

Metode fenotipice și genotipice în diagnosticul infecțiilor produse de *Acinetobacter*

Phenotypic and genotypic methods in diagnosis of *Acinetobacter* infections

Gabriel Ionescu^{1*}, Sofia Constantiniu²

1. Institutul Național de Cercetare Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie "Cantacuzino"

2. Institutul de Sănătate Publică Iași

Rezumat

În ultimele decenii, controlul infecțiilor nosocomiale a întâmpinat dificultăți serioase prin "afirmarea" cu succes în etiologia acestor infecții a unui nou microorganism oportunist - *Acinetobacter*.

Implicarea într-o gamă variată de infecții la pacienți imunodeprimați, cu precădere la pacienți din secții de terapie intensivă și, în special, la cei ventilați mecanic, precum și lipsa în multe cazuri a unor mijloace eficiente de tratament au stârnit interesul cercetătorilor pentru studiul acestui microorganism.

Caracterul său ubiquitar, capacitatea de achiziție rapidă a unor multipli determinanți genetici de rezistență la antibiotice, dificultățile de încadrare taxonomică corectă numai prin metode fenotipice, precum și necesitatea supravegherii epidemiologice au făcut necesară punerea la punct a unor metode variate de testare, atât fenotipice cât și genotipice.

În acest articol sunt prezentate principalele metode care pot fi utilizate în laboratoarele de microbiologie în diagnosticul curent și pentru stabilirea gradului de clonalitate al tulpinilor izolate.

Cuvinte cheie: *Acinetobacter*, diagnostic, infecție nosocomială, metode genotipice, metode fenotipice.

Abstract

The control of nosocomial infections met serious difficulties during latest decades, caused by the "successful appearance" of a new opportunistic microorganism, *Acinetobacter*, in their etiology.

The involvement of *Acinetobacter* into a variety of infections in immunocompromised patients, mainly in intensive care units and particularly in mechanically ventilated patients, as well as the lack of an effective treatment incite the interest of researchers for the study of this microorganism.

* **Adresa pentru corespondență:** Gabriel Ionescu, Institutul Național de Cercetare Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie "Cantacuzino", Splaiul Independenței 103, 050096, București, România.
Tel. 0722 590270, Fax. 00 40 21 3184431, E-mail: gionescu@cantacuzino.ro

Its ubiquitous character and the capability of rapid acquisition of genetic determinants for antibiotics resistance, the difficulties in establishing the correct taxonomic status only by applying phenotypic methods, and the necessity of an epidemiologic surveillance required the development of various phenotypic and genotypic testing methods.

In this paper are presented the main methods that may be used in microbiology laboratories for current diagnosis and for determination of the clonality of the nosocomial isolates.

Keywords: *Acinetobacter, diagnosis, nosocomial infection, genotypic methods, phenotypic methods.*

Introducere

Creșterea alarmantă a numărului de infecții determinate de microorganisme oportuniste, mai ales sub forma unor evenimente epidemiologice cu aspect de focar, așa cum sunt infecțiile nosocomiale, a determinat orientarea cercetărilor de microbiologie și biologie moleculară și spre astfel de grupuri taxonomice. Printre acestea s-a remarcat cu succes, în ultimele decenii, *Acinetobacter spp.*

Bacterii aparținând diferitelor specii de *Acinetobacter* au fost izolate de numeroși autori care le-au încadrat în diferite genuri, cu denumiri precum: *Bacterium anitratum*, *Neisseria*, *Alcaligenes*, *Mima polymorpha*, *Herellea vaginicola*, *Achromobacter*, *Moraxella*, *Micrococcus calcoaceticus*, *B5W*, *Cytophaga*, *Bacterium*. În prezent genul *Acinetobacter* constituie o ramură filogenetică aparte în familia *Moraxellaceae*, Ordinul *Pseudomonadales*, clasa *Gammaproteobacteria*, phylum *Proteobacteria*, domeniul *Bacteria*. În cadrul genului sunt recunoscute 32 de genospecii, dintre care 17 au putut fi diferențiate și pe baza caracterelor biochimice¹¹.

Prin capacitatea de a se răspândi rapid, de a adera la suprafețe și de a achiziționa determinanți de rezistență multiplă la antibiotice, ceea ce generează dificultăți în aplicarea unor tratamente eficiente, conduc la izbucniri cu caracter de focar, în general printre subiecți imunocompromiși, mai ales în unități de terapie intensivă, de neonatologie, de îngrijire a per-

soanelor în vârstă^{5,15}.

Dacă diagnosticul microbiologic curent în aceste unități se bazează în principal pe metode fenotipice, sistemele de supraveghere epidemiologică fac apel atât la metodele fenotipice, cât și la cele genotipice, capabile să evidențieze gradul de înrudire al tulpinilor izolate, dar și prezența diferiților determinanți de patogenitate și rezistență. Încadrarea taxonomică corectă în genul *Acinetobacter* și în diferitele genospecii este posibilă astăzi numai datorită progreselor înregistrate de biologia moleculară care, în ultimele decenii, a deschis noi căi de explorare a „microuniversului” reprezentat de genomul bacterian.

Izolarea din probe clinice și de mediu

Se cunoaște că *Acinetobacter* se dezvoltă bine pe medii uzuale, cum sunt geloza simplă, geloza cu 5% sânge sau geloza tripticaz soia.

Pentru izolarea din diferite prelevate clinice este mult mai utilă însămânțarea pe medii selectiv-diferențiale cum sunt *Herellea agar* (Difco) care conține săruri biliare, zaharuri și brom cresol purpur și *Leeds Acinetobacter Medium*¹⁷ care conține vancomicină, cefsulodin și cefradin. Acesta din urmă este deosebit de util în recuperarea tulpinilor de *Acinetobacter* atât din surse clinice, mai ales din materii fecale, cât și din mediul înconjurător⁵.

Când se presupune că numărul de bacterii este scăzut se poate face o îmbogățire după tehnica lui Baumann et al. (incubare 24-48 ore

în mediu de îmbogățire, cu agitare viguroasă). Mediul conține fosfat de sodiu și potasiu, azotat de potasiu, sulfat de magneziu și acetat de sodiu ca sursă de carbon. Un pH al mediului cuprins între 5,5 și 6 favorizează dezvoltarea tulpinilor de *Acinetobacter*. După 24-48 ore se fac treceri pe medii selective^{7,11}.

Identificarea și tipizarea tulpinilor de *Acinetobacter*

Pentru identificarea și, mai ales, tipizarea în scop epidemiologic a tulpinilor de *Acinetobacter* este necesară utilizarea unor combinații de teste fenotipice și genotipice care să fie caracterizate printr-un grad ridicat de tipabilitate, reproductibilitate, o bună putere de discriminare, și care totodată să fie ușor de executat și de interpretat³.

Metodele fenotipice de analiză cum sunt profilul biochimic, tipul fagic, profilul de antigene de suprafață, susceptibilitatea la antibiotice etc., reprezintă expresia unor structuri genetice și, prin urmare, sunt supuse variabilității datorită influenței condițiilor de cultivare, fazei de creștere bacteriană, mutațiilor spontane etc.¹².

Metodele genetice analizează structura genetică a microorganismului și includ polimorfismul pattern-urilor de restricție enzimatică a ADN total, precum și prezența sau absența unor structuri specifice în secvența ADN cromozomal sau extracromozomal. Aceste metode sunt mai puțin supuse variabilității naturale, ele putând fi însă afectate de inserții, deleții, mutații punctiforme. Frecvența de apariție a acestora este redusă, iar în multe cazuri pot reprezenta markeri de diagnostic și/sau epidemiologici.

Identificarea preliminară

Genul *Acinetobacter* cuprinde bacili sau cocobacili Gram negativ (uneori rezistă la decolorare cu alcool acetonă și apar Gram labili), adesea grupați în diplo. Au un diametru de 0,9 - 1,6 μm și o lungime de 1,5 - 2,5 μm în mod obișnuit. Capătă

forme cocoide (diametru de 1 μm) în faza staționară de creștere și pe medii sărace, dar se pot întâlni pe același frotiu și forme filamentoase cu o lungime de câteva zeci de μm .

Identificarea preliminară se realizează cu ajutorul unei combinații de teste fenotipice: reacția oxidazei, catalazei, examinarea aspectului morfologic pe frotiul colorat Gram, creșterea pe Mac Conkey, mobilitatea.

Tulpinile de *Acinetobacter* sunt catalază pozitive, imobile, majoritatea cresc pe Mac Conkey, dar se pot diferenția ușor de cele de enterobacterii, deoarece nu fermentează glucoza și sunt strict aerobe.

Testul oxidazei diferențiază tulpinile de *Acinetobacter*, negative, de cele aparținând genurilor *Moraxella* și *Psychrobacter*.

Confirmarea încadrării în genul *Acinetobacter* se bazează pe **testul de transformare calitativă genetică**¹⁹.

Această metodă, considerată **de certitudine**, deși simplă ca execuție, nu este la îndemâna oricărui laborator, fiind necesară obținerea tulpinii competente auxotrofe BD413 *trpE27* de la o colecție de culturi microbiene recunoscută și apoi manipularea și păstrarea acesteia în condițiile specificate.

Principiul testului este următorul: tulpina competentă auxotrofă pentru triptofan - *A. calcoaceticus* BD413 *trpE27* = ATCC 33308 = CIP 104004 = DSM 587 - nu crește pe un mediu indicator care conține aspartat de sodiu ca unică sursă de carbon. Această tulpină este pusă în contact cu ADN-ul tulpinii de studiat. Apariția de colonii pe mediul indicator indică existența unei transformări și confirmă apartenența tulpinii testate la genul *Acinetobacter*.

Portajul tegumentar la subiecții din mediul spitalicesc, cu o diferențiere a speciilor în funcție de statusul clinic - sănătos sau bolnav și de situsul anatomic în cazul primei categorii²⁴, precum și izolarea din mediul exterior a unor specii care nu au fost raportate până în prezent în infecții la om, ci au fost întâlnite doar cel mult cu statutul de colonizant, ne fac să afir-

măm că numai simpla încadrare a unui micro-organism în genul *Acinetobacter* nu are automat semnificație clinică și epidemiologică, fiind necesară încadrarea corectă într-o specie sau genospecie.

Diferențierea speciilor prin evidențierea caracterelor de cultură și metabolice

i. Cultivarea pe medii solide și lichide

Pe geloză simplă, *Acinetobacter* formează colonii rotunde, convexe, cu margini regulate, translucide sau opace de 1-4 mm diametru. Majoritatea tulpinilor se dezvoltă bine pe Mac Conkey.

Cultivat la 30-35°C în mediu lichid, fără agitare, *Acinetobacter* tulbură omogen mediul, formând uneori la suprafață vâl sau inel și, în partea inferioară a tubului, un depozit. În mediu lichid cu agitare crește foarte rapid.

ii. Testul de creștere la diferite temperaturi (37°C, 41°C și 44°C)

Creșterea la diferite temperaturi reprezintă un criteriu de diferențiere a speciilor *A. johnsonii* și *A. baumannii* de celelalte specii.

Se însămânțează 3 eprubete care conțin câte 10 ml bulion TCS (triptocasein soia) cu câte 2 picături de cultură în bulion de 24 ore a tulpinii de testat. Se incubează cele 3 eprubete timp de 24-48 ore la termostat sau pe baie de apă la 37°C, 41°C, respectiv 44°C. Se observă creșterea prin tulburarea mediului.

Acinetobacter johnsonii și *Acinetobacter tjernbergiae* nu cresc la 37°C, iar *A. baumannii* și genospecia 13 sunt capabile să crească la 44°C^{6,11}.

Pentru restul speciilor, rezultatul trebuie corelat cu celelalte teste.

iii. Identificarea biochimică a diverselor specii și genospecii este dificilă și rezultatele diferă după tehnica utilizată și autori.

Acinetobacter este strict aerob. **Testul OF în mediu King cu glucoză** indică un mecanism oxidativ sau inert.

Capacitatea de a produce acid din glucoză a fost utilizată inițial pentru diferențierea *A. calcoaceticus sensu lato* de *A. lwoffii sensu lato*.

Tulpinile care acidifică mediile glucozate posedă o aldolază (dehidrogenază) membranară (apoenzimă) care necesită pentru activare un cofactor - piroloquinolin quinonă (PQQ).

Acidifierea este pusă în evidență prin însămânțarea în mediu Hugh Leifson sau în „Purple agar base medium”, citirea fiind efectuată după incubare la 30°C timp de 24 ore până la 5 zile. Acest test asociat altora poate diferenția între specii.

S-a observat că tulpinile glucozo-oxidative de *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter* genospecia 3, *Acinetobacter lwoffii* și *Acinetobacter* genospecia 13 sensu Tjernberg și Ursing produc un efect unic de colorare cafenie (**browning effect**²⁶) a mediului suplimentat cu 5% sânge de cal, oaie sau om și cu un zahar aldolic (0.22 M D-glucoză, D-galactoză, D-manoză, D-xyloză sau lactoză).

Efectul nu a fost observat în prezența unui zahar cetozic (D-fructoză sau zaharoză) sau în condiții de hiperosmolaritate (manitol, glicerol sau NaCl) și nici la alte tulpini de *Acinetobacter* non oxidative sau la alți bacili Gram negativ nefermentativi (ex. *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Flavobacterium* spp. și *Moraxella* spp).

Din aceste observații se poate afirma că, pentru identificarea tulpinilor de *Acinetobacter* glucozo-oxidative, se poate valorifica acest efect ca un test alternativ.

Sunt absente decarboxilazele pentru lizină și ornitină, dehidrolaza pentru arginină, tiosulfat reductaza (H₂S), triptofan dezaminaza (indol), fenilalanin dezaminaza, ONPG, DNAza, oxidaza, nitrat reductaza. Unele tulpini posedă urează.

Hidroliza gelatinei este variabilă și este utilizată drept criteriu de diferențiere a speciilor. Testul este important, fiind pozitiv doar pentru *A. haemolyticus* și *A. sp. 6*.

Unele specii produc o **hemoliză** de tip β pe geloză sânge. *A. haemolyticus* și *A. sp. 6* produc fosfolipază C care hidrolizează lecitina,

fosfatidiletanolamina și sfinngomielina și care duce la hemoliza hematiilor umane, de cal și berbec, dar în același timp este citotoxică pentru leucocite.

Rezultatele se corelează în mare măsură cu testul de hidroliză a gelatinei (tehnica Frazier).

Utilizarea substraturilor organice ca sursă de carbon

Această caracteristică este "exploatăată" prin testul de utilizare a unui substrat organic ca unică sursă de carbon (**auxanograma**). În acest scop se folosește un mediu chimic definit (M 70, Veron, M63 sau mediul Cruze) la care se adaugă una din cele 14 substanțe folosite ca sursă de carbon (0,1% w/v aminoacizi și acizi organici, 0,2% w/v pentru glucide). Acestea sunt: DL-lactat, DL-4 aminobutirat, trans-aconitat, citrat, glutarat, aspartat, azelat, β -alanină, L-histidină, D-malat, malonat, histamină, L-fenilalanină, fenilacetat.).

Se însămânțează mediul cu o suspensie densă în apă distilată a tulpinii de testat, se incubează de preferință înclinat pentru o mai bună aerare și se citește după 2-6 zile observându-se turbiditatea crescută.

Pentru diferențierea speciilor de *Acinetobacter*, Bouvet PJM și Grimont PAD propun în 1986 o schemă cu 28 de teste biochimice și de cultură, redusă ulterior la 18 teste (*Tabel 1*)^{6,7}.

Pentru a putea diferenția, pe baza caracterelor fenotipice, cât mai multe specii, este bine să se folosească scheme combinate, bazate pe creșterea la diferite temperaturi, hemoliza, testul oxidării glucozei și acidifierii diferitelor zaharuri, alături de auxanograma cu un număr extins de substraturi.

Sisteme comerciale

Au fost puse la punct diferite sisteme comerciale de identificare și tipizare (API 20NE, MAST, VITEK), în principal pe baza utilizării unei surse unice de carbon, alături de alte teste cum sunt capacitatea de reducere a nitraților în nitriți, producerea indolului, hidroliza

gelatinei, producerea de urează, prezența enzimelor care degradează acizii aminici. Sistemul API20NE, deși permite diferențierea a 209 biotipuri posibile, utilizat singur, nu permite identificarea tuturor tulpinilor de *Acinetobacter* la nivel de specie. Din studiile comparative care evidențiază avantajele și punctele slabe ale fiecărui astfel de sistem, sunt de notat rapiditatea, reproductibilitatea și ușurința în execuție, dar și costurile relativ mari ale echipamentului și consumabilelor.

În situațiile de izbucniri epidemice, când este necesar să se determine gradul de înrudire al tulpinilor izolate dintr-un focar, se apelează la metode capabile să discrimineze între tulpini aparținând aceleiași specii, metode fenotipice și genotipice care, în diferite asocieri, cresc capacitatea de discriminare³¹.

Biotiparea

PJM Bouvet și PAD Grimont, au reușit, în 1987, diferențierea tulpinilor aparținând *A. baumannii* în 19 biotipuri (*Tabel 2*) utilizând 6 substraturi ca sursă de carbon: levulinat, citraconat, L-fenilalanină, fenilacetat, 4-hidroxi-benzoat și L-tartrat. Importanța acestei metode rezidă în faptul că poate fi folosită în diferențierea tulpinilor implicate în infecții nosocomiale, unele biotipuri (1, 2, 6, 9) dovedindu-se ca fiind mai frecvent izolate în aceste circumstanțe^{7,8}.

Sistemele biochimice de tipaj au însă o putere discriminatorie slabă, ele neputând diferenția între tulpini izolate de la pacienți, purtători sau din mediul spitalicesc și care au proprietăți biochimice identice sau aproape identice. În asemenea cazuri, biotipia trebuie asociată cu o altă metodă de tipizare în scopul creșterii capacității de discriminare a tulpinilor.

Profilul de sensibilitate/rezistență la antibiotice

Testarea sensibilității/rezistenței la antibiotice se poate aplica tuturor tulpinilor de *Acinetobacter*, este ușor de realizat și interpretat și reprezintă atât un instrument util în practica curentă a laboratorului de microbiologie pentru

indicarea unui tratament eficace dar și pentru stabilirea așa numitului „pattern” sau profil de sensibilitate/rezistență ca mijloc de apreciere a

clonalității/diversității tulpinilor.

Fie că se determină mărimea zonei de inhibiție sau concentrația minimă inhibitorie

Tabel 1. Caractere diferențiale ale principalelor specii de *Acinetobacter* ⁶

Specia	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>A. sp. 3</i>	<i>A. haemolyticus</i>	<i>A. junii</i>	<i>A. sp. 6</i>	<i>A. johnsonii</i>	<i>A. Iwoffii</i>	<i>A. sp. 10</i>	<i>A. sp. 11</i>	<i>A. radioresistens</i>
DNA grup	1	2	3	4	5	6	7	8,9	10	11	12
Creștere la:											
44°C	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41°C	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Acidifierea glucozei	+	+	+	d	-	d	-	-	+	-	d
Hidroliza gelatinei	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Hemoliza	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Utilizarea:											
DL-lactat	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
DL-4-aminobutirate	+	+	+	+	d	-	d	d	+	+	+
Trans-aconitate	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-
Citrat	+	+	+	+	d	+	+	-	+	+	-
Glutarat	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Aspartat	+	+	+	d	d	d	d	-	+	d	-
Azelat	+	+	+	-	-	-	-	+	d	d	+
β-alanină	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
L-histidină	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
D-malat	-	+	+	+	+	+	d	d	+	+	-
Malonat	+	+	d	-	-	-	d	-	-	-	+
Histamină	-	-	-	-	-	-	-	-	d	+	-
L-fenilalanină	+	d	d	-	-	-	-	-	-	-	+
Fenilacetat	+	d	d	-	-	-	-	+	d	d	+

(CMI), prin metode difuzimetrice (Kirby Bauer sau E test⁴), prin diluții în mediu lichid sau solid, folosind tehnici manuale sau metode automatizate, rezultatele obținute trebuie interpretate cu atenție și corelate cu datele epidemiologice și cu rezultatele altor metode de diferențiere, în special genetice.

Profilul de sensibilitate/rezistență la antibiotice este supus variabilității ca urmare a presiunii selective exercitate de administrarea antibioticelor. Achiziționarea/pierderea sensibilității la antibiotice ca urmare a achiziției/pierderii de material genetic este o sursă importantă de variabilitate bacteriană și poate apărea în cursul evoluției focarului de infecție nosocomială.

În același focar se pot întâlni profiluri diferite, chiar dacă un anumit marker de rezistență, cum este, de exemplu, producerea unei β -lactamaze cu spectru larg, se întâlnește la un număr important de tulpini din focar.

Testarea capacității de producere a betalactamazelor cu spectru larg de activitate (BLSE) se realizează prin **metoda dublului disc**. Pentru evidențierea capacității tulpinilor producătoare de metalo-betalactamaze tip IMP-1, care conferă rezistență față de oxyimino-cefalosporine, cefamicine și carbapeneme, se utilizează un disc de Cefotaxim (CAZ, 30 μ g) și unul cu acid 2-mercaptopropionic (2 μ l/disc)

plasate la o distanță de 1-2,5 cm precum și un disc martor de CAZ plasat la 4-5 cm de primul disc².

Tipizarea serologică

Încercările inițiale de serotipare a tulpinilor de *Acinetobacter* au dus la punerea la punct a unor scheme care ulterior au fost abandonate din cauza modificărilor taxonomice intervenite în cadrul genului *Acinetobacter*.

Ulterior, numai în cadrul speciei *A. baumannii* au fost evidențiate 34 de serotipuri prin reacții de aglutinare cu seruri policlonale adsorbite. Pantophlet et al. (1998) au dezvoltat o astfel de schemă de serotipie cu anticorpi anti-O (antigen lipopolizaharidic) obținuți pe iepuri imunizați cu lipopolizaharid extras din lizat celular al unor tulpini de *Acinetobacter*²¹.

Din cauza unor diferențe antigenice mici între *A. baumannii* și genospecie 3 sunt necesare studii pe un număr extins de tulpini identificate în prealabil prin hibridizare ADN-ADN.

Metoda este consumatoare de timp, iar serurile nu sunt disponibile ca preparate comerciale. Prin urmare, metoda are aplicabilitate limitată la laboratoarele capabile să își prepare seruri de diagnostic.

Tipizarea fagică

Tipizarea fagică (lizotipia) la *Acinetobacter* se realizează cu ajutorul a două

Tabel 2. Identificarea biotipurilor de *A. baumannii*⁶

Utilizarea :	Biotipul																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
levulinat	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
citraconat	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
L-phenilalanină	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Phenilacetat	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
4-hidroxibenzoat	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+
L-tartrat	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-

seturi de bacteriofagi (unul cu 25 de fagi care permite discriminarea între 125 de lizotipuri (profilul de sensibilitate la bacteriofagi) și cel de-al doilea, cu 14 fagi, care diferențiază 25 de lizotipuri). Metoda a fost utilizată în studii epidemiologice în diferite țări europene^{8,18}. Existența unui număr important de tulpini netipabile, precum și reproductibilitatea redusă fac ca metoda să fie utilă numai în asociere cu alte metode de tipizare. Asociată cu biotipia și antibiotipia a demonstrat predominanța unor lizotipuri în unele focare nosocomiale²³.

Bacteriocinotipia

Având o aplicabilitate mai restrânsă și departe de a fi standardizată, prin aplicarea acestei metode în două cercetări independente s-a reușit discriminarea a 65 % dintre tulpini în primul caz¹ și 46% în al doilea²⁸.

Profilul de proteine

Analiza profilului de proteine de membrană externă sau a profilului de proteine totale prin electroforeza în gel de poliacrilamidă cu SDS au fost utilizate în studii epidemiologice și de taxonomie a genului *Acinetobacter*. Analiza a arătat profile diferite la tulpini neînrudite epidemiologic și profile asemănătoare sau același profil la tulpini izolate din același focar nosocomial^{10,20}.

Profilul plasmidic se referă la conținutul (numărul și dimensiunea) plasmidelor în celula bacteriană. Este prima metodă genetică utilizată în tipizarea tulpinilor și a fost folosită cu succes pentru studierea unor focare de infecții nosocomiale produse de *Acinetobacter*. Rezultatele trebuie corelate cu cele ale altor metode de tipizare. Au fost studii care nu au evidențiat la tulpini epidemice nici un plasmid, iar în alte studii numărul a variat între 1 și 4, cu mărimi diferite⁵. Un număr mare de profile plasmidice la tulpini izolate din aceeași unitate spitalicească, într-o perioadă de timp, semnifică focare multiple, după cum identificarea unui număr redus de pattern-uri identice conduce la concluzia unui focar persistent.

În studiul fragmentelor de restricție en-

zimatică a ADN-ului, o metodă des folosită este **ribotipia** care identifică profilul de restricție pentru genele responsabile de sinteza ARN ribozomal (operonii *rrn*). Metoda are aplicabilitate universală, rămânând de stabilit numai enzima/enzimele de restricție cu care se obține cel mai potrivit număr de fragmente de ADN. Au fost utilizate cu bune rezultate *EcoRI*, *ClaI* și *SaII*, pattern-urile obținute fiind stabile și corelabile cu cele obținute prin alte metode de tipizare. Metoda este deosebit de utilă, dar și foarte laborioasă^{9,13,25}.

O variantă a studiului profilului de restricție enzimatică este utilizarea enzimelor cu situsuri de restricție rare pe cromozomul bacterian și separarea fragmentelor în gel de agaroză prin **electroforeza în câmp pulsant (PFGE)**^{24,25}. Metoda a fost aplicată inițial, în 1984, pentru studiul ADN-ului cromozomal al eucariotelor. Ulterior, a fost utilizată în studiul bacteriilor.

Această metodă reprezintă standardul de aur în ceea ce privește tipizarea moleculară în scop epidemiologic. Odată ce este operațională într-un laborator, ea este aplicabilă tuturor speciilor bacteriene, după modificări minore care se adresează enzimelor de restricție alese sau programului de câmp pulsant aplicat. Aparatura dedicată face metoda ușor utilizabilă, iar citirea rezultatelor se face după colorare cu bromură de etidiu și fotografiere. Citirea interpretativă a rezultatelor are la bază criterii standardizate, aplicabile în toate laboratoarele care utilizează această metodă de analiză și se realizează cu ajutorul unor soft-uri dedicate^{5,9}.

Criteriile pentru interpretarea profilurilor obținute au fost sintetizate de Tenover³⁰ în 1995 și sunt prezentate sintetic în *Tabelul 3*.

Pentru diferențierea tulpinilor de *Acinetobacter* și asigurarea reproductibilității au fost utilizate și sunt citate în literatură cel mai frecvent două enzime: *SmaI* și *ApaI*. Prima conduce la un număr de 20-40 fragmente de digestie cu 5-300 kb iar a doua la 20-30 fragmente cu 10-300 kb^{14,30}.

Pentru comparabilitatea profilelor obți-

nute de diferite laboratoare, Health Protection Agency recomandă utilizarea pentru digestia ADN genomic de *Acinetobacter* spp a enzimei *ApaI* și separarea fragmentelor de restricție după un protocol de migrare cu puls de 5-35 s timp de 30 h la 14°C.

Pentru diferențierea tulpinilor cu același profil de antibioerezistență a mai fost folosită pentru ca enzimă de restricție *NotI* ²⁹.

Metodele de tipizare bazate pe **amplificare enzimatică**, fie ținesc regiuni genomice repetitive (ERIC), fie amplifică randomizat regiuni complementare unor primeri „universali” (AP-PCR, RAPD). Atunci când se amplifică o secvență conservată, utilizându-se primeri specifici, analiza de restricție a ampliconului este utilă în tipizarea tulpinilor datorită reproductibilității și specificității metodei (PCR-RFLP). Când însă primerii ținesc aleator secvențe de omologie pe cromozomul bacterian, profilul de amplificare poate fi afectat de temperatura de amplificare, conținutul în GC al matriței, numărul de cicluri de amplificare, tipul de Taq-polimerază utilizată, tipul mașinii de PCR, inclusiv gradul de utilizare al acesteia etc.

Atunci când, pentru tipizarea unor tulpini de spital de *A. Baumannii*, au fost utilizate ca primeri oligonucleotide care ținesc elementele repetitive ERIC, rezultatele obținute în studii diferite au fost discordante. În schimb, utilizarea ca țintă a elementelor repetitive REP a

permis obținerea unor profile ale tulpinilor epidemice diferențiate de ale tulpinilor izolate din infecții sporadice cu *A. baumannii* ^{22,30}.

Utilizarea metodei de analiză a **profilului fragmentelor rezultate în urma restricției ampliconului 16S rDNA (ARDRA)** în identificarea tulpinilor de *Acinetobacter* folosind mai multe enzime de restricție, de ex. *AhlI* (AGCT), *CfoI* (GCGC), *HaeIII* (GGCC), *Hinfi* (GANTC), *MboI* (GATC), *MspI* (CCGG), *NciI* [CC(GC)GG], *RsaI* (GTAC), *ScrFI* (CCNGG), *TaqI* (TCGA), a permis diferențierea clară între genospeciile 1 (*A. calcoaceticus*), 2 (*A. baumannii*), 3 și 13. Avantajul este că extracția ADN-ului se face într-un singură etapă, nu necesită o tehnicitate ridicată, iar interpretarea profilurilor obținute se poate realiza cu ajutorul unui soft specializat. Metoda nu a putut discrimina însă între genospeciile 4 și 7, 5 și 17 și nici între 10 și 11. Acest lucru a fost posibil în final doar prin asocierea cu următoarele teste fenotipice: producerea de gelatinază, hemoliza, producerea de acid din glucoză și capacitatea de a crește la 37°C ^{16,32}.

Detectarea genelor de rezistență la antibiotice betalactamice este o altă aplicație a reacției de PCR. Astfel, pentru detectarea genei *bla_{IMP}* la tulpini de *Acinetobacter baumannii* rezistente la Cefotazidim (CAZ) și Imipenem (IMP) (genă răspunzătoare de sinteza unei carbapenemaze care produce hidroliza IMP și

Tabel 3. Criteriile pentru interpretarea profilurilor de restricție prin PFGE ³⁰

Categoria	Nr de eventimente genetice diferite față de tulpina din focar	Nr de fragmente de restricție diferite față de tulpina din focar	Interpretare epidemiologică
identice	0	0	tulpina analizată aparține focarului
strâns înrudite	1	2-3	tulpina analizată probabil aparține focarului
posibil înrudite	2	4-6	tulpina analizată posibil aparține focarului
diferite	≥ 3	≥ 7	tulpina analizată nu aparține focarului

CAZ) s-a folosit un set de primeri descriși de Senda et al. și s-a amplificat un fragment de 587 pb.^{2, 27, 29}

S-a demonstrat astfel utilitatea acestei metode în screening-ul tulpinilor de *Acinetobacter* izolate din prelevate clinice, pentru detectarea timpurie a potențialului epidemic al acestora și instituirea măsurilor specifice adecvate de control al infecțiilor.

Concluzii

Din experiența ultimilor ani, timp în care au fost efectuate numeroase studii comparative între metodele puse la punct pentru identificare și diferențiere, putem trage o serie de concluzii referitoare la aplicabilitatea acestora prin prisma caracteristicilor enunțate de Arbeit³:

- Colorația Gram, aspectele de cultivabilitate și o baterie de teste biochimice, incluzând auxanograma sunt suficiente pentru diagnosticul microbiologic curent
- Serotipia, lizotipia și bactericinotipia sunt mari consumatoare de timp și nu sunt suficiente de discriminatorii pentru studii epidemiologice. În plus, necesită reactivi preparați "in house", neexistând preparate comerciale.
- Antibiotipia cu o gamă extinsă de antibiotice este indispensabilă în contextul existenței unui număr din ce în ce mai mare de tulpini multirezistente izolate din focare de infecții nosocomiale
- Dintre avantajele certe ale utilizării metodelor genotipice putem enumera:
 - Se aplică tuturor tulpinilor bacteriene indiferent de gradul de cultivabilitate.
 - Se adresează acizilor nucleici, depozitării întregii informații genetice a organismelor.
 - Reduc timpul de la momentul prelevării probei biologice până la stabilirea diagnosticului.
 - Sunt înalt specifice/ sensibile/ reproductibile.

- Discriminează între tulpini aparținând aceleiași specii (în funcție de markerul ales).
- Sunt metode de analiză pentru reorganizări taxonomice.
- Fac corelația între informația genetică și exprimarea acesteia.
- Sunt metode de studiu epidemiologic cu valoare universală.
- Pentru diferențierea tulpinilor în scop epidemiologic, PFGE rămâne metoda de referință.
- Diferite tehnici de amplificare urmate de secvențierea fragmentelor amplificate sunt aplicabile în scopul identificării unor noi markeri genetici utili în diagnostic, epidemiologie și filogenie microbiană.

Bibliografie

1. Andrews H. J. - *Acinetobacter* bacteriocin typing. J. Hosp. Infect. 1986; 9: 169-175.
2. Arakawa Y., Shibata N., Shibayama K et al. - Convenient Test for Screening Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds, J. Clin. Microbiol., 2000; 38, 1, 40-43.
3. Arbeit R.D. - Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms, In Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C., Tenover R.H. eds Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1995:190-208.
4. Arroyo L.A., Garc ya-Curiel A., Pachon-Ibanez M. E. et al - Reliability of the E-Test Method for Detection of Colistin Resistance in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*, J. Clin. Microbiol., 2005; 43, 2: 903-905.
5. Bergogne-B r zin E, Towner J.K. - *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features - Clin Microbiol Rev, 1996, 9, 2:148 - 51.
6. Bouvet P.J., Grimont P.A. - Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*, Ann Inst Pasteur Microbiol. 1987, 138(5):569-78.

7. Bouvet P.J.M. et Joly-Guillou M.L.: *Acinetobacter*. In: J. FRENEY, F. RENAUD, W. HANSEN et C. BOLLET: Précis de bactériologie clinique, Editions ESKA, Paris, 2000, 1239-1258.
8. Bouvet P.J.M., Jeanjean S., Vieu J.-F., and L. Dijkshoorn L. - Species, biotype, and bacteriophage type determinations compared with cell envelope protein profiles for typing *Acinetobacter* strains. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 170-176.
9. Damian M. - Ribotipia, metoda moleculară utilă în studiile epidemiologice. *Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol.*, 2000, 45, (1-2):3-11.
10. Dijkshoorn, L., Michel M.F., and Degener J.E. - Cell envelope protein profiles of *Acinetobacter calcoaceticus* strains isolated in hospitals. *J. Med. Microbiol.* 1987; 23:313-319.
11. Euzéby J.P. - Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire, 2003, <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/aa/acinetobacter.html>
12. Gerner-Smidt P., Tjernberg I., Ursing J. - Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 277-282
13. Gerner-Smidt, P. - Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30:2680-2685.
14. 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.* 1992 30:1588-1591.
15. Houang E.T.S., Chu Y.W., Leung C.M. et al. - Epidemiology and Infection Control Implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong *J. Clin. Microbiol.* 2000; 39, 1:228-234.
16. Ibrahim A., Gerner-Smidt P., Sjöstedt A. - Amplification and Restriction Endonuclease Digestion of a Large Fragment of Genes Coding for rRNA as a Rapid Method for Discrimination of Closely Related Pathogenic Bacteria, *J. Clin. Microbiol.*, 1996; 36 (12) 2894-2896.
17. Jawad A., Hawkey P.M., Heritage J., and Snelling A.M. - Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32:2353-2358.
18. Joly-Guillou M.L., Bergogne-Berezin E., and Vieu J.F. - A study of the relationships between antibiotic resistance phenotypes, phage-typing and biotyping of 117 clinical isolates of *Acinetobacter* spp. *J. Hosp. Infect.* 1990; 16:49-58.
19. Juni E. - Interspecies transformation of *Acinetobacter*: Genetic evidence for a ubiquitous gene. *J. Bacteriol.* 1972; 112, 917-931.
20. Mortensen, J.E., La Rocco M.T., Steiner B. and Ribner B. - Protein fingerprinting for the determination of relatedness in *Acinetobacter calcoaceticus* subspecies *anitratus* isolated from patients in a surgical intensive care unit. *Infect. Control* 1987; 8:512-515.
21. Pantophlet R., Brade L., Dijkshoorn L. and Brade H. - Specificity of Rabbit Antisera against Lipopolysaccharide of *Acinetobacter*. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 5: 1245-1250.
22. Reboli, A.C., Houston E.D., Monteforte J. et al. - Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acinetobacter baumannii* by repetitive element PCR-mediated DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32:2635-2640.
23. Santos Ferreira M.O., Vieu J. F., and Klein B. - Phage-types and susceptibility to 26 antibiotics of nosocomial strains of *Acinetobacter* isolated from Portugal. *J. Int. Med. Res.* 1984; 12:364-368.
24. Seifert H., Dijkshoorn L. et al. - Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 32: 2819-2825.
25. Seifert H., Gerner-Smidt P. - Comparison of Ribotyping and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Typing of *Acinetobacter* Isolates, *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33 (5) 1402-1407.
26. Senda, K., Arakawa Y., Ichiyama S et al. - Identification of *Acinetobacter* on Blood Agar in Presence of D-Glucose by Unique Browning Effect, *J. Clin. Microbiol.* , 1998; 36 (5) 1404-1407.
27. Shimokata N.K, and Ohta M.. - PCR detection of metallo-β-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β-lactams. *J. Clin. Microbiol.* 1996: 34:2909-

- 2913.
28. Stone, J.W. and Das B.C. - Investigation of an outbreak of infection with *Acinetobacter calcoaceticus* in a special care baby unit. *J. Hosp. Infect.* 1985; 6:42–48.
29. Takahashi A., Yomoda S., Kobayashi I. et al. - Detection of Carbapenemase-Producing *Acinetobacter baumannii* in a Hospital, *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38, 2:526–529.
30. Tenover, F.C., Arbeit, R.D. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction pattern produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33:2233-2239.
31. Tenover F.C., Arbeit, R.D., Goering R.V. - How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologists. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 1997; 18, 6:426-439.
32. Vaneechoutte M., Dijkshoorn L., Tjernberg I. et al. - Identification of *Acinetobacter* Genomic Species by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33, 1:11–15.