

Multirezistentní klony *Acinetobacter baumannii* v České republice

A. NEMEC¹, T. J. K. VAN DER REIJDEN², L. DIJKSHOORN²

¹Státní zdravotní ústav, Praha, ²Department of Infectious Diseases, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

SOUHRN

Nemec A., van der Reijden T.J.K., Dijkshoorn L.: **Multirezistentní klony *Acinetobacter baumannii* v České republice.**

Cíl: Prostudování genetické příbuznosti českých multirezistentních kmenů *Acinetobacter baumannii* a epidemických klonů ze severozápadní Evropy.

Metodika: Studovaný soubor zahrnoval 70 epidemiologicky nesouvisejících multirezistentních kmenů, izolovaných v českých nemocnicích v letech 1991–2001, 8 referenčních kmenů pro epidemické klony I a II ze severozápadní Evropy (Dijkshoorn L, et al. J Clin Microbiol 1996;34:1519–25) a kontrolní skupinu 15 citlivých českých kmenů. Kmeny byly studovány pomocí ribotypizace, AFLP fingerprintingu, biotypizace a vyšetřeny na citlivost k 11 antibiotikům diskovými difúzními testy (ampicilin + sulbaktam, piperacilin, ceftazidim, imipenem, ko-trimoxazol, ofloxacin, gentamicin, tobramycin, amikacin, netilmicin a tetracyklin).

Výsledky: Pomocí numerické analýzy AFLP profilů a ribotypů byly české multirezistentní kmeny klasifikovány do klonu I ($n = 41$), klonu II ($n = 21$) a heterogenní skupiny ostatních kmenů ($n = 8$). Citlivé kmeny byly genotypově a fenotypově heterogenní a ostře odlišené od klonu I a II. Kmeny náležející k těmto klonům měly shodné nebo podobné ribotypy, odlišné od ribotypů ostatních kmenů. Kmeny klonu I náležely k biotypům 11 ($n = 24$), 6 ($n = 15$) a 12 ($n = 1$) a byly v průměru rezistentní k 7 antibiotikům; kmeny klonu II patřily k biotypu 2 a byly v průměru rezistentní k 6 antibiotikům.

Závěr: České multirezistentní kmeny *A. baumannii* patřily převážně do dvou klonálních uskupení, prokázaných u nemocničních epidemických kmenů ze severozápadní Evropy. Skupiny A a B, dříve popsané v České republice, jsou podmnožinami těchto klonů (klonu I resp. klonu II). Oba klony zahrnovaly epidemické i sporadické kmeny, vyskytující se nejméně od roku 1991 v České republice. Dlouhodobé panevropské rozšíření a vnitřní typová diverzita klonů naznačuje, že jde o relativně stará uskupení, zahrnující geografické subklony. Vysoce rezistentní české kmeny klonu I náležející k biotypu 11 představují pravděpodobně jeden z těchto subklonů.

SUMMARY

Nemec A., van der Reijden T.J.K., Dijkshoorn L.: **Multiresistant clones of *Acinetobacter baumannii* in the Czech republic.**

Objectives: To investigate genetic relatedness of multiresistant hospital *Acinetobacter baumannii* strains from the Czech Republic and epidemic *A. baumannii* clones from north-western Europe.

Methods: Seventy epidemiologically unrelated multiresistant strains isolated in Czech hospitals between 1991 and 2001, 8 reference strains of epidemic clones I and II from north-western Europe (Dijkshoorn L, et al. J Clin Microbiol 1996;34:1519–25) and 15 control susceptible Czech strains were studied by AFLP fingerprinting, ribotyping with *HindIII* and *HincII* and biotyping and were tested for susceptibility to 11 antibiotics (ampicillin + sulbactam, piperacillin, ceftazidime, imipenem, co-trimoxazole, ofloxacin, gentamicin, tobramycin, amikacin, netilmicin and tetracycline) using disk diffusion test.

Results: Based on numerical analysis of AFLP fingerprints and ribotypes, the Czech multiresistant strains were classified into clone I ($n = 41$), clone II ($n = 21$) or a heterogeneous group of other strains ($n = 8$). The susceptible strains were genotypically and phenotypically heterogeneous and distinct from those of clones I and II. The strains of the same clone had identical or similar ribotypes not found in the other strains. Clone I strains belonged to biotypes 11 ($n = 24$), 6 ($n = 15$) or 12 ($n = 1$) and were resistant, on average to seven antibiotics; clone II strains were of biotype 2 and were resistant, on average to six antibiotics.

Conclusions: The Czech multiresistant *A. baumannii* strains belonged mostly to two clonal lineages previously recognized among strains from north-western European hospitals. Groups A and B recently described in the Czech Republic are subgroups of these clones (clone I and clone II, respectively). Both clones comprise outbreak and sporadic strains isolated from all over the Czech Republic since 1991. Paneuropean spread over a long time and intraclonal type diversity indicate that the clones are relatively old groups with a number of geographical subclones. One of these is probably represented by highly resistant Czech clone I strains belonging to biotype 11.

Klin mikrobiol inf lék 2003;9(3):130–137

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

Došlo do redakce: 20. 3. 2003

Přijato k tisku: 24. 4. 2003

Úvod

Rod *Acinetobacter* zahrnuje ubikvitní mikroorganismy, které jsou významnými původci nemocničních infekcí. Kli-

nicky a epidemiologicky nejvýznamnější druh je *Acinetobacter baumannii*, do něhož patří většina nemocničních izolátů acinetobakterů [1,2]. Některé kmeny *A. baumannii* mo-

hou v nemocničním prostředí dlouhodobě přežívat a hromadně se šířit. Tyto kmeny jsou často rezistentní k většině terapeuticky používaných antibiotik a představují závažný léčebný a epidemiologický problém [1,3].

Vnitrodruhová (kmenová, klonální) diverzita *A. baumannii* není dosud dostatečně prostudována. Lze přitom předpokládat, že podobně jako u jiných druhů bakterií [4,5] existují kmeny s výraznější schopností šířit se v nemocničním prostředí, kolonizovat a infikovat pacienty a získávat rezistenci k antibiotikům. Znalost vnitrodruhové populační struktury může mít význam pro identifikaci znaků specifických pro epidemické a virulentní klony i pro studium biologických faktorů, uplatňujících se v etiologii a epidemiologii infekcí.

V předchozí studii jsme prokázali, že variabilita vlastností multirezistentních (MR) nemocničních kmenů *A. baumannii* z České republiky je mnohem menší než u citlivých izolátů téhož druhu [2]. Většina MR kmenů náležela do dvou skupin, označených jako A a B, z nichž každá byla charakterizována specifickým ribotypem (profilem restričních fragmentů chromozomální DNA nesoucích geny pro rRNA) a shodným nebo podobným biotypem a plazmidovým profilem. Svými vlastnostmi tyto skupiny odpovídaly epidemickým klonům I a II, které byly popsány u nemocničních kmenů *A. baumannii*, pocházejících ze severozápadní Evropy [6]. Identitu české skupiny A a klonu I naznačily i výsledky analýzy pomocí monoklonálních protilátek proti O-antigenu [7]. Oproti tomu zůstala nevyjasněna genetická příbuznost skupiny B s klonem II a pozice některých nezařazených MR kmenů [7]. Tyto otázky lze řešit pomocí citlivých metod srovnávací analýzy bakteriálního genomu jako je AFLPTM [8] nebo MLST (Multilocus Sequence Typing) [9].

Cílem této práce bylo prostudovat genotypovou podobnost nemocničních kmenů *A. baumannii* izolovaných v České republice a epidemických klonů ze severozápadní Evropy. České kmeny z let 1991–2001 a kmeny reprezentující epidemické klony I a II byly studovány pomocí ribotypizace a metody AFLP. Výsledky ukázaly, že české MR kmeny náleží téměř výlučně do klonů I a II. Studie zároveň shrnuje dosud známé fenotypové a genotypové vlastnosti epidemických klonů.

Materiál a metody

Kmeny

Soubor ARCH zahrnoval 52 archivních kmenů *A. baumannii* izolovaných v letech 1991–1999 v České republice. Tento soubor byl vybrán z více než 700 klinických izolátů acinetobakterů tak, aby obsahoval nemocniční kmeny maximálně heterogenní v čase a místě izolace. Soubor ARCH byl detailně charakterizován v předchozím sdělení [7], které je dostupné na <http://jcm.asm.org/cgi/reprint/39/7/2576.pdf>, a zahrnoval MR kmeny skupiny A ($n = 23$), skupiny B ($n = 7$) a ostatní MR ($n = 7$) a citlivé ($n = 15$) kmeny.

Soubor REC zahrnoval 33 nemocničních kmenů *A. baumannii* z České republiky vybraných podle biochemických vlastností a citlivosti na antibiotika u 250 izolátů zaslaných do Státního zdravotního ústavu v letech 2000–2001. Vybrány byly pouze MR kmeny (definice multirezistence – viz níže) maximálně heterogenní v čase a místě izolace (pocháze-

ly z 19 nemocnic ve 13 městech). Epidemiologická vazba izolátů pocházejících z téže nemocnice byla vyloučena pomocí biotypizace a makrorestriční analýzy genomové DNA [10]. Kmeny byly izolovány z klinického materiálu (sputum, krev, moč, stěry z ran aj.) pacientů hospitalizovaných téměř výlučně na odděleních intenzivní péče.

Referenčními kmeny pro epidemické klony byly RUH 3282, RUH 3242, RUH 436 a RUH 875 (klon I) a RUH 134, RUH 3240, RUH 3422 a RUH 3245 (klon II) [6]. Tyto kmeny byly izolovány v letech 1982–1990 v Holandsku, Velké Británii a Dánsku. Podrobně byly charakterizovány v předchozích sděleních [6,7].

Fyziologické a morfologické vlastnosti všech kmenů odpovídaly rodu *Acinetobacter* [11]. Všechny kmeny rostly při 44 °C a byly identifikovány jako *A. baumannii* podle *EcoRI* ribotypů [12].

Ribotypizace

Metoda byla popsána v předchozím sdělení [2]. Buněčná DNA byla štěpena restričními endonukleázami *EcoRI*, *HindIII* nebo *HincII*. Elektroforeticky rozdělená DNA byla přenesena na nylonovou membránu a hybridizována s rDNA značenou digoxigeninem, která byla připravena reverzní transkripcí z 16S–23S rRNA (Roche). Fragmenty DNA s navázanou sondou byly zjištěny soupravou DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche). Ribotyp byl tvořen hybridizačními proužky, odpovídajícími svou polohou na membráně různě velkým restričním fragmentům DNA, nesoucím geny pro rRNA. Pro kvantifikaci podobnosti ribotypů byly použity restriční endonukleázy *HindIII* a *HincII*. Podobnost byla vypočtena jako podíl počtu proužků, v nichž se ribotypy liší, z celkového počtu zjištěných proužků. Shlukovou metodou byla UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Averages). K výpočtům byl použit program Statistica 5.1 (StatSoft).

AFLPTM

AFLP je metoda DNA fingerprintingu, založená na selektivní amplifikaci restričních fragmentů buněčné DNA pomocí PCR [8]. Použit byl postup popsáný v předchozím sdělení [13]. Restriční štěpení a ligace probíhaly současně v reakční směsi, obsahující templátovou DNA, *EcoRI*, *MseI*, T4 DNA-ligázu a adaptéry *EcoRI* a *MseI*. Směs se po inkubaci naředila a přidala do PCR amplifikační reakční směsi obsahující selektivní primery *EcoRI*+A (Cy5-GACTG-CGTACCAATTCa-3'; a = selektivní báze) a *MseI* + C (5'-GATGAGTCTGAGTAaC-3'; c = selektivní báze). Amplikony byly separovány na systému ALFexpress II DNA analysis (Amersham Pharmacia Biotech) a výsledné AFLP profily byly analyzovány programem BioNumerics 2.0 (Applied Maths). Pro shlukovou analýzu byly použity fragmenty o velikostech 50–500 bp. Kritériem podobnosti byl Pearsonův koeficient, shlukovou metodou UPGMA.

Biotypizace

Biotypizace a číselné označení jednotlivých biotypů byly provedeny podle typizačního schématu Bouveta a Grimonta, založeném na rozdílech v utilizaci levulinátu, citrkonátu, fenylacetátu (L-fenylalaninu), 4-hydroxybenzoátu a L-tartarátu [14].

Stanovení citlivosti na antibiotika

Citivost na 11 antibiotik byla vyšetřena diskovou difúzní metodou na agaru Mueller Hinton (Oxoid), standardizova-

nou podle NCCLS [15]. Testovány byly ($\mu\text{g}/\text{disk}$): ampicilin + sulbaktam (10 + 10), ceftazidim (30), imipenem (10), piperacilin (100), amikacin (30), gentamicin (10), netilmicin

Tabulka 1

Rezistence českých kmenů *A. baumannii* k antibiotikům. Uvedeny jsou počty rezistentních kmenů (procentuální vyjádření v závorkách). Rezistence byla definována průměrem inhibiční zóny menším než uvedené hraniční hodnoty

Antibiotikum	Hraniční průměr IZ (mm)	Klon I (n = 41)	Klon II (n = 21)	Ostatní MR kmeny (n = 8)	Citlivé kmeny (n = 15)
Ampicilin + sulbaktam	15	25 (61 %)	12 (57 %)	1	0
Ceftazidim	18	17 (41 %)	14 (67 %)	1	0
Imipenem	16	0 (0 %)	2 (10 %)	2	0
Piperacilin	18	38 (93 %)	19 (90 %)	6	0
Amikacin	17	31 (76 %)	7 (33 %)	1	0
Gentamicin	15	39 (95 %)	16 (76 %)	8	0
Netilmicin	15	8 (20 %)	2 (10 %)	3	0
Tobramycin	15	16 (39 %)	1 (5 %)	6	0
Ofloxacin	16	39 (95 %)	15 (71 %)	6	0
Ko-trimoxazol	16	39 (95 %)	12 (57 %)	5	2
Tetracyklin	15	40 (98 %)	21 (100 %)	7	1

Tabulka 2
Vlastnosti klonů I a II

Klon	Soubor ¹	Doba izolace	Počet kmenů	Ribotyp HindIII-HincII ⁴	Biotyp ²	Průměrný počet rezistencí na 1 kmen ³	Počet kmenů s plazmidem pANI (8,7 kb)	Reaktivita s monoklonálními protilátkou ⁴
Klon I	ARCH	1991–1999	24	R1-1 (23), R5-3 (1)	6 (9), 11 (14)	7,1	24	S48-3-13 (18) S51-3-12 (6)
	REC	2000–2001	17	R1-1 (15), R3-1 (2)	6 (6), 11 (10), 12 (1)	7,1	Netestováno	Netestováno
	Referenční kmeny	1984–1990	4	R1-1 (3), R3-1 (1)	6 (3), 11 (1)	6,5	4	S48-3-13 (4)
Klon II	ARCH	1991–1997	10	R2-2 (7), R6-4 (3)	2 (10)	5,7	1	S53-32 (7) Netypovatelné (3)
	REC	2000–2001	11	R2-2 (4), R6-4 (1) R4-2 (3), R2-5 (2) R2-4 (1)	2 (11)	5,7	Netestováno	Netestováno
	Referenční kmeny	1982–1989	4	R2-2 (3), R4-2 (1)	1 (1), 2 (2), 9 (1)	3,8	1	S48-3-17 (3) Netypovatelné (1)

Údaje pocházejí z této studie a z práce Pantophleta et al. [7]. V závorkách uvedeny počty kmenů náležející k příslušnému typu.

¹Soubory ARCH a REC zahrnovaly kmeny z České republiky, referenční kmeny pocházely ze severozápadní Evropy (viz Materiál a metody).

²Biotyp podle Bouveta a Grimonta [14]. Jeden kmen klonu I (soubor ARCH) byl auxotrofní.

³Testováno 11 antibiotik (viz tabulka 1).

⁴Testováno 20 monoklonálních protilátek vyvinutých proti O-antigenu acinetobakterů [7].

cin (30), tobramycin (10), tetracyklin (30), ofloxacin (5) a ko-trimoxazol (sulphametoxazol+trimethoprim: 23,75 + 1,25) (Oxoid). Půdy byly inkubovány 18–20 h při 37 °C. Hraniční hodnoty pro rezistenci byly upraveny podle známé distribuce průměrů inhibičních zón u českých kmenů [10]; byly shodné s hodnotami NCCLS pro intermediární rezistenci s výjimkou tetracyklinu a piperacilinu, u nichž byly použity hodnoty NCCLS pro rezistenci (*tabulka 1*). Multi-rezistence byla definována jako rezistence k nejméně dvěma antibiotikům.

Výsledky

Ribotypizace

Ribotypizací s *Hind*III bylo zjištěno celkem 33 různých poloh hybridizačních proužků odpovídajících fragmentům DNA o rozdílné molekulové hmotnosti; na jeden ribotyp připadalo 9–11 proužků. Ribotypizací s *Hinc*II bylo zjištěno celkem 25 různých poloh proužků; na jeden ribotyp připadalo 8–11 proužků. Příklady ribotypů *Hind*III a *Hinc*II jsou uvedeny na *obr. 1*. Celkem bylo prokázáno 24 různých ribotypů *Hind*III, 20 ribotypů *Hinc*II a 29 kombinací ribotypů *Hind*III a *Hinc*II. Nejpočetnější byl kombinovaný ribotyp *R1-1* zjištěný u 38 českých MR kmenů a tří referenčních kmenů pro klon I (RUH 3282, RUH 436 a RUH 875). Druhým nejčastějším ribotypem byl *R2-2* prokázán u 11 českých MR kmenů a tří referenčních kmenů pro klon II (RUH 134, RUH 3422 a RUH 3245). Kmen RUH 3242 (klon I) měl ribotyp *R3-1*, RUH 3240 (klon II) ribotyp *R4-2*. Oba tyto ribotypy byly zjištěny také u českých kmenů.

Výsledek numerické analýzy ribotypů *Hind*III a *Hinc*II je na *obr. 2*. Ribotypy *R1-1* a *R2-2*, představující převažující ribotypy u klonů I a II, byly zřetelně odděleny. Kvantitativní rozdíly neidentických ribotypů zjištěných u kmenů klasifikovaných podle AFLP do stejného klonu (*obr. 3*) byly malé; tyto ribotypy se většinou shlucovaly na nízké hladině rozdílnosti (např. ribotypy *R1-1*, *R3-1* a *R5-2* na hladině 0,08). Odlišení ribotypů zjištěných u klonů I nebo II a některých nepřibuzných kmenů nebylo ostré; např. ribotyp *R7-1* zjištěný u citlivého kmene NIPH 410 s distinktním profilem AFLP se lišil od *R1-1* v poloze jediného proužku.

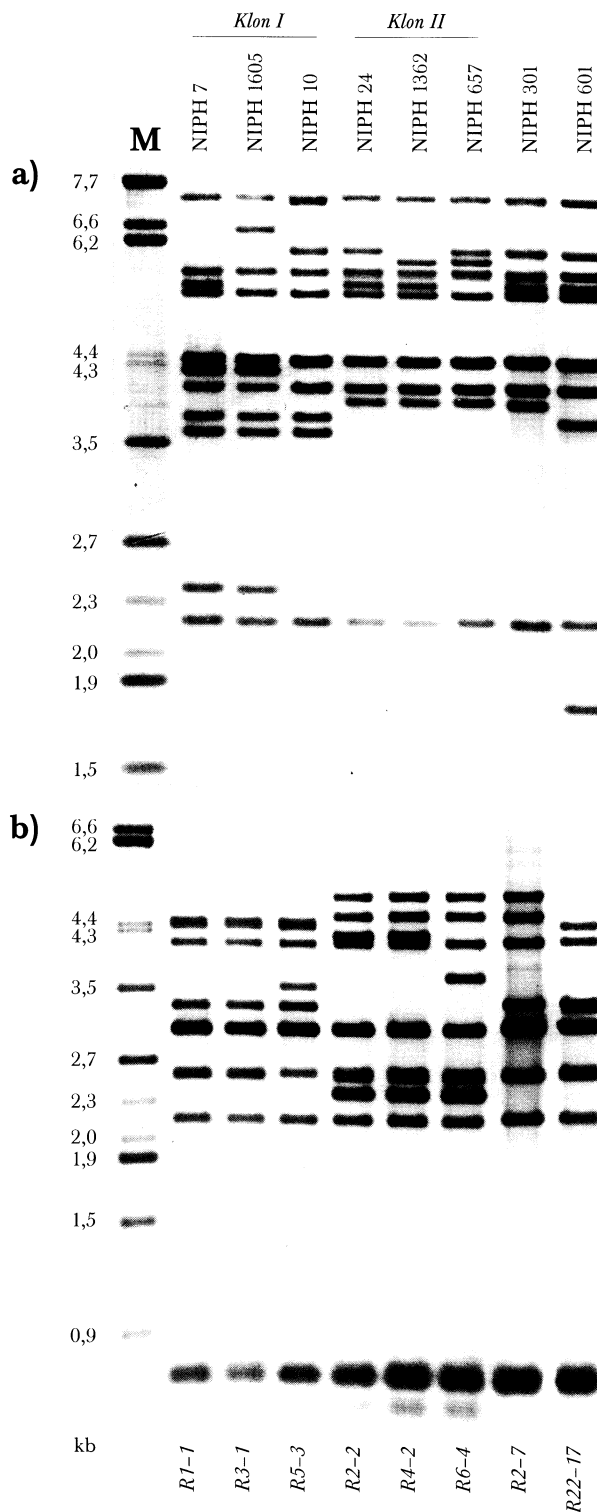
AFLP

Metodou AFLP bylo vyšetřeno 49 českých kmenů reprezentujících jednotlivé ribotypy (ribotypy *R2-4* a *R24-20* nebyly zastoupeny). Časté ribotypy byly zastoupeny více kmeny, které byly většinou heterogenní v dalších vlastnostech (biotyp, plazmidový profil, antibiogram). Dendrogram podobnosti profilů AFLP je na *obr. 3*. Na hladině 80 % byly rozlišeny dva velké shluky, z nichž každý zahrnoval kmeny se shodnými nebo velmi podobnými ribotypy. Podle umístění a vzájemné vazby referenčních kmenů (RUH) tyto shluky odpovídaly klonům I a II [6]. Shluk I zahrnoval 15 českých a tři referenční kmeny s ribotypem *R1-1* (tyto kmeny odpovídaly české skupině A), dva české a jeden referenční kmen s ribotypem *R3-1* a jeden český kmen (NIPH 10) s jedinečným ribotypem *R5-3*, který dříve nebyl zařazen ani do skupiny A ani B [2]. Shluk II zahrnoval pět českých a tři referenční kmeny s ribotypem *R2-2* (tyto kmeny odpovídaly české skupině B), tři české a jeden referenční kmen s ribotypem *R4-2*, čtyři české kmeny s ribotypem *R6-4*, dva čes-

ké kmeny s ribotypem *R2-5* a jeden český kmen s unikátním ribotypem *R2-4*. NIPH 657 s ribotypem *R6-4* byl dříve klasifikován jako MR kmen nezařazený do skupiny A ani B

Obr. 1

Příklady ribotypů kmenů *A. baumannii* po štěpení restrikčními endonukleázami *Hind*III (a) a *Hinc*II (b). Nahore jsou uvedena čísla kmenů (NIPH), dole označení ribotypů. M, molekulový standard.



[2]. AFLP profily všech citlivých kmenů a ostatních MR kmenů byly vysoce heterogenní a výrazně se lišily od profilů klonů I a II (s výjimkou dvou MR kmenů se oddělovaly na hladině >65 %).

Klasifikace českých kmenů do klonů I a II

Kombinací výsledků ribotypizace a AFLP bylo 41 kmenů zařazeno do klonu I a 21 kmenů do klonu II (sem byl zahrnut i kmen s ribotypem *R2-4* nestudovaný AFLP, jehož jednotlivé *EcoRI*, *HindIII* a *HincII* ribotypy odpovídaly klonu II). Do klonu I patřily kmeny s ribotypy *R1-1*, *R3-1* a *R5-3*, do klonu II kmeny s ribotypy *R2-2*, *R4-2*, *R2-5*, *R6-4* a *R2-4* (tabulka 2). Nezařazenými do klonů I a II zůstalo osm multirezistentních a všech 15 citlivých kmenů.

Biotypizace

Kmeny klonu I patřily k biotypům 11 ($n = 24$), 6 ($n = 15$) a 12 ($n = 1$) a všechny kmeny klonu II měly biotyp 2. Zbývající kmeny náležely k 11 různým biotypům.

Rezistence k antibiotikům

Tabulka 1 shrnuje výsledky vyšetření citlivosti. U kmenů klonu I se rezistence k jednotlivým antibiotikům vyskytovala častěji než u kmenů klonu II: na jeden kmen klonu I připadalo v průměru 7,1 rezistence, zatímco na jeden kmen klonu II 5,7 rezistence. Ani jeden český kmen nebyl rezistentní ke všem antibiotikům, avšak citlivost MR kmenů byla většinou nižší než u normální citlivé populace [10].

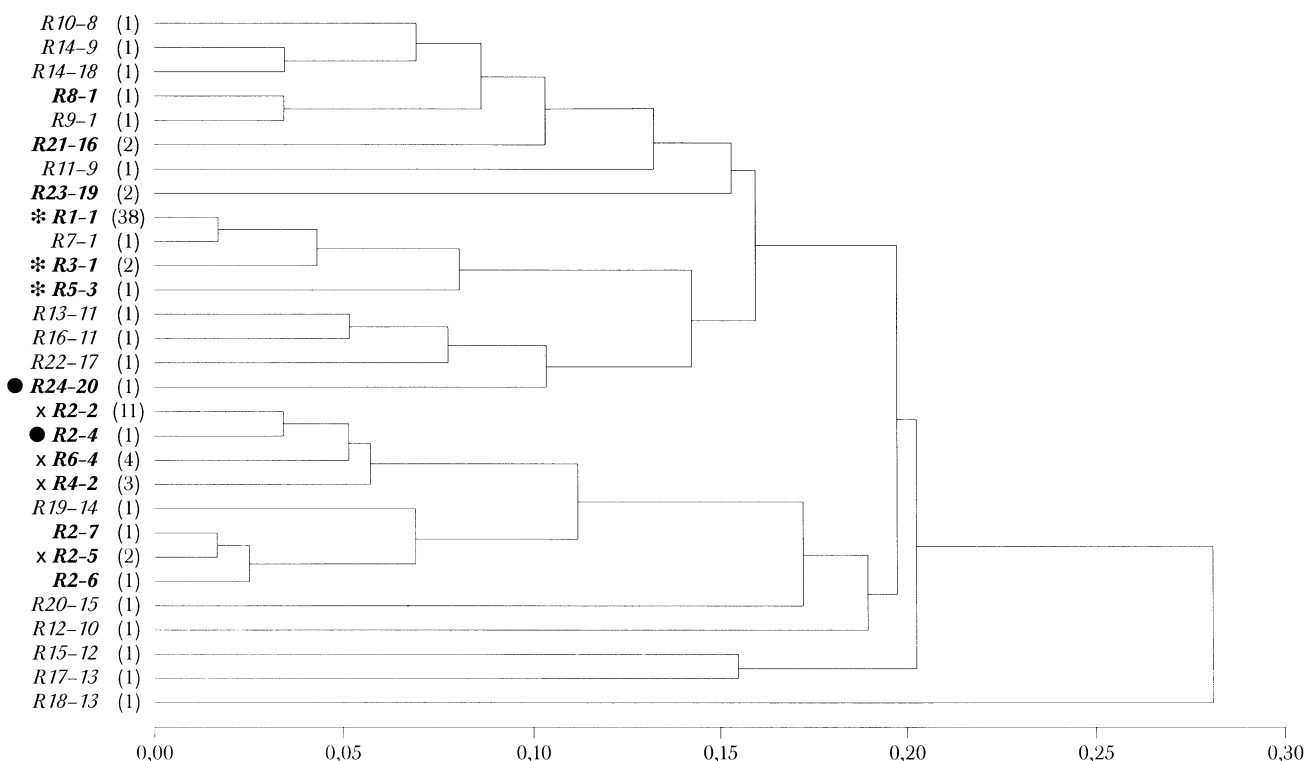
Diskuze

U řady bakterií existují epidemické klony, evolučně diskrétní a genotypově relativně homogenní skupiny kmenů, které se zřetelně odlišují od ostatních kmenů daného druhu. Epidemické klony se mohou vyskytovat v různém čase a místě. Byly zjištěny u původců komunitních i nemocničních infekcí, např. *Staphylococcus aureus* s rezistencí k meticilinu [4], *Pseudomonas aeruginosa* [16] nebo *Burkholderia cepacia* [5]. Studie zaměřené na epidemiologickou typizaci již dříve prokázaly vysokou kmenovou diverzitu acinetobakterů. Většina z nich však zahrnovala malé soubory lokálně souvisejících izolátů a jejich výsledky nebylo možno vzhledem k nejednotné metodice porovnat. Pouze ojedinělé práce naznačily existenci klonálně příbuzných kmenů *A. baumannii*, pocházejících ze vzdálených lokalit [17,18].

V roce 1996 publikovali Dijkshoorn L, et al. studii, v níž porovnali fenotypové a genotypové vlastnosti 31 hromadně a sporadicky se vyskytujících nemocničních kmenů *A. baumannii*, pocházejících z různých lokalit severozápadní Evropy [6]. Podle výsledků polyfázové analýzy (AFLP, ribotypizace, analýza proteinů vnější membrány, biotypizace, vyšetření citlivosti k antibiotikům) autoři rozdělili většinu hromadně se vyskytujících (epidemických) kmenů do dvou

Obr. 2

Dendrogram podobnosti kombinovaných ribotypů *HindIII-HincII* zjištěných u 85 českých kmenů *A. baumannii*. Číslo před pomlčkou označuje ribotyp *HindIII*, číslo za pomlčkou ribotyp *HincII*. V závorkách jsou uvedeny počty kmenů s příslušným ribotypem. Ribotypy multirezistentních kmenů jsou vyznačeny tučně. Symbol * značí ribotypy tvořící AFLP shluk I, symbol x ribotypy tvořící AFLP shluk II (viz obr. 3). Kmeny s ribotypy označenými tečkou nebyly studovány pomocí AFLP.



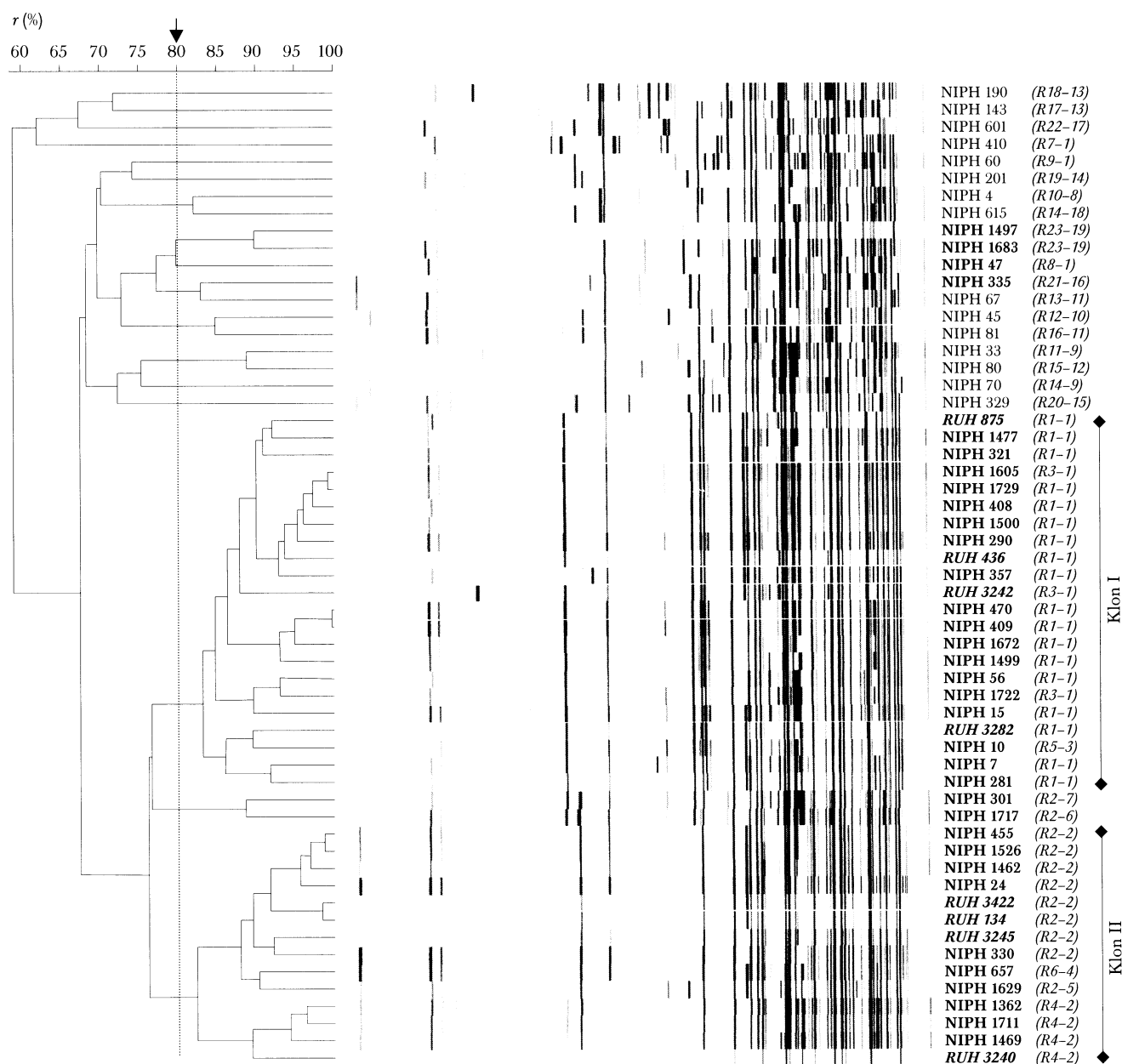
distinktních skupin zřetelně odlišených od heterogenní populace sporadických izolátů a tyto skupiny označili jako epidemické klony I a II. Kmeny náležející do klonů I a II byly izolovány v letech 1982–1990 ve Velké Británii, Holandsku, Dánsku a Belgii. Tyto kmeny byly rezistentnější k antibiotikům než sporadické izoláty.

V práci z roku 1999 jsme studovali vlastnosti kmenů komplexu *Acinetobacter calcoaceticus* – *A. baumannii* izolovaných z nemocničních pacientů v České republice v letech

1991–1997 [2]. Většina MR kmenů *A. baumannii* byla klasifikována do dvou skupin (A a B), z nichž každá měla distinktní *EcoRI* ribotyp a zahrnovala izoláty se shodným nebo podobným biotypem a plazmidovým profilem. U kmenů vybraných z této studie a referenčních kmenů pro klon I a II byla posléze studována reaktivita s monoklonálními protilátkami proti O antigenu [7]. Výsledky obou studií [2,7] prokázaly shodu nebo podobnost vlastností skupiny A s klonem I a skupiny B s klonem II. Přesný vztah těchto skupin

Obr. 3

Dendrogram podobnosti profilů AFLP u 49 českých kmenů (NIPH) reprezentující jednotlivé ribotypy *HindIII-HincII* a 8 referenčních kmenů (RUH) pro klony I a II. Vyznačeny jsou shluky odpovídající klonům I a II. V závorkách za čísla kmenů jsou uvedeny kombinované ribotypy *HindIII-HincII* (obr. 2). Kmeny NIPH 4 – NIPH 657 náležejí k souboru ARCH, kmeny NIPH 1362 – NIPH 1729 k souboru REC. Multirezistentní kmeny jsou vyznačeny tučně. Kritériem podobnosti je Pearsonův koeficient, shlukovou metodou UPGMA.



však zůstával nejasný, neboť klony I a II byly definovány primárně pomocí metody AFLP, zatímco české skupiny A a B pomocí ribotypizace.

Kvantitativní genotypová analýza v této studii prokázala, že české kmeny skupiny A patří do klonu I a kmeny skupiny B do klonu II. Klony definované pomocí AFLP zahrnovaly i kmeny ribotypů jiných než těch, které byly použity pro definici skupin A a B. Rozdíl mezi ribotypy u kmenů zařazených do téhož klonu byly však malé a tyto kmeny měly shodné, nebo velmi podobné ostatní vlastnosti. Např. kmen NIPH 10 s jedinečným ribotypem byl metodou AFLP zařazen do klonu I, čemuž odpovídaly biochemické vlastnosti (biotyp 6), reaktivita s protilátkou S51-3 a přítomnost plazmidu pAN1 u tohoto kmene. Metoda AFLP je založena na analýze úseků DNA reprezentujících celý genom a předchozí studie potvrdily její účinnost pro porovnání celkové genetické příbuznosti acinetobakterů na druhové [19] i poddruhové úrovni [20]. Ribotypizace je oproti tomu založena na strukturální analýze malé části genomu (geny pro ribozomální RNA a jejich přilehlých oblastí). Příklad kmene NIPH 410 (viz obr. 1 a obr. 2) ukazuje, že vysoká podobnost ribotypů nemusí být v souladu s celkovou podobností organismů. Pro zařazení kmenů s neznámými ribotypy do klonů I a II je proto použití AFLP nezbytné.

Klon je množinou organismů odvozených asexuální reprodukcí z jediné buňky. U bakteriálního druhu je kategorií relativní, neboť mezi jedinci, z nichž se jednotlivé klony odvozují, lze předpokládat klonální vztah v hlubší časové vrstvě. Z geografického a časového rozšíření klonů I a II a jejich vnitřní diverzity (tabulka 2) lze usuzovat na to, že jde o skupiny relativně staré. Typové varianty zjištěné u obou klonů jsou pravděpodobným důsledkem jejich vnitřní diverzifikace. Příkladem jsou české kmeny klonu I náležející k biotypu 11. Kmeny *A. baumannii* s tímto biotypem jsou v západní Evropě vzácné [14,21], zatímco v České republice jsou nejčastější [2]. Většina českých kmenů s biotypem 11 měla velmi podobné restriční profily chromozomální DNA štěpené *Apal*. Tyto kmeny sdílely vlastnosti, které nebyly zjištěny u ostatních kmenů klonu I, např. neschopnost růstu na L-arabinóze a přítomnost plazmidu o molekulové hmotnosti 6 kb (nepublikováno). Kmeny klonu I a biotypu 11 tudíž mohou představovat český subklon širšího panevropského klonálního uskupení.

Prevalence klonů I a II je mezi MR nemocničními kmeny v České republice vysoká. Z celkem 70 MR kmenů 41 náleželo ke klonu I a 21 ke klonu II, tj. 89 % kmenů náleželo k jednomu z klonů. Jejich poměrný výskyt je ve skutečnosti zřejmě vyšší, neboť při výběru kmenů pro tuto studii bylo zachování typové diverzity nadřazeno doporučenému zastoupení jednotlivých typů. Citlivé kmeny jsou naopak fenotypově a genotypově vysoce heterogenní. Skutečnost, že multirezistence je vázána na genotypově omezené spektrum kmenů, může být důsledkem klonální expanze původně multirezistentních kmenů, nebo nezávislého vývoje rezistence u klonálně příbuzných citlivých kmenů. Fakt, že všechny dosud izolované kmeny klonu I a II byly multirezistentní, svědčí pro první alternativu. Oproti tomu diverzita mechanismů rezistence uvnitř klonů naznačuje nezávislý a dynamický vývoj rezistence u klonálně příbuzných kmenů.

Lze předpokládat, že klony I a II nesou faktory ovlivňující jejich schopnost šířit se, kolonizovat pacienty a efektivně vyvíjet rezistenci k antibiotikům. Studium těchto faktorů může objasnit příčiny, proč se *A. baumannii* během posledních desetiletí stal jedním z nejvýznamnějších nemocničních patogenů.

Závěr

České multirezistentní kmeny *A. baumannii* patří převážně do dvou klonálních uskupení, prokázaných u nemocničních epidemických kmenů ze severozápadní Evropy. Skupiny A a B dříve popsané v České republice jsou podmnožinami těchto uskupení (tzv. klonu I resp. klonu II). Oba klony zahrnují hromadně se vyskytující i sporadické kmeny a jsou v České republice rozšířeny nejméně od roku 1991. Panevropský výskyt a vnitřní typová diverzita naznačují, že jde o relativně stará uskupení s řadou geografických subklonů, z nichž jeden je pravděpodobně reprezentován vysoce rezistentními českými kmeny klonu I, náležejícími k biotypu 11. Definování těchto klonálních uskupení je východiskem pro studium biologických faktorů zodpovědných za šíření, virulenci a vznik rezistence u klinicky a epidemiologicky nejvýznamnějších kmenů *A. baumannii*.

Uložení kmenů do CCM a CNCTC

Do České sbírky mikroorganismů (CCM) a České národní sbírky typových kultur (CNCTC) byly uloženy následující kmeny *A. baumannii* izolované v České republice: CCM 7031 = CNCTC 5558 (= NIPH 7; klon I, referenční kmen pro skupinu A), CCM 7033 = CNCTC 5564 (= NIPH 24; klon I, referenční kmen pro skupinu B), CCM 7032 = CNCTC 5563 (= NIPH 15; klon I/skupina A), CCM 7034 (= NIPH 281; klon I/skupina A), CCM 7035 (= NIPH 632; klon I/skupina A), CNCTC 5559 (= NIPH 10; klon I). Údaje o původu a vlastnostech kmenů jsou dostupné na <http://jcm.asm.org/cgi/reprint/39/7/2576.pdf>.

Poděkování

Studie byla součástí projektu č. 310/01/1540 Grantové agentury České republiky. Za laskavé poskytnutí kmenů autoři děkují všem kolegům z diagnostických pracovišť. Dík patří dále Dr. P. Urbáškové za organizaci sběru kmenů, paní M. Maixnerové za vynikající technickou spolupráci a prof. J. Schindlerovi za odbornou revizi rukopisu.

Literatura

- Bergogne-Bérézin E, Towner K. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:148–165.
- Nemec A, Janda J, Melter O, Dijkshoorn L. Genotypic and phenotypic similarity of multiresistant *Acinetobacter baumannii* isolates in the Czech republic. *J Med Microbiol* 1999;48:287–296.
- 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.
- Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2002;2:180–189.
- Pitt TL, Kaufmann ME, Patel PS et al. Type characterisation and antibiotic susceptibility of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom and the Republic of Ireland. *J Med Microbiol* 1996;44:203–210.
- 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.
- Pantophlet R, Nemec A, Brade L, Brade H, Dijkshoorn L. O-antigen diversity

- among *Acinetobacter baumannii* strains from the Czech Republic and Northwestern Europe, as determined by lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 2001;39:2576–2580.
8. Vos P, Hogers R, Bleeker M et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995;23:4407–4414.
 9. Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3140–3145.
 10. Nemeč A. Využití diskového difúzního testu v epidemiologické typizaci multirezistentních kmenů *Acinetobacter baumannii*. *Klin Mikrobiol Inf Léč* 1999;5:287–297.
 11. Juni, E. Genus III. *Acinetobacter* Brisou and Prévot 1954, 727^{AL}. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 303–307. Edited by N.R. Krieg & J.G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984.
 12. Gerner-Smidt P. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol* 1992;30:2680–2685.
 13. Nemeč A, De Baere T, Tjernberg I, Vaneechoutte M, van der Reijden TJK, Dijkshoorn L. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1891–1899.
 14. Bouvet PJM, Grimont PAD. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann Inst Pasteur/Microbiol* 1987;138:569–578.
 15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; 11th informational supplement M100–S11. Wayne, PA: NCCLS, 2001.
 16. Pitt TL, Livermore DM, Pitcher D et al. Multiresistant serotype O 12 *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a common strain in Europe. *Epidemiol Infect* 1989;103:565–576.
 17. Dijkshoorn L, Aucken HM, Gerner-Smidt P et al. Correlation of typing methods for *Acinetobacter* isolates from hospital outbreaks. *J Clin Microbiol* 1993;31:702–705.
 18. 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.
 19. Janssen P, Maquelin K, Coopman R et al. Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:1179–1187.
 20. Janssen P, Dijkshoorn L. High resolution DNA fingerprinting of *Acinetobacter* outbreak strains. *FEMS Microbiol Lett* 1996;142:191–194.
 21. Seifert H, Baginski R, Schulze A, Pulverer G. The distribution of *Acinetobacter* species in clinical culture materials. *Zbl Bakt* 1993;279:544–552.

ZACHYČENO NA INTERNETU

Okulo-respirační syndrom a protichřipková vakcinace

V Kanadě byla zaznamenána v průběhu zimy 2000–2001 dosud nepopsaná komplikace očkování proti chřipce, nazvaná okulo-respirační syndrom. Výskyt byl spojen s vakcinou od jednoho výrobce. Okulo-respirační syndrom je definován jako bilaterální konjunktivitida, otok v obličejí a/nebo respirační příznaky, počínající 2–24 h po aplikaci vakcíny a trvající zhruba 48 hodin, někdy i déle. Ze 609 kontaktovaných osob se u 13 % objevily příznaky do 2 hodin, 27 % mělo potíže déle než 48 hodin a 42 % udalo, že pociťovalo příznaky jako silné. Na základě této informace by měl být tento syndrom zařazen do monitorování bezpečnosti očkování proti chřipce.

Pramen: Skowronski DM et al: Oculo-Respiratory Syndrome: a New Influenza Vaccine-Associated Adverse Event? *Clin Infect Dis* 2003;36:705. Abstrakt on-line (<http://www.journals.uchicago.edu/CID/home.html>)

Zlepšená metoda detekce *Salmonella* sp. v potravinách

Tato práce ze SRN popisuje detekci a identifikaci *Salmonella* sp. v potravinách s využitím techniky FISH (Fluorescent in situ hybridization) se dvěma druhově specifickými 23S-rRNA cílenými oligonukleotidovými sondami (byly vybrány Sal-1 a Sal-3 a nově navržena Sal-544). Relativní specifita těchto sond byly porovnána

s bakteriálními 23S-rRNA sekvencemi z databáze Gen Banky a testována in-situ hybridizací s nátěry z čistých kultur kmenů 51 serovarů salmonel subspecies enterica. Nebyly zaznamenány zkřížené reakce s 46 jinými enterobakteriemi ani se 14 jinými subspecies salmonel. Metoda nebyla nepříznivě ovlivněna ani skladováním testovacího kmene *S.panama* ani koncentrací NaCl od 2 do 15 % či pH mezi 3.3 a 7.4. Metoda detekovala přítomnost salmonel ve 225 přirozeně kontaminovaných vzorcích potravin, zatím co běžná kultivace detekovala salmonely jen ve 30 z 225 vorků. FISH selhala ve 2 resp. 3 případech (podle použité sondy), kdy byla kultivace pozitivní.

Pramen: FS-NET 3.5.03 (mailto: fsnet-L@listserv.uoguelph.ca, fsnet-L@listserv.uoguelph.ca) s odvoláním na *J Food Protect* 2003;66:723–31, <http://www.foodprotection.org/QuickLinks.htm>

Z kongresového kalendáře PROMED

Tentokrát upozorňujeme na konferenci <http://gtcbio.com/index.asp>. „Vaccines: from political, social-economical, scientific, provider, user and legal view points“, která se bude konat 22. – 24. 10. 2003 v Hilton Crystal City, VA, USA. Bližší informace <http://gtcbio.com/speakerlist.asp?cid=4>

Předpokládá se účast špičkových řečníků ze všech sledovaných oblastí.