹ Státní zdravotní ústav, Praha

² Unité des Enterobactéries, Institut Pasteur, Paris

³ Ústav lékařské mikrobiologie, 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

Souhrn

Soubor 95 kmenů komplexu *A. calcoaceticus*–*A. baumannii* byl izolován v letech 1991–1993 na Klinice popáleninové medicíny v Praze (KPM). Kmeny pocházely od 43 pacientů, a to 50 kmenů z popálených ploch, 22 z endotracheální kanyly, 13 z moči, 3 z hemokultury a 3 z intravenózní kanyly, 4 kmeny byly izolovány z nemocničního prostředí a od ošetřujícího personálu. Klasifikací podle restričního polymorfismu buněčné DNA štěpené *Hind*III, plazmidového profilu, *Eco*RI ribotypu, antibiogramu, biotypu a s přihlédnutím k epidemiologickým údajům bylo mezi kmeny rozlišeno 31 tříd podobnosti, obsahujících po 1–29 kmenech a představujících pravděpodobně soubory izolátů téhož kmene. Žádná z použitých metod neumožnila rozlišení všech tříd. Význam polyfázového popisu zdůraznila skutečnost, že tři téměř současně izolované multirezistentní kmeny mohly být rozlišeny pouze kombinací nejméně dvou metod (např. ribotypizace a biotypizace). Ribotypizací bylo z 28 kmenů reprezentujících jednotlivé třídy identifikováno 18 jako *A. baumannii*, 5 jako genomospecies 13 sensu Tjernbergová a Ursing a 5 jako genomospecies 3. Šíření mezi pacienty bylo prokázáno pouze u *A. baumannii*. Kmeny dvou multirezistentních tříd *A. baumannii* perzistovaly na KPM po dobu celého sledovaného období a u jedné z nich došlo k hromadnému výskytu na podzim roku 1993. Výše uvedenými metodami byly dále popsány tři skupiny multirezistentních kmenů *A. baumannii* izolovaných v mimopražských nemocnicích. Kmeny stejného původu měly shodné typizační profily a kmeny různého původu bylo možné rozlišit jakoukoliv z použitých metod; dvě z těchto skupin však byly téměř identické se dvěma třídami multirezistentních kmenů izolovaných na KPM.

Klíčová slova: komplex *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* – identifikace – polyfázová subspecifická klasifikace – epidemiologická typizace – biotypizace – rezistence na antibiotika – plazmidy – restriční analýza – ribotypizace – epidemiologie – Česká republika.

Summary

Nemeč A., Urbášková P., Grimont F., Vránková J., Melter O., Schindler J.: Identification and Typing of Hospital Strains of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* Complex

A collection of 95 strains of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex, isolated between 1991 and 1993 in the Prague Burn Center (BC), was studied. Ninety-one strains were isolated from 43 patients: 50 of them from burnt sites, 22 from endotracheal tube, 13 from urine, 3 from blood and 3 from venous catheter, and 4 strains were isolated from the hospital environment and the nursing staff. The strains were classified by restriction endonuclease fingerprinting of total DNA, plasmid profile analysis, ribotyping, comparison of antibiograms, biotyping and according to epidemiological data, into 31 relatedness groups each of them including 1 to 29 strains, likely to be isolates of the same strain. None of the methods used enabled to distinguish all groups. The importance of the polyphasic approach is emphasized since three multiresistant strains, isolated almost simultaneously in the BC, needed at least two methods to be distinguished (e.g. ribotyping and biotyping). Twenty-eight representative strains of different groups were identified by ribotyping: 18 of them were allocated to genomospecies 2 (*A. baumannii*), 5 to genomospecies 3 and 5 to genomospecies 13 sensu Tjernberg and Ursing. Only *A. baumannii* was found to spread among patients. Strains of two multiresistant groups persisted in the BC throughout the period studied and strains of one of these groups were responsible for an outbreak in the autumn of 1993. The methods mentioned above were used to describe 12 multiresistant strains isolated in three hospital wards in other localities. When ribotyped these strains were identified as *A. baumannii*. The strains of the same origin were identical in their typing profiles while the strains of different origins were easy to differentiate using any of the above methods; nevertheless, 2 of these groups were almost identical to 2 groups of multiresistant strains isolated in the BC.

Key words: *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex – identification – polyphasic subspecific classification – epidemiological typing – biotyping – drug resistance – plasmids – restriction endonuclease analysis – ribotyping – epidemiology – Czech republic.

Rod *Acinetobacter* zahrnuje růstově nenáročnou aerobní bakterie, které se běžně vyskytují v zevním prostředí a jsou izolovány z kůže a sliznice zdravých lidí (2, 29). V posledních letech výrazně vzrostl jejich význam jako původců nemocničních infekcí postihujících především pacienty se závažným základním onemocněním nebo oslabenou imunitou, hospitalizované na jednotkách intenzivní péče, odděleních pro léčbu popálenin a na novorozeneckých odděleních (3, 4). Zvláště závažné jsou nemocniční epidemie způsobené multirezistentními kmeny, které omezují možnosti antibiotické terapie (4).

Klasifikační studie posledního desetiletí postupně rozdělily rod *Acinetobacter* do 19 genomspécií lišících se svojí ekologií a klinickým významem (5, 7, 27). Klinicky nejvýznamnější skupinu představuje komplex *A. calcoaceticus*–*A. baumannii* (*Acb*), který obsahuje genomspécií (GS) 1 (*A. calcoaceticus*), 2 (*A. baumannii*), 3 a 13 sensu Tjernbergová & Ursing. Komplex *Acb* zahrnuje převážnou část kmenů rodu *Acinetobacter* izolovaných z klinického materiálu (6, 8, 12, 24) a hromadně se vyskytující nemocniční kmeny patří téměř výlučně do tohoto taxonu (4, 9, 19, 25). Lze jej spolehlivě odlišit od zbývajících genomspécií rodu pomocí identifikačního schématu podle Bouveta a Grimonta (6). Problematická je však spolehlivá identifikace jednotlivých genomspécií komplexu *Acb*. Recentní taxonomické práce ukazují, že komplex *Acb* nelze fenotypově jednoznačně diferencovat (14, 22) a spolehlivou identifikaci umožňují pouze genotypové metody (11, 13, 27).

Předpokladem pro epidemiologickou analýzu nemocničních infekcí je účinná metoda typizace, která umožňuje rozlišení kmenů na subspecifické úrovni a na jejímž základě lze odlišit hromadně se vyskytující kmeny. Přestože pro rozlišení nemocničních kmenů rodu *Acinetobacter* byla dosud použita řada metod fenotypové a molekulové analýzy [biotypizace (6, 8, 12, 25), antibiogram (9, 12, 25), fagotypizace (8, 12), sérotypizace (30), plazmidový profil (1, 15, 25), ribotypizace (9, 13), separace restrikčních fragmentů DNA v pulzním elektrickém poli (16, 25), profil buněčných proteinů (1), profil proteinů vnější buněčné membrány (8, 9, 12)], neexistuje obecně přijímaný typizační systém. Za zvlášť účinné jsou považovány metody založené na restrikčním polymorfismu chromosomální DNA (13, 16) a současná aplikace několika typizačních metod (1, 8, 9, 12).

Cílem naší studie byla detailní taxonomická analýza kmenů komplexu *Acb* izolovaných v letech 1991–1993 na Klinice popáleninové medicíny ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady v Praze a souboru kmenů izolovaných v mimopražských nemocnicích. Kmeny byly klasifikovány podle biotypu, antibiogramu, plazmidového profilu a restrikčního polymorfismu buněčné DNA, reprezentativní kmeny byly popsány ribotypizací a identifikovány do úrovně genomspécií a byla posouzena účinnost použitých typizačních metod.

species a byla posouzena účinnost použitých typizačních metod.

Materiál a metodika

Kmeny. Soubor 95 kmenů komplexu *Acb* byl izolován v období od února 1991 do října 1993 na Klinice popáleninové medicíny (KPM) ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady v Praze. Kmeny pocházely od 43 pacientů z popálených ploch (50 kmenů), endotracheální kanyly (22), moči (13), intravenózní kanyly (3) a hemokultury (3), tři kmeny pocházely z nemocničního prostředí a jeden kmen od ošetřujícího lékaře. Kmeny izolované z téhož pacienta pocházely z různých míst těla nebo byly izolovány s odstupem několika dnů. Mimopražský soubor obsahoval tři čtveřice kmenů, z nichž každá reprezentovala větší skupinu kmenů izolovaných při hromadném nebo endemickém výskytu na jednom ze tří oddělení: Oddělení pro léčbu popálenin Fakultní nemocnice v Ostravě, Novorozenecké oddělení a Anesteziologicko-resuscitační oddělení nemocnice v Kladně.

Biochemická identifikace. Rodová identifikace byla provedena pomocí API 20 NE (Biomérieux, Francie) a ověřena transformačním testem s kmenem BD413trans-akoniátu, citrátu, glutarátu, L-aspartátu, azelátu, β-alaninu, L-histidinu, D-malátu, malonátu, histaminu, L-fenylalaninu a fenylacetátu. Jako základ pro utilizační testy bylo použito tekuté minerální médium M70 (31). Inkubace probíhala při 30 °C (s výjimkou teplotních testů). Utilizační testy byly odečítány po 2 a 6 dnech, ostatní testy po 2 dnech. Všechny testy byly hodnoceny ve dvou nezávislých stanoveních, při neshodě výsledků byly dvakrát opakovány. Interpretace výsledků vycházela z identifikačních matic navržených Grimontem a Bouvetem (18) a Gerner-Smidtem et al. (14). Pro numerickou pravděpodobnostní identifikaci byl použit vlastní program BACTID. Kritéria pro přijetí druhové identifikace byla: identifikačního skóre (I.S.) $\geq 0,9$, modální podíl pravděpodobnosti $\geq 0,0001$; pro skupinovou identifikaci komplexu *Acb* musel být součet hodnot I.S. pro první dvě, resp. tři genomspécií komplexu *Acb*, z nichž první nedosáhla I.S. $\geq 0,9$, větší nebo roven 0,9.

Biotypizace a číselné označení jednotlivých biotypů byla provedena podle typizačního schématu Bouveta a Grimonta (B&G), které je založeno na diferenciální schopnosti utilizovat levulinát, citrakonát, fenylacetát (L-fenylalanin), 4-hydroxybenzoát a L-tartarát (6). **Rozšířené biotypy** byly určeny pomocí všech testovaných biochemických znaků, tj. testů použitých pro rodovou a druhovou identifikaci, typizaci a testů utilizace L-ornitinu a butyrátu.

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro 21 antibiotik byly stanoveny standardní mikrometodou (28). Testována byla citlivost *k* (v závorkách uvedený hraniční koncentrace v mg/l): ampicilinu (4), ampicilin-sulbaktamu (4), azlocilinu (16), tikarcilinu (16), cefazolinu (4), cefuroximu (4), cefoxitinu (4), cefotaximu (4), ceftazidimu (4), imipenemu (4), kanamycinu (8), gentamicinu (4), netilmicinu (4), tobramycinu (4), amikacinu (8), tetracyklinu (2), chloramfenikolu (4), kyseliny oxolinové (8), ofloxacinu (2), sulfisoxazolu (256) a kotrimoxazolu (32). Výpočet podobnosti podle MIC byl proveden pomocí programu Statistica; jako kritérium podobnosti byl použit Pearsonův ko-

relační koeficient, jako shlukovací metoda UPGMA (unweighted pair-group method with averages).

Restrikční analýza buněčné DNA (REA). Buněčná DNA byla izolována metodou podle Grimberga et al. (17). Bakteriální kultura (16 h aerobní kultivace v LB médiu při 30 °C) o objemu 1 ml byla centrifugována (7 000 ot./min, 3 min, Biofuge A, Hereus), promyta v 1 ml TNE (10 mM, Tris pH 8,0, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA) a resuspendována v 270 µl TNE obsahujícího 1% Triton X-100. Bylo přidáno 30 µl čerstvě připraveného roztoku lyzozymu (5 mg/ml TNE) a směs byla inkubována 30 min při 37 °C. K lyzované kultuře bylo přidáno 30 µl 1% roztoku proteinázy K (Serva) a směs byla inkubována 2 h při 65 °C. Preparáty byly uloženy při -20 °C. Buněčná DNA byla štěpena enzymem *Hind*III (Fermentas) a fragmenty DNA separovány v 0,7% agaróze (Pharmacia) na zařízení pro horizontální elektroforézu (BIO-RAD) při 33 V po dobu 15 h. Použit byl 2krát zředěný tris-borátový elektroforetický pufr (23), gely byly barveny v roztoku ethidium bromidu (0,5 µg/ml) a fotografovány v UV-světle na zařízení TFL-20.M (Vilber-Lourmat). Jako marker molekulových hmotností byla použita směs DNA fága λ štěpené *Hind*III a *Styl*.

Plazmidový profil. Plazmidová DNA byla izolována modifikovanou metodou podle Kadoa a Liua (21). K 0,6 ml bakteriální kultury bylo přidáno 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0). Po 5 min inkubace při laboratorní teplotě byly buňky centrifugovány (7 000 ot./min, 3 min, Biofuge A) a resuspendovány v 0,5 ml 0,15 M NaCl. K buněčné suspenzi bylo přidáno 13 µl 1% roztoku N-tetradecyl-N,N-dimetyl-3-amonio-1-propansulfonátu (Boehringer-Mannheim) v 100 mM kyselině citronové a směs byla inkubována 10 min při 37 °C (10). Po centrifugaci (7 000 ot./min, 3 min) byl sediment resuspendován ve 150 µl roztoku TE (10 mM Tris.HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), bylo přidáno 300 µl lyzujícího roztoku (3% SDS, 50 mM Tris, 32 mM NaOH) a směs byla inkubována 5 min při laboratorní teplotě. Lyzovaná kultura byla mírně protřepána s 0,9 ml fenol-chloroformu (1:1, nenasurováno H₂O) a centrifugována (13 000 ot./min, 20 min). Vodná fáze obsahující plazmidovou DNA byla skladována při -20 °C. Elektroforetická separace probíhala při napětí 100 V po dobu 2 h v tris-acetátovém pufru (23). Pro štěpení restrikčními endonukleázami byla plazmidová DNA precipitována dvojnásobným objemem etanolu, centrifugována (13 000 ot./min, 15 min) a rozpuštěna v 50 µl TE. Jako standard ke stanovení molekulových hmotností plazmidů byl použit Supercoiled DNA ladder (Sigma D-5292). Molekulová hmotnost plazmidové DNA byla stanovena programem GelManager (BioSystematica).

Ribotypizace. Buněčná DNA byla štěpena *Eco*RI (Fermentas). Elektroforetický rozdělené fragmenty DNA byly vakuově přeneseny (LKB 2016 VacGene vacuum blotting system) na membránu Hybond N (Amersham). Membrány byly hybridizovány s rRNA značenou acetylaminofluorem a úseky DNA s navázanou sondou byly imunochemicky vizualizovány (Acetylaminofluorene ribosomal RNA kit, Eurogentec, Belgie). Jako kontrolní byly použity kmeny ATCC 19606 (*A. baumannii*), ATCC 19004 (*Acinetobacter* genomospecies 3) a ATCC 17903 (*Acinetobacter* genomospecies 13); jako marker molekulových hmotností byla použita buněčná DNA izolovaná z kmene *Citrobacter freundii* 2233. Molekulová hmotnost fragmentů nesoucích úseky genů pro rRNA byla stanovena programy RestrictoScan and RestrictoTyper (Institut Pasteur, Paříž). Identifikace genomospecies komplexu *Acb* byla provedena podle Gerner-Smidta (13).

Terminologie. *Genomospecies* (GS) je označení pro druh definovaný DNA-DNA hybridizací, které nahrazuje původní termín *genospecies* (32). *Typizační profil* je charakteristický

soubor znaků získaný pomocí určité metody, např. biotyp, antibiogram nebo elektroforetogram.

Výsledky

Třídy podobnosti. Kmeny izolované na Klinice popáleninové medicíny v Praze a v mimopražských nemocnicích byly rozděleny do 34 tříd podobnosti (TP) podle biotypu, antibiogramu, plazmidového profilu, restrikčního profilu buněčné DNA, ribotypu a epidemiologických dat (tab. 1 a 2). Jednotlivé třídy zahrnovaly kmeny s identickými typizačními profily a byly označeny římskými číslicemi. Kmeny s malým rozdílem v některém z typizačních profilů byly zařazeny do téže třídy pouze tehdy, pokud byly izolovány z téhož pacienta. V ostatních případech byly velmi podobné, ale neidentické kmeny zařazeny do různých tříd označených stejnou číslicí indexovanou malým písmenem.

Antibiogram. Všechny kmeny byly rezistentní k ampicilinu, cefazolinu, cefuroximu, cefotaximu, cefoxitinu, chloramfenikolu a tetracyklinu a citlivé k imipenemu. Rozdíly v citlivosti na ostatní antibiotika byly zjištěny mezi kmeny různých tříd i mezi jinak identickými izoláty z téhož pacienta. Pro porovnání citlivosti byla proto použita shluková analýza hodnot MIC. Na obr. 1 je znázorněn fenogram podle MIC kmenů izolovaných na KPM. Na hladině 0,32 jsou rozlišeny shluky A a B. Shluk A (citlivé a málo rezistentní kmeny) zahrnuje 23 tříd s 37 kmeny citlivými na všechna antibiotika s výjimkou výše uvedených nebo rezistentními k dalším 1–3 antibiotikům. Shluk B (multirezistentní kmeny) zahrnuje 8 tříd s 58 kmeny rezistentními ke gentamicinu, kanamycinu, netilmicinu, sulfisoxazolu, kotrimoxazolu a dalším 2–7 antibiotikům (pouze kmeny 65 a 66 byly citlivé k sulfonamidům). Seskupení multirezistentních kmenů je na hladině 0,1 tvořeno několika shluky, z nichž dva (B1, B2) zahrnují početně nejobsáhlejší třídy. Shluk B1 obsahuje kmeny tříd Ia a III, rezistentní ke všem testovaným antibiotikům s výjimkou imipenemu; shluk B2 (TP IIa a IVa) se od shluku B1 odlišuje citlivostí na chinolony a tobramycin a nižšími hodnotami MIC pro amikacin. Výrazně odlišeny jsou kmeny č. 191 a 195 (izolované z těžce popáleného pacienta, převezeného z nemocnice v Bosně) s hraniční hodnotou MIC pro imipenem a rezistentní ke všem ostatním antibiotikům. Tyto kmeny a shluk B1, s nímž sdílí identický kvalitativní profil rezistence, jsou separovány na hladině 0,31 z důvodu rozdílných hodnot MIC.

Biotypizace podle Bouveta a Grimonta. Celkem bylo identifikováno 8 biotypů, jejichž zastoupení u kmenů izolovaných na KPM ukazuje tabulka 3. Biotypy 6 a 9 zahrnovaly genotypově heterogenní skupinu 18 tříd (53 %) s 68 kmeny (64 %). V jednom případě byly rozlišeny kmeny se shodným riboty-

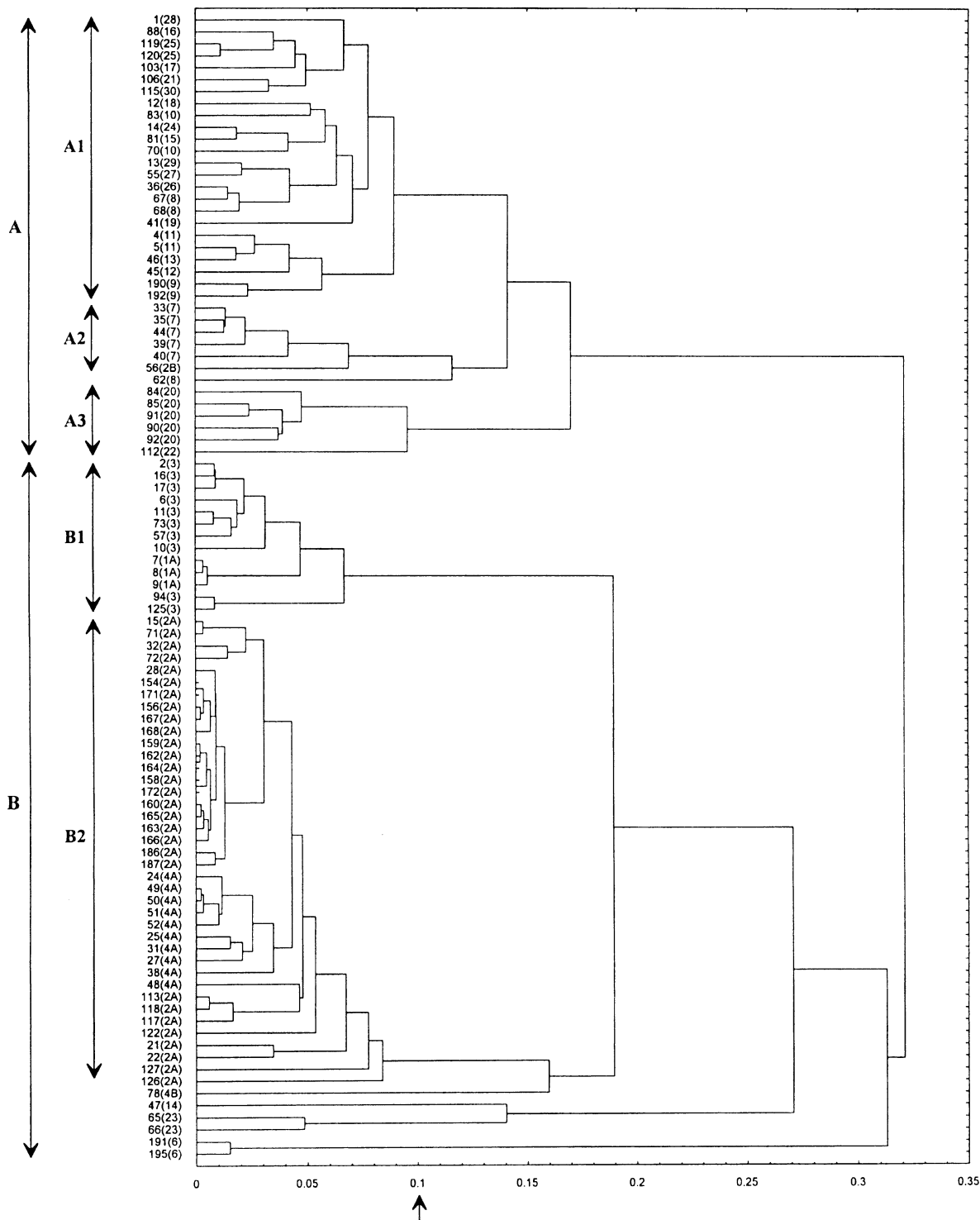
Tab. 1. Klasifikace 95 kmenů komplexu *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* izolovaných na Klinice popáleninové medicíny v Praze podle tříd podobnosti a zdroje izolace

Table 1. Classification of 95 strains of the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex isolated in the Prague Burn Center according to the relatedness groups and sources

Třída podob.	Kmen č.	Zdroj	Datum izolace	Genom-species	Ribotyp	Restrikční profil buň. DNA	Plazmid. profil	B&G biotyp	Rozšířený biotyp	Antibiogram
Ia	<u>7, 8, 9</u>	pacient 1	II. 91	2	A	A1	P1	11	A	B1
IIa	<u>15</u>	pacient 2	IV. 91	2	A	A1	P2	6	B	B2
	21, 22	pacient 3	VII. 91							
	<u>28, 32</u>	pacient 4	IX. - X. 91							
	<u>71</u>	pacient 5	XII. 92							
	<u>72</u>	pacient 6	XII. 92							
	113, 117, 122, 126, <u>127</u>	pacient 7	IV. - V. 93							
	<u>118</u>	prostředí	IV. 93							
	<u>154, 156, 158, 163</u>	pacient 8	VIII. 93							
	<u>159</u>	pacient 9	VIII. 93							
	160, 164	pacient 10	VIII. 93							
	162, 165	pacient 11	VIII. 93							
	<u>166, 168, 171</u>	pacient 12	VIII. - IX. 93							
	167	pacient 13	VIII. 93							
	172	pacient 14	IX. 93							
	<u>186, 187</u>	pacient 15	X. 93							
IIb	<u>56</u>	pacient 16	VIII. 92	2	A	A2	P2	6	B	A2
III	<u>2</u>	prostředí	II. 91	2	un	A1	P3	6	B	B1
	<u>6</u>	pacient 17	II. 91							
	<u>10, 11, 16, 17</u>	pacient 18	VII. 91							
	<u>57</u>	pacient 19	VIII. 92							
	<u>73</u>	pacient 20	XII. 92							
	<u>94</u>	pacient 21	II. 93							
	<u>125</u>	pacient 22	V. 93							
IVa	<u>24, 25, 27, 31, 38</u>	pacient 23	IX. - XI. 91	2	B	B1	n	2	C	B2
	<u>48, 51, 52</u>	pacient 24	XII. 91							
	<u>49, 50</u>		XII. 91							
IVb	<u>78</u>	pacient 25	XII. 92	2	B	B3	n	2	C	un (B)
VI	<u>191, 195</u>	pacient 26	XI. 93	2	un	un	un	9	D	un (B)
VII	<u>33, 35, 39, 40, 44</u>	pacient 27	X. 91	2	un	un	un	9	un	A2
VIII	<u>62</u>	pacient 28	XI. 92	2	un	un	un	1	un	un (A)
	<u>67, 68</u>									A1
IX	<u>190, 192</u>	pacient 29	XI. 93	2	un	un	un	8	un	A1
X	<u>70</u>	pacient 30	XI. 92	2	un	C1	un	9	un	A1
	<u>83</u>	prostředí	I. 93							
XI	<u>4, 5</u>	pacient 17	II. 91	2	un	un	un	5	un*	A1
XII	<u>45</u>	pacient 31	XI. 91	2	un	un	un	6	un	A1
XIII	<u>46</u>	pacient 32	XI. 91	2	un	un	un	18	un	A1
XIV	<u>47</u>	pacient 33	XII. 91	2	un	un	un	6	un	un (B)
XV	<u>81</u>	pacient 34	I. 93	2	un	un	n	6	B	A1
XVI	<u>88</u>	pacient 35	II. 93	2	un	C2	R	9	D	A1
XVII	<u>103</u>	pacient 36	III. 93	2	un	un	R	9	un	A1
XVIII	<u>12</u>	pacient 37	VII. 91	13	C	D1	un	9	un	A1
XIX	<u>41</u>	pacient 27	X. 91	13	C	D2	un	9	un	A1
XX	<u>84, 85, 90, 91, 92</u>	pacient 36	I. - II. 93	13	D	E1	un	9	un**	A3
XXI	<u>106</u>	pacient 22	III. 93	13	un	D3	un	11	un	A1
XXII	<u>112</u>	pacient 38	III. 93	13	D	E2	un	9	un	A3
XXIII	<u>65, 66</u>	pacient 6	XI. 92	3	un	un	un	11	un	un (B)
XXIV	<u>14</u>	pacient 2	VI. 91	3	un	F1	un	8	E	A1
XXV	<u>119, 120</u>	pacient 39	IV. 93	3	un	F2	un	8	E	A1
XXVI	<u>36</u>	pacient 40	X. 91	3	un	un	un	***	un	A1
XXVII	<u>55</u>	pacient 41	XI. 91	3	un	un	un	6	un	A1
XXVIII	1	personál	II. 91			un	un	9	un	A1
XXIX	13	pacient 42	VII. 91			un	un	2	un	A1
XXX	115	pacient 43	IV. 93			un	un	18	un	A1

Vysvětlivky: U všech kmenů byl stanoven profil buněčné DNA štěpené *Hind*III, plazmidový profil, antibiogram, biotyp podle Bouveta a Grimonta (B&G) a rozšířený biotyp. *Eco*RI ribotyp byl vyšetřen u kmenů označených podtržením. Identifikace genom-species byla provedena ribotypizací podle Gerner-Smidta (13) a dedukována pro ostatní kmény třídy. Typizační profily společně pro kmény více tříd jsou značeny velkými písmeny. Podobné, ale neidentické restrikční profily jsou indexovány číslicí (A1 etc.). Jako P1 až P4 jsou označeny různé varianty plazmidového profilu obsahující identický plazmid 8,7 kb. Antibiogramy jsou označeny podle shluků na fenogramu na obr.1. un = typizační profil jedinečný pro danou třídu; n = plazmidová DNA neprokázána; * rozdílný růst na β-alaninu; ** rozdílný růst při 44 °C; *** atypický biotyp

Explanations: *Hind*III restriction endonuclease DNA fragment patterns, plasmid profiles, antibiograms, B&G biotypes (according to Bouvet and Grimont) and enlarged biotypes were determined in all strains. *Eco*RI ribotypes were determined in the underlined strains. Genom-species identification was based on ribotyping according to Gerner-Schmidt (13), it was deduced for other strains of the group. The typing profiles common for strains of several groups are capitalized. Similar but not identical restriction profiles are designated by capital letters followed by numbers (A1 etc.). P1 to P4 denote different plasmid profile variants including an identical plasmid 8.7 kb. The antibiograms are labelled according to the clusters of the phenogram in Figure 1. un = typing profile unique for the given group; n = plasmid DNA not detected; * different growth on β-alanine; ** different growth at 44 °C; *** atypical biotype



Obr.1. Fenogram podle MIC pro 21 antibiotik u 95 kmenů komplexu *A. calcoaceticus*–*A. baumannii* izolovaných na Klinice popáleninové medicíny v Praze. Pro konstrukci grafu byly použity Pearsonův korelační koeficient a UPGMA. Shluk A (citlivé a málo rezistentní kmeny) a shluk B (multirezistentní kmeny) jsou separovány na hladině 0,32. Shluky A1, A2, A3, B1 a B2 jsou definovány na hladině 0,1. V závorkách za čísla kmenů jsou uvedeny třídy podobnosti

Fig. 1. Clustering dendrogram of the MIC values of 95 strains of the *A. calcoaceticus*–*A. baumannii* complex isolated in the Prague Burn Center. To plot the dendrogram Pearson's coefficient of correlation and UPGMA were used. Cluster A (susceptible and slightly resistant strains) and cluster B (multiresistant strains) are separated at the level 0.32. A1, A2, A3, B1 and B2 clusters are defined at the level 0.1. The relatedness groups are given in parenthesis following the strain numbers

Tab. 2. Typizace kmenů *A. baumannii* izolovaných ze tří nemocničních epidemií**Table 2.** Typing of *A. baumannii* strains isolated from three hospital outbreaks

Třída podob.	Kmen č.	Původ	Datum izolace	Ribotyp	Restriční profil buň. DNA	Plazmid. profil	B&G biotyp	Rozšířený biotyp
Ib	340	Oddělení pro léčbu popálenin FN Ostrava	I. 94	A	A1	P4	11	un
	342		II. 94					
	307		III. 94					
	349		IV. 94					
IVc	220	Neonatologické oddělení Kladno	VI. 93	B	B4	n	2	C
	221		VI. 93					
	222		VI. 93					
	223		VI. 93					
V	302	Anesteziologicko-resuscitační oddělení Kladno	VI. 94	un	un	un	6	B
	304		VI. 94					
	317		VIII. 94					
	318		VIII. 94					

Vysvětlivky: Viz tab. 1

Explanations: See Table 1

Tab. 3. Biotypy podle Bouveta a Grimonta u 95 kmenů komplexu *A. calcoaceticus*–*A. baumannii* izolovaných na Klinice popáleninové medicíny v Praze**Table 3.** Biotypes according to Bouvet and Grimont in 95 strains of the *A. calcoaceticus*–*A. baumannii* complex isolated in the Prague Burn Center

Biotyp č.	1	2	5	6	8	9	11	18	at	Celkem
počet kmenů*	3 (1)	12 (4)	2 (1)	44 (27)	5 (3)	20 (11)	6 (3)	2 (2)	1 (1)	95 (53)
počet tříd podobnosti	1	3	1	7	3	10	3	2	1	31

Vysvětlivky: * V závorce je uveden počet kmenů po vyloučení identických izolátů z téhož pacienta, at = atypický biotyp

Explanations: * The number in parenthesis does not include the identical isolates from the same patient, at = an atypical biotype

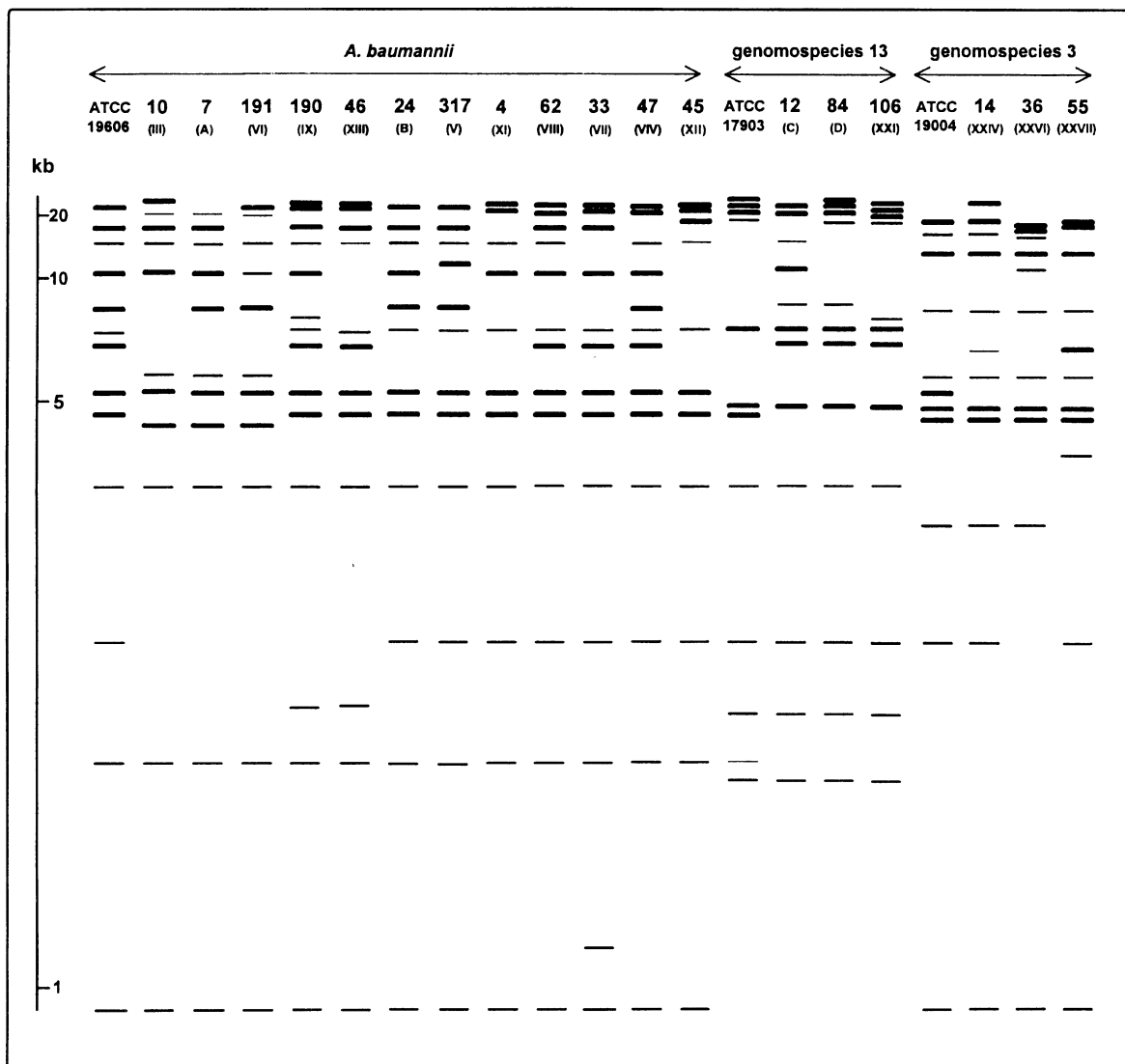
pem: kmeny s ribotypem A náležely k biotypům 6 a 11. Profil kmene č. 36 nebylo možné zařadit do žádného z dosud popsaných biotypů pro jeho neschopnost využít L-fenylalanin při současném růstu na fenylacetátu (u komplexu *Acb* se tyto znaky považují za vázané).

Rozšířená biotypizace. Pomocí všech biochemických znaků, které byly u studovaného souboru variabilní (testy biotypizace podle Bouveta a Grimonta, užití *trans*-akoniátu, citrátu, glutarátu, L-asparátátu, azelátu, β -alaninu, malonátu, L-ornitinu, butyrátu, L-arabinózy a adipátu, růst při 44 °C a 41 °C), bylo rozlišeno 28 biotypů. Ve dvou případech šlo o varianty téhož kmene: kmeny č. 4 a 5 (TP XI) izolované z téhož pacienta a shodné ve všech ostatních vlastnostech se lišily v užití β -alaninu; kmen č. 90 na rozdíl od jinak identických kmenů izolovaných z téhož pacienta (TP XX) nerostl při 44 °C.

Plazmidový profil. Plazmidová DNA byla prokázána u všech kmenů s výjimkou tříd IVa, IVb a IVc a kmene č. 81 (TP XV). Kmeny obsahovaly 1 – 6 různých plazmidů o velikosti 1,9 až > 80 kb. Celkem bylo rozlišeno 28 různých profilů. Plazmidová analýza

odlišila třídy s identickým restričním profilem a biotypem (TP IIa a III), identickým ribotypem a biotypem podle B&G a podobným restričním profilem (TP XVIII a XIX, XX a XXII) a identickým ribotypem, restričním profilem i biotypem podle B&G (TP Ia a Ib). Kmeny tříd Ia, Ib, IIa, IIb a III obsahovaly vedle jiných plazmidů plazmid o velikosti 8,7 kb. Potvrzení strukturní podobnosti plazmidů 8,7 kb izolovaných z představitelů jednotlivých tříd bylo provedeno štěpením pomocí enzymu *Hind*III. Ve všech případech vznikly tři restriční fragmenty o velikosti 4,8, 2,6 a 1,3 kb.

Restriční analýza buněčné DNA. Enzym *Hind*III poskytl elektroforetogramy s vyváženým rozložením fragmentů různých velikostí a s výborným rozlišením v oblasti velkých fragmentů (cca 6 – 22 kb). Celkem bylo rozlišeno 23 výrazně odlišných profilů. Identické profily byly zjištěny u tříd lišících se v ribotypu (TP IIa a III) i u fenotypově odlišných tříd (TP Ia, IIa a III). V několika případech byly u kmenů různých tříd zaznamenány velmi podobné profily, které se lišily rozložením pouze několika fragmentů (restriční profily A1 a A2; B1, B3 a B4 etc.). Odchytky



Obr. 2. Schematické znázornění *EcoRI* ribotypů u kmenů komplexu *A. calcoaceticus*–*A. baumannii*. V závorkách pod čísly kmenů jsou uvedeny třídy podobnosti, resp. ribotypy u profilů společných pro více tříd. Zahrnuti jsou referenční kmeny pro jednotlivé genomospecies

Fig. 2. Schematic representation of different *EcoRI* ribotypes encountered among strains of the *A. calcoaceticus*–*A. baumannii* complex. The relatedness groups or ribotypes (if the profiles are common for several groups) are given in parenthesis below the strain numbers. Reference strains for different genomospecies are included

podobného rozsahu byly v jednom případě zjištěny také u kmenů téže třídy (kmeny č. 49 a 50 versus ostatní kmeny třídy IVa). Možnost, že jde o parciální nebo hvězdičkové štěpení, byla u kmenů č. 49, 50 a 51 testována izolací DNA metodou fenol-chloroformové extrakce (13) a jejím štěpením za různých podmínek (doba inkubace 0,5, 1, 5 a 24 h; *Hind*III v množství 30U a 5U/μg DNA). Způsob izolace ani změna podmínek štěpení neovlivnily výsledný elektroforetogram.

Ribotypizace. Ribotypizací bylo popsáno 55 kmenů ze souboru izolovaného na KPM a po dvou kmenech z každé mimopražské skupiny (obr. 1 a 2). Genotypově a fenotypově ostře odlišené kmeny č. 1, 13 a 115 popsány nebyly. Ribotypy obsahovaly 11–14

proužků o velikosti 0,8–23 kb. Mezi 31 třídami bylo rozlišeno 24 různých profilů. Identické ribotypy měly třídy Ia, Ib, IIa a IIb (ribotyp A), charakterizované shodným nebo velmi podobným restričním profilem a plazmidem o velikosti 8,7 kb a třídy IVa, IVb a IVc (ribotyp B) se stejnými biochemickými vlastnostmi a podobným restričním profilem. Mezi kmeny GS 13 byly rozlišeny pouze tři různé ribotypy.

Identifikace genomospecies. S výjimkou kmene č. 46 (nerostl na *trans*-akoniátu, glutarátu, β-alaninu a azelátu) byly všechny studované kmeny biochemicky zařazeny do komplexu *Acb* (tab. 4). Ribotypizací bylo z 28 tříd izolovaných na KPM identifikováno 18 jako *A. baumannii*, 5 jako genomospecies 13 a 5 jako

Tab. 4. Biochemické identifikační profily* zjištěné u 107 kmenů komplexu *A. calcoaceticus*–*A. baumannii*

Table 4. Biochemical identification profiles* encountered among 107 strains of the *A. calcoaceticus*–*A. baumannii* complex

Biochemický identifikační profil	T 44	T 41	T 37	G L U	G E L	H E M	L A T	A B U	A C O	C I T	G R T	A S P	A Z E	A L A	H I S	M L T	M L N	H I A	P H E	P A C
P1	+			+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
P2	+			+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
P3	+			+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
P4	+			+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
P5	+			+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
P6	+			+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
P7	+			+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
P8	+			+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
P9	+			+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
P10	+			+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
P11	+			+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
P12	-	+		+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
P13	+			+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
P14	-	+		+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
P15	-	+		+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
P16	-	+		+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
P17	+			+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
P18		-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
P19	-	+		+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Vysvětlivky: * Sestava znaků použitých jako vstupní data pro numericou pravděpodobnostní identifikaci (viz tab. 5); T44, T41, T37 = růst při 44 °C, 41 °C, 37 °C; GLU = okyselování média s glukózou; GEL = hydrolyza želatiny; HEM = hemolýza; utilizace: LAT = DL-laktát, ABU = DL-4-aminobutyrate, ACO = *trans*-akonitát, CIT = citrát, GRT = glutarát, ASP = L-aspartát, AZE = aze-lát, ALA = β-alanin, HIS = L-histidin, MLT = D-malát, MLN = malonát, HIA = histamin, PHE = L-fenylalanin, PAC = fenylacetát

Explanations: * Set of characters used as input data for numerical probabilistic identification (see Table 5); T44, T41, T37 = growth at 44 °C, 41 °C, 37 °C; GLU = production of acid from glucose; GEL = gelatin hydrolysis; HEM = hemolysis of sheep blood; utilization of: LAT = DL-lactate, ABU = DL-4-aminobutyrate, ACO = *trans*-aconitate, CIT = citrate, GRT = glutarate, ASP = aspartate, AZE = azelate, ALA = β-alanine, HIS = L-histidine, MLT = D-malate, MNT = malonate, HIA = histamine, PHE = L-phenylalanine, PAC = phenylacetate

genomospecies 3; kmeny reprezentující mimopražské izoláty byly identifikovány jako *A. baumannii*. V tabulce 5 jsou porovnány výsledky genotypové identifikace a numerické pravděpodobnostní identifikace podle biochemických identifikačních schémat Grimonta a Bouveta (18) a Gerner-Smidta et al. (14) u kmenů reprezentujících jednotlivé třídy podobnosti (zahrnuté byly obě biochemické varianty tříd XI a XX). Podle schématu Grimonta a Bouveta bylo 26 kmenů identifikováno správně (21 kmenů jako *A. baumannii* a 5 kmenů jako GS 3), z 6 kmenů GS 13 byly 3 zařazeny skupinově (do komplexu *Acb*) a 3 kmeny byly identifikovány nesprávně. Podle schématu Gerner-Smidta et al. bylo správně zařazeno 9 kmenů (2 kmeny jako *A. baumannii*, 5 kmenů jako GS 13 a 2 kmeny jako GS 3), zbývající byly zařazeny skupinově.

Typizace kmenů izolovaných v mimopražských nemocnicích. Soubor 12 kmenů byl klasifikován do tří tříd, obsahujících po čtyřech kmenech stejného původu (viz tab. 2). Sledované vlastnosti byly uvnitř jednotlivých tříd homogenní a kmeny různého původu bylo možno rozlišit pomocí jakékoliv z použi-

tých metod (antibiogram neuveden). Třídy Ib a IVc byly velmi podobné třídám Ia a IVa,b izolovaným na KPM.

Diskuse

Identifikace

Komplex *Acb* zahrnuje fenotypově a genotypově podobné genomospecies 1 (*A. calcoaceticus*), 2 (*A. baumannii*), 3 a 13 sensu Tjernbergová & Ursing, lišící se svým klinickým významem. Zatímco *A. calcoaceticus* je téměř výlučně izolován z vnějšího prostředí, je za klinicky nejvýznamnější druh považován *A. baumannii*, který v pracích vycházejících z identifikačního schématu Bouveta a Grimonta (6) představoval 61–84 % všech nemocničních kmenů rodu *Acinetobacter* (6, 8, 12, 24). Schéma Bouveta a Grimonta však neobsahuje GS 13 a jako základní kritérium pro rozlišení *A. baumannii* a GS 3 považuje jejich rozdílný růst při

Tab. 5. Porovnání výsledků genotypové a biochemické identifikace kmenů komplexu *A. calcoaceticus*–*A. baumannii***Table 5.** Comparison of genotypic and biochemical identification of strains of the *A. calcoaceticus*–*A. baumannii* complex

Kmen č. (třída podobnosti)	Ribotypizace	BIP	Biochemická identifikace	
	Gerner-Smidt (1993)		Grimont & Bouvet (1991)	Gerner-Smidt et al. (1991)
15 (IIa), 56 (IIb), 10 (III), 24 (IVa), 78 (IVb), 220 (IVc), 301 (V), 191 (VI), 67 (VIII), 190 (IX), 81 (XV), 88 (XVI)	<i>A. baumannii</i>	P1	<i>A. baumannii</i>	komplex <i>Acb</i> (2, 13)
7 (Ia)	<i>A. baumannii</i>	P2	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>
307 (Ib)	<i>A. baumannii</i>	P3	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>
4 (XI)*	<i>A. baumannii</i>	P4	<i>A. baumannii</i>	komplex <i>Acb</i> (13, 2, 1)
5 (XI)*	<i>A. baumannii</i>	P5	<i>A. baumannii</i>	komplex <i>Acb</i> (2, 13, 1)
33 (VII)	<i>A. baumannii</i>	P6	<i>A. baumannii</i>	komplex <i>Acb</i> (2, 13)
45 (XII), 70 (X)	<i>A. baumannii</i>	P7	<i>A. baumannii</i>	komplex <i>Acb</i> (2, 13)
46 (XIII)	<i>A. baumannii</i>	P8	ni	ni
47 (XIV), 103 (XVII)	<i>A. baumannii</i>	P9	<i>A. baumannii</i>	komplex <i>Acb</i> (2, 13)
12 (XVIII), 41 (XIX)	GS 13	P10	<i>A. baumannii</i>	GS 13
84 (XX)**, 112 (XXII)	GS 13	P11	komplex <i>Acb</i> (2, 3)	GS 13
92 (XX)**	GS 13	P12	GS 3	GS 13
106 (XXI)	GS 13	P13	komplex <i>Acb</i> (2, 3)	komplex <i>Acb</i> (13, 2)
65 (XXIII)	GS 3	P14	GS 3	GS 3
14 (XXIV), 119 (XXV), 55 (XXVII)	GS 3	P15	GS 3	komplex <i>Acb</i> (3, 1, 13)
36 (XXVI)	GS 3	P16	GS 3	GS 3
1 (XXVIII)	nt	P17	komplex <i>Acb</i> (2, 3)	GS 13
13 (XXIX)	nt	P18	komplex <i>Acb</i> (1, 2, 3)	komplex <i>Acb</i> (1, 3)
115 (XXX)	nt	P19	GS 3	komplex <i>Acb</i> (3, 13)

Vysvětlivky: Kmeny reprezentující jednotlivé třídy podobnosti jsou rozděleny podle biochemických identifikačních profilů (viz tab. 4). Frekvenční matice pro numerickou pravděpodobnostní identifikaci byly převzaty z prací Grimonta a Bouveta (18) a Gerner-Smidta et al. (14). Kritéria pro přijetí druhové identifikace byla: identifikační skóre (I.S.) $\geq 0,9$, modální podíl pravděpodobnosti $\geq 0,0001$; pro skupinovou identifikaci komplexu *Acb* musel být součet hodnot I.S. pro první dvě, resp. tři genomospecies komplexu *Acb*, z nichž první nedosáhla I.S. $\geq 0,9$, větší nebo roven 0,9 (genomospecies jsou uvedeny v závorce v pořadí podle hodnot I.S.). BIP = biochemický identifikační profil; nt = netestováno; ni = druhově ani skupinově neidentifikováno; *, resp. ** kmeny s odlišným BIP náležející do téže třídy podobnosti (viz tab. 1)

Explanations: Strains representative of different relatedness groups are divided according to their biochemical identification profiles (see Table 4). Frequency matrices for numerical probabilistic identification were taken from the papers of Grimont and Bouvet (18) and Gerner-Schmidt et al. (14). The species identification was accepted if the following criteria were met: identification score (I.S.) ≥ 0.9 ; modal likelihood fraction ≥ 0.0001 ; for the group identification of the *Acb* complex the sum of the I.S. values of the first two or three (if the first of them did not reach I.S. ≥ 0.9) genomospecies of the *Acb* complex, had to be higher than or equal to 0.9 (the genomospecies are given in parenthesis in order according to their I.S. values). BIP = biochemical identification profile; nt = not tested; ni = not identified; * or ** strains showing different BIPs but belonging to the same relatedness group (see Table 1)

44 °C. Studie založené na genotypové identifikaci komplexu *Acb* prokázaly, že GS 13 se může v klinickém materiálu vyskytovat s četností srovnatelnou s *A. baumannii* a GS 3 (15) a má význam i při nemocničních epidemiích (9). Většina kmenů GS 13 roste při 44 °C a téměř všechny kmeny této genomospecies patří do biotypu 9 (14, 15), který je jedním z nejčastěji izolovaných biotypů *A. baumannii* (6, 24). Obtíže fenotypové diferenciaci komplexu *Acb* jsou u našeho souboru dobře patrné z porovnání výsledků biochemické identifikace s výsledky identifikace pomocí ribotypizace. Schématem podle Grimonta a Bouveta byly správně identifikovány všechny kmeny *A. baumannii* (s výjimkou biochemicky atypického kmene č. 46) a GS 3, ovšem za cenu nesprávné identifikace kmenů GS 13. Schéma podle Gerner-Smidta et al.,

obsahující GS 13, umožnilo většinou pouze skupinovou identifikaci komplexu *Acb*. Biochemickou diferenciaci komplexu *Acb* dále problematizuje růst některých kmenů GS 3 při 44 °C (9, 15). Legitimním způsobem identifikace je tudíž pouze použití některé z genotypových metod identifikace [DNA-DNA hybridizace (27), ribotypizace (13) nebo restrikční analýzy oblastí oddělovacích genů pro 16S a 23S rRNA (11)], umožňující rozlišení již známých genomospecies i rezeznání nových, dosud nepopsaných skupin komplexu *Acb* (15).

Z 28 fenotypově nebo genotypově odlišných kmenů (reprezentujících jednotlivé třídy podobnosti) izolovaných na KPM bylo ribotypizací identifikováno 18 kmenů (64 %) jako *A. baumannii*. Uvažují-li se všechny kmeny izolované na KPM při vyloučení identických

izolátů z téhož pacienta, potom na *A. baumannii* připadalo 40 z celkového počtu 50 kmenů (80 %). Do tohoto druhu byly zařazeny také všechny kmeny izolované v mimopražských nemocnicích. Pouze 10 kmenů izolovaných na KPM bylo identifikováno jako GS 3 nebo GS 13. Tyto kmeny se nešířily mezi pacienty a s jedinou výjimkou byly dobře citlivé na antibiotika. Naše výsledky jsou tak zcela v souladu se studii založenými na biochemické i genotypové identifikaci, dokládajícími rozhodující význam *A. baumannii* u nemocničních infekcí (6, 8, 11, 12, 24).

Typizace

Porovnání citlivosti na antibiotika je součástí většiny studií zabývajících se typizací nemocničních kmenů acinetobakterů. Nejpoužívanější je kvalitativní interpretace průměrů inhibičních zón podle hodnot hraničních koncentrací (1, 12, 25). Kvantitativní hodnoty citlivosti jsou však v mnoha případech blízké hodnotě hraniční koncentrace, což při binární klasifikaci citlivý–rezistentní může vést k zařazení příbuzných kmenů do různých vzorců rezistence. Tomuto úskalí se lze vyhnout numerickou analýzou kvantitativních hodnot citlivosti (9). Porovnání MIC u kmenů izolovaných na KPM prokázalo malou diskriminační účinnost antibiogramu. Metoda byla neúčinná u citlivých kmenů, jejichž antibiogram je výrazem druhové primární rezistence, a umožnila pouze omezené rozlišení kmenů s větším počtem rezistencí. Antibiogram byl zároveň nejméně stabilním znakem. V několika případech byly zaznamenány významné rozdíly v hodnotách MIC u jinak identických kmenů izolovaných z téhož pacienta. Tyto rozdíly mohou být následkem selekce rezistentních mutantů používanými antibiotiky. Hlavní námitkou proti aplikaci antibiogramu pro epidemiologickou typizaci je tudíž použití znaků, které jsou vystaveny nejsilnějšímu selekčnímu tlaku. Antibiogram je nejdostupnější metoda typizace, která je většinou už součástí standardního vyšetření. Lze ji však použít pouze pro orientační diferenciaci kmenů v první etapě subspecifické analýzy nebo pro získání doplňující informace při aplikaci účinnějších typizačních metod.

Biotypizací podle Bouveta a Grimonta se u komplexu *Acb* rozlišuje celkem 19 biotypů (6, 8). Diskriminační účinnost metody je však omezena vysokou prevalencí biotypů 1, 2, 6 a 9 u kmenů izolovaných z nemocničních epidemií (6, 8, 12, 24). K biotypům 2, 6 a 9 náležela také většina kmenů izolovaných na KPM a v mimopražských nemocnicích. Důsledky nedostatečného rozlišení ilustruje dvojice případů, v nichž byly dva odlišné kmeny biotypu 9 izolovány z téhož pacienta. V obou případech zároveň šlo o kmeny různých genomospecies. S řadou stejných biotypů se lze setkat u *A. baumannii* a GS 3 (8, 15) a kmeny

GS 13 patří téměř výlučně do biotypu 9 (14, 15). Biotypizace podle B&G tudíž předpokládá spolehlivou druhovou identifikaci nebo současnou aplikaci metody schopné rozlišit jednotlivé genomospecies. Použití většího počtu biochemických testů zvyšuje účinnost metody, může však být komplikováno nestabilitou některých znaků. V našem souboru byly rozdíly u izolátů téhož kmene zaznamenány v růstu při 44 °C a na β -alaninu a změny biochemických vlastností byly popsány u skladovaných kultur acinetobakterů (1) i u epidemiologicky souvisejících kmenů s identickým ribotypem a profilem membránových proteinů (9).

Stanovení plazmidového profilu je časově a materiálově nenáročnou metodou, jejíž účinnost závisí na prevalenci kmenů obsahujících plazmidovou DNA. Hodnota literárních údajů týkajících se výskytu plazmidů u komplexu *Acb* je většinou omezena malým počtem studovaných kmenů nebo nedostatečnou identifikací. Ze studií vycházejících z nové klasifikace lze uvést práci Gerner-Smidta a Tjernbergové (15), v níž byly plazmidy prokázány u pouhých 13 z 23 genotypově identifikovaných kmenů komplexu *Acb*, a práce Seiferta et al., které prokázaly plazmidovou DNA u 84 % kmenů GS 3 (26) a 75 % kmenů *A. baumannii* (25) identifikovaných biochemicky. V naší studii se plazmidová DNA vyskytovala u všech kmenů GS 3 a GS 13 a u 83 % feneticky nebo epidemiologicky odlišných kmenů *A. baumannii*. Přítomnost identického plazmidu o velikosti 8,7 kb u genotypově podobných tříd Ia, Ib, IIa, IIb a III a absence plazmidové DNA u genotypově a biochemicky podobných tříd IVa, IVb a IVc ukazují na možnost vazby určitých plazmidů (resp. jejich absenci v druhém případě) na skupiny příbuzných kmenů. Významný je současný výskyt několika plazmidů, který zvyšuje diskriminační účinnost metody. Touto metodou bylo možné rozlišit téměř všechny třídy kmenů obsahujících plazmidy, a to včetně epidemiologicky nesouvisejících kmenů s identickým ribotypem, restričním profilem a biotypem podle B&G. Plazmidový profil tak u typovatelných kmenů představuje metodu s velkou diskriminační účinností, kterou lze účinně kombinovat s metodami strukturní analýzy chromosomální DNA.

Restriční analýza buněčné DNA je nejdostupnější metodou strukturní analýzy genomu. Malé rozdíly v restričních profilech epidemiologicky souvisejících kmenů se obvykle považují za důsledek recentních mutací a nejsou považovány za významné. V souladu s tím je nález rozdílu v rozložení několika fragmentů u jinak identických kmenů izolovaných z téhož pacienta. Odchylky srovnatelného rozsahu však byly zjištěny také mezi jinak identickými kmeny různého původu i mezi kmeny více nebo méně odlišnými v ostatních znacích. Ve všech případech šlo o skupiny kmenů s identickým nebo velmi podobným ribotypem, které patřily do téže genomospecies. Restriční analýza tudíž umožňuje pouze rozlišení kmenů s výraz-

nějsími rozdíly ve struktuře chromosomální DNA, a proto se musí kombinovat s dalšími metodami.

Ribotypizace umožňuje zároveň spolehlivou identifikaci genomospecies komplexu *Acb* a typizaci (13). Vyznačuje se vysokou diskriminační účinností (13), ale shodné ribotypy byly prokázány u kmenů izolovaných z nemocničních epidemií na různých lokalitách (9). V našem souboru byly identické ribotypy prokázány u tříd sdílejících také většinu ostatních znaků, což lze považovat za výraz celkové podobnosti geneticky příbuzných kmenů. Stejně ribotypy u tříd s odlišnými fenotypovými vlastnostmi a plazmidovým profilem ukazují, že ani tato metoda nemůže být použita jako jediné kritérium pro diferenciaci kmenů.

Zajímavou skupinu z hlediska vzájemné podobnosti představovaly multirezistentní třídy Ia, IIa a III izolované ve stejném období na KPM. Všechny sdílely identický restriční profil a spektrum buněčných proteinů (výsledky neuvedeny), měly identický nebo velmi podobný ribotyp a obsahovaly strukturně identický plazmid 8,7 kb. Zvláště neobvyklý byl případ tříd Ia a IIa, v němž spolehlivé rozlišení fenotypově odlišných kmenů neumožnila žádná z genotypových metod. Fenotypovou odlišnost kmenů s identickým genotypem, pocházejících ze stejné lokality, je možné interpretovat jako následek nedávné klonální divergence. Tu lze očekávat na odděleních s důkladnou aseptickou bariérou a permanentní aplikací antibiotik, umožňujících dlouhodobou perzistenci a změny vlastností u omezeného spektra kmenů. Jiné vysvětlení předpokládá současný výskyt kmenů různého původu, které náležejí do téže genotypově diskrétní skupiny. Pro tuto hypotézu svědčí výskyt vzájemně velmi podobných multirezistentních kmenů na různých lokalitách (KPM, Ostrava, Kladno), přičemž vzhledem k povaze acinetobakterových infekcí je málo pravděpodobné rozšíření původně jediného kmene. Důkladná analýza této otázky bude vyžadovat klasifikační studii kmenů izolovaných v geograficky širší oblasti. V každém případě však tento fakt problematizuje použití jediné metody typizace i v případě lokální situace a početně malého souboru kmenů.

Nesprávným epidemiologickým závěrům založeným na výsledcích jediné metody se lze vyhnout pouze současnou aplikací několika metod popisujících různé biologické nebo molekulární vlastnosti bakterií. Efektivní sestavu v našem případě tvořila kombinace ribotypu (nebo restričního profilu buněčné DNA), biotypu podle B&G a plazmidového profilu. Jinými autory byly navrženy jako účinné kombinace biotypu, fagotypu a profilu proteinů vnější membrány (8) nebo biotypu, fagotypu a antibiogramu (12). Oproti těmto kombinacím naše sestava zahrnuje metodu strukturní analýzy genomu, která spolehlivě rozlišuje jednotlivé genomospecies, a zároveň neklade zvláštní požadavky na materiál, určené povahou studovaného taxonu (fagotypizace). Skutečnost, že ani tato kombinace neodlišila všechny třídy, pouze připomíná, že typi-

začními metodami se neidentifikují "individuální kmeny", nýbrž se pouze rozlišují více či méně úzké kategorie na poddruhové úrovni.

Druhá identifikace se pokládá za primární epidemiologický marker (18). Komplex *Acb* však nelze jednoznačně diferencovat pomocí fenotypových testů a metody umožňující spolehlivou identifikaci jednotlivých genomospecies jsou materiálově a časově náročnější než většina typizačních metod. Lze proto zpochybnit nezbytnost druhové diferenciace komplexu *Acb* v situaci, kdy je zapotřebí rozhodnout o společném původu kmenů a kdy je použita metoda reflektující rozdíly mezi jednotlivými genomospecies (např. restriční analýza buněčné DNA). Tato zdánlivě paradoxní situace vyplývá z toho, že komplex *Acb* zahrnuje genomospecies, jejichž rozlišení DNA-DNA hybridizací se pohybuje kolem hodnoty přijaté jako kritérium pro definici genomospecies (27). Výrazem této genetické podobnosti je i jejich podobnost fenotypová. V komplexu *Acb* byly navíc nedávno popsány dvě nové genomospecies (15), což dále problematizuje nejen praktickou, ale i nomenklaturní opodstatněnost druhové diferenciace komplexu *Acb*.

Studie byla součástí projektu IGA MZ ČR 0968-2. Pracovní pobyt A.N. v Pasteurově institutu v Paříži byl podpořen stipendiem FEMS za rok 1993.

Za poskytnutí kmenů autoři děkují MUDr. A. Steinerové (Kladno), RNDr. V. Toršové a RNDr. A. Andělové (Ostrava).

Literatura

1. **Alexander, M., Rahman, M., Taylor, M., Noble, W.C.:** A study of the value of the electrophoretic and other techniques for typing *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. hosp. Infect.*, 12, 1988, s. 273–287.
2. **Baumann, P.:** Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J. Bact.*, 96, 1968, s. 39–42.
3. **Bergogne-Bérézin, E., Joly-Guillou, M.L.:** An underestimated nosocomial pathogen, *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 16, 1985, s. 535–538.
4. **Bergogne-Bérézin, E.:** The increasing significance of outbreaks of *Acinetobacter* spp.: the need for control and new agent. *J. hosp. Infect.*, 30, 1995, Supl., s. 441–452.
5. **Bouvet, P.J.M., Grimont, P.A.D.:** Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int. J. Syst. Bact.*, 36, 1986, s. 228–240.
6. **Bouvet, P.J.M., Grimont, P.A.D.:** Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. (Paris)*, 138, 1987, s. 569–578.
7. **Bouvet, P.J.M., Jeanjean, S.:** Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. *Res. Microbiol.*, 140, 1989, s. 291–299.

8. **Bouvet, P.J.M., Jeanjean, S., View, J.-F., Dijkshoorn, L.:** Species, biotype, and bacteriophage type determinations compared with cell envelope protein profiles for typing *Acinetobacter* strains. *J. clin. Microbiol.*, 28, 1990, s. 170–176.
9. **Dijkshoorn, L., Auken, H.M., Gerner-Smidt, P. et al.:** Correlation of typing methods for *Acinetobacter* isolates from hospital outbreaks. *J. clin. Microbiol.*, 31, 1993, s. 702–705.
10. **Domenico, P., Marx, J.L., Schoch, P.E., Cunha, B.A.:** Rapid plasmid DNA isolation from mucoid gram-negative bacteria. *J. clin. Microbiol.*, 30, 1992, s. 2859–2863.
11. **Dolzani, L., Tonin, E., Lagatolla, C. et al.:** Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*–*A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S–23S rRNA intergenic spacer sequences. *J. clin. Microbiol.*, 33, 1995, s. 1108–1113.
12. **Giamanco, A., View, J.F., Bouvet, P.J.M. et al.:** A comparative assay of epidemiological markers for *Acinetobacter* strains isolated in a hospital. *Zbl. Bakt.*, 272, 1989, s. 231–241.
13. **Gerner-Smidt, P.:** Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* komplex. *J. clin. Microbiol.*, 30, 1992, s. 2680–2685.
14. **Gerner-Smidt, P., Tjernberg, I., Ursing, P.:** Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J. clin. Microbiol.*, 29, 1991, s. 277–282.
15. **Gerner-Smidt, P., Tjernberg, I.:** *Acinetobacter* in Denmark: II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex. *Acta path. microbiol. scand.*, 101, 1993, s. 826–832.
16. **Gouby, A., Carles-Nurit, M.-J., Bouziges, N. et al.:** Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreaks of *Acinetobacter baumannii*. *J. clin. Microbiol.*, 30, 1992, s. 1588–1591.
17. **Grimberg, J., Maguire, S., Belluscio, L.:** A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal *E. coli* DNA. *Nucl. Acids Res.*, 17, 1989, s. 8893.
18. **Grimont, P.A.D., Bouvet, P.J.M.:** Taxonomy of *Acinetobacter*. In: Towner, K.J., Bergogne-Bérézin, E., Fewson, C. A. (eds): *The biology of Acinetobacter*. New York, Plenum Press 1991, s. 25–36.
19. **Horrevorts, A., Bergman, K., Kollée, L. et al.:** Clinical and epidemiological investigations of *Acinetobacter* genospecies 3 in a neonatal intensive care unit. *J. clin. Microbiol.*, 33, 1995, s. 1567–1572.
20. **Juni, E.:** Interspecies transformation of *Acinetobacter*: Genetic evidence for ubiquitous genus. *J. Bact.*, 112, 1972, s. 917–931.
21. **Kado, C.I., Liu, S.T.:** Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bact.*, 145, 1981, s. 1365–1373.
22. **Kämpfer, P., Tjernberg, I., Ursing, P.:** Numerical classification and identification of *Acinetobacter* genomic species. *J. appl. Bact.*, 75, 1993, s. 259–268.
23. **Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.:** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., Cold Spring Harbor 1982.
24. **Seifert, H., Baginski, R., Schulze, A., Pulverer, G.:** The distribution of *Acinetobacter* species in clinical culture materials. *Zbl. Bakt.*, 279, 1993, s. 544–552.
25. **Seifert, H., Schulze, A., Baginski, R., Pulverer, G.:** Comparison of four different methods for epidemiologic typing of *A. baumannii*. *J. clin. Microbiol.*, 32, 1994, s. 1816–1819.
26. **Seifert, H., Schulze, A., Baginski, R., Pulverer, G.:** Plasmid DNA fingerprinting of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii*. *J. clin. Microbiol.*, 32, 1994, s. 82–86.
27. **Tjernberg, I., Ursing, P.:** Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *Acta path. microbiol. scand.*, 97, 1989, s. 595–605.
28. **Urbášková, P., Hausnerová, S.:** Stanovení minimální inhibiční koncentrace. In: Urbášková P. a spol.: *Vyšetření pro antimikrobiální terapii*. Praha, Avicenum 1985, s. 19–73.
29. **Taplin, D., Rebell, G., Zaias, N.:** The human skin as a source of *Mima-Herella* infections. *J. Amer. med. Assoc.*, 186, 1963, s. 952–955.
30. **Traub, W.A.:** *Acinetobacter baumannii* serotyping for delineation of outbreaks of nosocomial cross-infection. *J. clin. Microbiol.*, 27, 1989, s. 2713–2716.
31. **Véron, M.:** Nutrition et taxonomie des entérobactéries. I. Méthode d'étude des auxanogrammes. *Ann. Microbiol. (Paris)*, 126A, 1963, s. 267–274.
32. **Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R. et al.:** Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic. *Int. J. Syst. Bact.*, 37, 1987, s. 463–464.

Došlo do redakce: 28. 11. 1995

RNDr. Alexandr Nemeč,
Státní zdravotní ústav,
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

Errata

Prosíme čtenáře, aby si laskavě opravili chybu v článku "Taxonomie rodu *Acinetobacter*" v 1. čísle na str. 28. Ve větě "Subspecifická klasifikace prokázala geneticky ostře ohraničenou skupinu 11 kmenů" má být namísto geneticky správně **feneticky**.