

## WYKRYWANIE BAKTERII Z GATUNKU *ACINETOBACTER BAUMANNII* W PRÓBKACH MEDYCZNYCH I ŚRODOWISKOWYCH

Małgorzata Dąbrowiecka<sup>1)</sup>, Iwona Piątek<sup>2)</sup>, Michał Obuchowski<sup>3)</sup>, Zbigniew Dąbrowiecki<sup>1)</sup>,  
Romuald Olszański<sup>1)</sup>

1) Zakład Medycyny Morskiej i Hiperbarycznej Wojskowego Instytutu Medycznego w Gdyni

2) Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego

3) Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

### STRESZCZENIE

Drobnoustroje z rodzaju *Acinetobacter* należą do Gramujemnych pałeczek. Są to mikroorganizmy wolnożyjące, spotyka się je w glebie i w zbiornikach wodnych, ale niektórzy przedstawiciele rodzaju *Acinetobacter* mogą być również składnikiem mikroflory skóry człowieka, co powoduje, że mają duże znaczenie kliniczne, ponieważ często zasiedlają środowisko szpitalne i są przyczyną szpitalnych zakażeń oportunistycznych, zwłaszcza u pacjentów z obniżoną odpornością. Celem naszego projektu było opracowanie szybkiej i wiarygodnej metody detekcji bakterii z gatunku *Acinetobacter baumannii*, w próbkach medycznych i środowiskowych.

**Słowa kluczowe:** zakażenia szpitalne, *Acinetobacter baumannii*, diagnostyka molekularna.

---

### ARTICLE INFO

---

PolHypRes 2014 Vol. 48 Issue 3 pp. 19 – 32

ISSN: 1734-7009 eISSN: 2084-0535

DOI: [HTTP://DX.DOI.ORG/10.13006/PHR.48.2](http://dx.doi.org/10.13006/PHR.48.2)

Strony: 14, rysunki: 4, tabele: 0.

page **www of the periodical:** [www.phr.net.pl](http://www.phr.net.pl)

**Typ artykułu:** oryginalny

**Termin nadesłania:** 08.06.2014 r

**Termin zatwierdzenia do druku:** 13.08.2014 r

### Publisher

Polish Hyperbaric Medicine and Technology Society



## WSTĘP

Epidemie spowodowane przez zakażenia szpitalne nadal stanowią duże wyzwanie, są przyczyną przedłużonego leczenia i rekonwalescencji, co zwykle jest bardzo kosztowne, mogą również doprowadzić do zgonu pacjenta. Główne zagrożenia stanowią wciąż metycylinooporne gronkowce złociste (MRSA) oraz wankomycynooporne enterokoki (VRE). Nie należy jednak lekceważyć często występujących patogenów Gram-ujemnych takich jak: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae* oraz *Acinetobacter baumannii*. [1,2,3].

Ten ostatni, bardzo szybko nabywa wielolekooporności i nabiera dużego znaczenia klinicznego z powodu ograniczonych możliwości leczenia, wywoływanych przez niego infekcji. Jest zdolny do przetrwania na powierzchniach abiotycznych, a co się z tym wiąże, potrafi niezwykle długo egzystować w warunkach szpitalnych [4].

Efektywny mechanizm horyzontalnego transferu genów, prowadzi do szybkiego nabywania przez ten patogen oporności na szerokie spektrum antybiotyków i środków bakteriostatycznych. Obserwuje się rozprzestrzenianie multilekoopornych szczepów wśród pacjentów, w szpitalach na całym świecie [5].

Szczególnym problemem są też zakażenia wśród rannych żołnierzy, biorących udział w misjach wojskowych. Istnieje wiele doniesień o ciężkich przypadkach infekcji, wywołanych przez bakterie z rodzaju *Acinetobacter* dotyczących amerykańskich żołnierzy, powracających z Iraku i Afganistanie [6].

Pomocne w ograniczaniu zakażeń szpitalnych jest prowadzenie programów ich kontroli, mające na celu poznanie dróg rozprzestrzeniania się infekcji oraz potencjalnych rezerwuarów patogenów.

Aby to osiągnąć, wykonuje się badania mikrobiologiczne pacjentów oraz przeprowadza testy aseptyczności sprzętu medycznego. Zwiększa się również wymogi dotyczące przestrzegania zasad higieny pracy przez personel szpitalny [2].

Drobnoustroje z rodzaju *Acinetobacter*, należą do nieruchliwych, barwiących się Gramujemnie pałeczek, rzadziej ziarniako-pałeczek. Są prototrofami o małych wymaganiach wzrostowych.

Prowadzą ściśle tlenowy metabolizm, dlatego są zaliczane do tzw. pałeczek niefermentujących.

Są to mikroorganizmy wolnożyjące, spotyka się je w glebie i zbiornikach wodnych.

Ale niektórzy przedstawiciele rodzaju *Acinetobacter* mogą być również składnikiem mikroflory skóry człowieka. *Acinetobacter baumannii* i *Acinetobacter lwoffii*, oraz w mniejszym stopniu *Acinetobacter calcoaceticus* i *Acinetobacter haemolyticus*, mają znaczenie kliniczne, ponieważ często zasiedlają środowisko szpitalne i są przyczyną szpitalnych zakażeń oportunistycznych, zwłaszcza u pacjentów z obniżoną odpornością. Izoluje się je z różnych materiałów klinicznych – moczu, krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego czy materiału z ran pooperacyjnych [2,7].

Bakterie z rodzaju *Acinetobacter* po raz pierwszy zaczęły być uznawane za znaczące szpitalne patogeny w roku 1970. Na początku w badaniach *in vitro*, większość izolatów klinicznych było wrażliwych na powszechnie stosowane antybiotyki, takie jak ampicylina (60-70%), gentamycyna (92,5%), chloramfenicol (57%) i kwas nalidyksowy (97,8%), tak więc zakażenia wywołane przez te organizmy mogły być leczone stosunkowo łatwo. Jednak w ciągu ostatnich dwóch dekad odnotowuje się wzrost ilości wielolekoopornych izolatów *Acinetobacter* sp.

Dzieje się tak, w wyniku powszechnego i nie zawsze uzasadnionego stosowania silnych antybiotyków o szerokim spektrum działania w szpitalach na całym świecie [3,5, 7].

Największym zainteresowaniem badaczy cieszy się *A. baumannii*, ponieważ jest to najczęściej spotykany patogen ludzki ze wszystkich gatunków należących do rodzaju *Acinetobacter*.

Jest on odpowiedzialny za wywoływanie zakażeń układu moczowego, groźnych infekcji ran oraz rozległych oparzeń, a także zapalenia płuc i wtórnego zapalenia opon mózgowych. To właśnie zapalenia płuc o ciężkim przebiegu są najczęściej wykrywaną w ostatnich latach chorobą wywoływaną przez *A. baumannii*.

Co jest niezwykle niepokojące, to fakt, że szpitalne zapalenia płuc są drugimi co do częstości występowania chorobami odnotowywanymi w szpitalach na terenie USA. Śmiertelność w tego typu infekcjach utrzymuje się na poziomie 30-50%, przy czym najwyższy odsetek stanowią te, wywoływane przez *A. baumannii* oraz *P. aeruginosa*. Poza tym, *A. baumannii* należy do grupy 8 patogenów najczęściej wywołujących szpitalne zapalenia płuc w Europie i Azji [3,7,8].

Wysoka patogenność tego drobnoustroju związana jest z szeregiem charakterystycznych dla tego gatunku cech, takich jak zdolność do zasiedlania i długotrwałego przebywania na powierzchniach abiotycznych, niewrażliwość na wiele środków antybakteryjnych stosowanych do dezynfekcji, czy wysoki poziom kompetencji genetycznej, dzięki czemu nabywa on bardzo szybko lekooporność. Szacuje się, że obecnie ok. 10-30% izolatów szpitalnych należy do grupy wielolekoopornych.

Nawet wrażliwość na antybiotyki z grupy karbapenemów w ciągu ostatniej dekady zaczęła znacząco maleć, sugerując, że być może era antybiotykowa w kontekście *A. baumannii* skończy się o wiele szybciej niż jest to przewidziane dla metycylinoopornych szczepów *S. aureus* (MRSA), stanowiących do tej pory największe zagrożenie [5,7,9].

Dlatego tak niezwykle ważny jest rozwój epidemiologii, która zajmuje się badaniem różnych czynników, które mają wpływ na pojawianie się i rozprzestrzenianie drobnoustrojów chorobotwórczych, a także określa sposoby zapobiegania i kontroli zakażeń.

Zaadoptowanie metod molekularnych do badania dróg rozprzestrzeniania się bakterii *A. baumannii*, roli personelu medycznego w przenoszeniu zakażeń oraz wpływu środowiska na rozwój infekcji może zmniejszyć zagrożenie, a przynajmniej pozwoli je kontrolować. Wybuchy epidemii, spowodowanych wielolekoopornymi szczepami *A. baumannii* są opisywane coraz częściej.

W ogólnosiwiatowej epidemiologicznej bazie danych znajduje się ponad 130 wpisów dotyczących wybuchów epidemii szpitalnych z udziałem *A. baumannii* opublikowanych pomiędzy 1977 a 2006 rokiem [10].

Sugeruje się, że epidemie wewnątrzszpitalne oraz ogólnokrajowe, są spowodowane tylko przez kilka szczepów. Są to pojedyncze klony, zdolne do rozprzestrzeniania się w ośrodkach szpitalnych, głównie na oddziałach intensywnej opieki medycznej.

Przypomina to epidemiologię metycyliny-opornych szczepów *S. aureus*, z tego też powodu, *A. baumannii* bywa czasem nazywany „Gramujemnym MRSA”.

Istnieją doniesienia z wielu zakątków świata o epidemiach szpitalnych, wywołanych przez *A. baumannii*. Przykładem może być oddział intensywnej opieki medycznej szpitala w Grecji, gdzie epidemia obejmowała ponad

trzymiesięczny okres czasu lub epidemia wywołana przez dwa oddzielne klony *A. baumannii*, która objęła oddział intensywnej opieki dla noworodków w szpitalu w Brazylii, a także dwa, następujące kolejno po sobie wybuchy epidemii na oddziale chirurgicznym, w jednym z włoskich szpitali.

Epidemie szpitalne mogą się rozprzestrzeniać dynamicznie lub występować endemicznie przez dłuższy czas, jak to miało miejsce w szpitalu Nottingham, gdzie obecność szczepu należącego do omawianego gatunku, odnotowywano przez 11 lat. Dane literaturowe skupiają się na dwóch głównych drogach transmisji zakażeń: (i) zakażenia pochodzące ze środowiska oraz (ii) zakażenia przenoszone z pacjenta na pacjenta bezpośrednio lub pośrednio, z udziałem personelu medycznego.

Również sprzęt medyczny, chętnie zasiedlany przez *A. baumannii* jest źródłem licznych zakażeń. Najczęściej są to elementy urządzeń, związanych z leczeniem chorób układu oddechowego oraz wspomaganiem oddychania, takie jak respirometry, ustniki, rurki wentylacyjne, czujniki temperatury i tlenu itp.

To właśnie zdolność tego gatunku do pozostawiania przez relatywnie długi czas (do kilku tygodni) na powierzchniach abiotycznych (metale, plastyki itd.), bez utraty żywotności i infekcyjności, sprawia ogromny problem w kontekście rozprzestrzeniania i eradykacji zakażeń szpitalnych.

Badania przeprowadzone w jednym ze szpitali w Nowym Jorku wykazały, że w 11% próbek pobranych z powierzchni abiotycznych (łóżek, stołów, monitorów) oraz w aż 29% próbek pobranych z rąk personelu medycznego tej placówki, wykryto obecność bakterii *A. baumannii*.

Co więcej, istnieją dane udowadniające, że głównym źródłem zakażeń są właśnie placówki opieki medycznej, gdyż wykazano że ok. 60% izolatów szpitalnych jest blisko spokrewnionych ze sobą, w porównaniu do zalewie 17% izolatów środowiskowych.

A źródłem przemieszczania i rozprzestrzeniania się epidemii są pacjenci, wędrujący między jednostkami szpitalnymi oraz personel medyczny [2,7,8].

Kontyngenty wojskowe ONZ i NATO, w których szeregi wchodzi również Siły Zbrojne Rzeczypospolitej Polskiej, stacjonują zazwyczaj w krajach o odmiennym klimacie, gdzie istnieją trudne warunki sanitarno-higieniczne.

Dodatkowo niski stopień rozwoju gospodarczego, brak odpowiedniej opieki medycznej, umożliwiającej zapobieganie oraz leczenie chorób u tubylców, stwarza zagrożenie dla zdrowia przebywających tam żołnierzy. Dlatego niezbędna jest obecność na miejscu misji pracowników wojskowej służby zdrowia, którzy są w stanie zabezpieczyć pod względem medycznym kontyngenty narodowe, a co za tym idzie i całość misji.

Leczenie żołnierzy po przebytych urazach wiąże się często z komplikacjami przedłużającymi okres powrotu do zdrowia. Jednym z elementów tych komplikacji, mogą być zakażenia przyranne wywołane odłamkami pocisków lub min, zanieczyszczonymi fragmentami odzieży, jak również zakażenia wprowadzone przez kontakt z niedokładnie odkażonym sprzętem.

Sz szczególnie niebezpieczne są przypadki urazów połączonych z oparzeniami. Przeprowadzone badania wykazały, że zakażenia szpitalne w tym wypadku są odpowiedzialne za 50% przypadków śmiertelnych ofiar ciężkich oparzeń. Izolacja i identyfikacja mikroorganizmów wykazała obecność *Pseudomonas aeruginosa* (37,5%), *Staphylococcus aureus* (20,2%) i *Acinetobacter baumannii* (10,4%).

Jednak analiza powikłań w leczeniu urazów żołnierzy ewakuowanych z misji w Iraku, w szpitalu USS Comfort, wykazała zdecydowaną dominację *A. baumannii*, gatunek odpowiedzialny za ciężkie infekcje, bardzo trudne do wyleczenia z powodu na oporności izolatów na wiele antybiotyków.[11,12,13]

W ograniczaniu zakażeń szpitalnych i nie tylko, bardzo ważną rolę odgrywa diagnostyka mikrobiologiczna, dzięki której możliwa jest izolacja czynnika etiologicznego, i określenie jego lekowrażliwości.

Obecnie dominują klasyczne metody typowania drobnoustrojów, polegające na analizie ich cech fenotypowych, czyli obserwacji zewnętrznych efektów ekspresji informacji genetycznej. Czasami jednak występują problemy z jednoznaczną identyfikacją mikroorganizmu, co znacznie wydłuża czas postawienia właściwej diagnozy. Jest to związane z powszechnie występującym zjawiskiem zmienności fenotypowej. Powoduje to, iż wciąż poszukuje się nowych metod diagnostycznych, które pozwalałyby na szybką weryfikację przynależności gatunkowej patogenów.

Taką możliwością dają metody genotypowe, oparte na technikach biologii molekularnej. Znajdują one coraz powszechniejsze zastosowanie w identyfikowaniu i różnicowaniu mikroorganizmów, w szczególności w dochodzeniach epidemiologicznych. Bazują one na analizie materiału genetycznego, który jest unikalny i niezmienny dla każdego mikroorganizmu (w porównaniu do cech fenotypowych). Ich duża zaletą jest to, że nie ograniczają się do ściśle określonej liczby drobnoustrojów, wręcz przeciwnie, pozwalają na badania nawet takich mikroorganizmów, których hodowla laboratoryjna jest bardzo trudna lub wręcz niemożliwa.

Poza tym czas wykonywanych analiz w porównaniu z metodami klasycznymi jest zdecydowanie krótszy, co często zmniejsza nakład pracy i koszty. Poza tym uniwersalność stosowanej aparatury i odczynników daje możliwość porównywania otrzymanych wyników między laboratoriami [1,14,15,16,17,18].

Mimo wielu zalet technik biologii molekularnej, obecnie do standardowych procedur diagnostycznych szczepów z rodzaju *Acinetobacter* nadal należą klasyczne metody oparte o analizę fenotypu. Drobnoustroje hoduje się na podłożach selekcyjnych i różnicujących oraz przeprowadza szereg testów biochemicznych i enzymatycznych. Dla ułatwienia procedur wykorzystuje się komercyjnie dostępne zestawy takie jak API 200NE (bioMerieux) lub automatyczne systemy identyfikacji bakterii np. VITEK (bioMerieux). Jednak jak się okazuje, duża zmienność fenotypowa sprawia ogromne trudności w sklasyfikowaniu tych drobnoustrojów do określonego gatunku. A to powoduje wydłużenie czasu analiz i potrzebę wzbogacenia ich o dodatkowe testy.

Niestety nie opisano dotąd reakcji, której wynik jednoznacznie wskazywałby, że badany mikroorganizm należy do szukanego gatunku. Testy biochemiczne i enzymatyczne działają na zasadzie wykluczenia (wynik dodatni świadczy, że to nie *A. baumannii*, a wszystkie izolaty dające wynik ujemny wymagają kolejnych testów) i dlatego konieczne są późniejsze analizy na poziomie molekularnym (np. amplifikacja 16S rDNA i *recA* oraz sekwencjonowanie) [19,20].

Powyższe problemy sprawiają, że w rutynowej diagnostyce chorób infekcyjnych oraz w badaniach epidemiologicznych coraz większą rolę zaczynają odgrywać metody oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych techniką

PCR. Ze względu na ich czułość, specyficzność i łatwość wykonywania powoli stają się standardowym narzędziem diagnostyki medycznej [17,21,22,23].

Dlatego również w tym projekcie zdecydowano się na próbę opracowania testu diagnostycznego wykorzystującego odmianę metody PCR, jaką jest technika PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR).

Pozwala ona na bardzo szybkie stwierdzenie obecności komórek bakterii *Acinetobacter baumannii* w badanych próbkach. Co więcej, można również przy jej pomocy łatwo określić ich ilość. Taki test powinien odznaczać się wysoką specyficznością, tak więc wybranie fragmentów genomu, które będą powielane w reakcji Real-Time PCR nie było łatwe.

Musiały one być wspólne dla wszystkich szczepów w obrębie gatunku, a jednocześnie na tyle specyficzne, aby produkt nie powstawał na matrycy innych mikroorganizmów innych gatunków.

Celem projektu jest opracowanie szybkiej i wiarygodnej metody detekcji bakterii z gatunku *Acinetobacter baumannii* w próbkach medycznych i środowiskowych oraz opracowanie pod względem epidemiologicznym placówek opieki zdrowotnej Marynarki Wojennej oraz miejsc długotrwałego przebywania żołnierzy takich jak okręty podwodne, trałowce itp. w celu stwierdzenia istnienia potencjalnego zagrożenia zdrowia.

## METODYKA

### Pobieranie próbek

Wymazy z badanych powierzchni pobieramy nasączonymi solą fizjologiczną (0,85% NaCl) lub pożywką LB jałowymi wacikami. Następnie waciki umieszczamy w jałowych probówkach. Opisane próbki umieszczamy w 4°C do czasu przetransportowania do laboratorium.

### Przygotowywanie próbek do analiz

Wacik płuczemy w 500 µl pożywki LB przez ok. 30 sekund. Otrzymaną zawiesinę należy zwirować, supernatant delikatnie zlać. W próbce pozostaje ok. 150 µl materiału (osad + pożywka LB). Po dokładnym rozpipetowaniu dzielimy zawiesinę bakteryjną na 3 części. Do jednej dodajemy taką samą objętość 50% glicerolu (aby stosunek wynosił ok. 1:1) i zamrażamy w temp. -70°C. Pozostałą ilość wykorzystujemy do badania *real-time* PCR i do posiewu na podłoża LAM i MacConkeya.

### Reakcja *real-time* PCR

Jako matrycy używamy odpowiednio przygotowanych próbek medycznych i środowiskowych. Do reakcji dodajemy (na 20 µl):

- oligonukleotydy i sondy o optymalnym stężeniu (ustalonym doświadczalnie)
- 10 µl SuperMix (Bio-Rad, USA)
- wodę do 20 µl

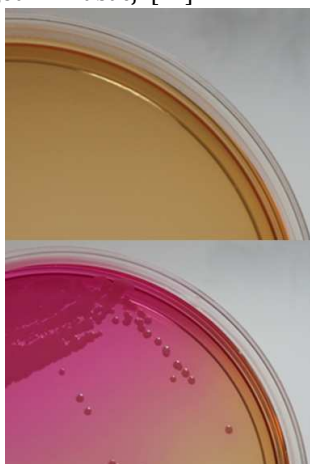
Reakcję przeprowadzamy w termocyklerze CFX96™ (Bio-Rad, USA), a następnie interpretujemy wyniki, pozytywne próbki to te, w których zaszła reakcja amplifikacji połączona z emisją światła sond, które przyłączyły się do matrycy DNA

### Metody fenotypowego różnicowania badanych izolatów

- Posiew na podłoże LAM (Leeds Acinetobacter Medium)  
Podłoże przygotowujemy zgodnie z instrukcją umieszczoną w publikacji.

Z każdego z przygotowanych wcześniej seryjnych rozcieńczeń badanej próbki wysiewamy po 100µl na płytkę (posiew na murawę). Wstawiamy do ciepłarki (37°C) na dobę.

Jeżeli nastąpi wzrost bakterii na płytce, wybieramy takie rozcieńczenie, gdzie rozróżnialne są pojedyncze kolonie. Kolonie *A. baumannii* mają kolor różowy, a podłoże wokół zmienia zabarwienie na różowo-fioletowe, są okrągłe, wypukłe, gładkie, matowe o średnicy 1-2 mm po 24 godz. inkubacji [24].



Rys. 1. Pożywka LAM. Zmiana zabarwienia pożywki przez kolonie z rodzaju *Acinetobacter* spp.

- Posiew na podłoże MacConkeya

Podłoże przygotowujemy

według zaleceń producenta.

Z każdego z przygotowanych wcześniej seryjnych rozcieńczeń badanej próbki wysiewamy po 100  $\mu$ l na płytkę (posiew na murawę).

Wstawiamy do cieplarki (37°C) na dobę. Jeżeli nastąpi wzrost bakterii na płytce, wybieramy takie rozcieńczenie, gdzie rozróżnialne są pojedyncze kolonie. Wybieramy kilka kolonii bakteryjnych, zróżnicowanych pod względem morfologicznym i opisujemy ich charakterystyczne cechy, uwzględniając barwę, kształt, wielkość, powierzchnię i wyniosłość ponad powierzchnię.

- Przesiewanie na podłoże LA

Wybrane i opisane kolonie z podłoża MacConkeya lub podłoża LAM przesiewamy za pomocą jałowej ezy na podłoże LA, rysując na pożywce "kreskę" długości ok. 3-4 cm. Materiał ten stanowił bazę wyjściową do kolejnych testów.

- Test na aktywność oksydazy cytochromowej

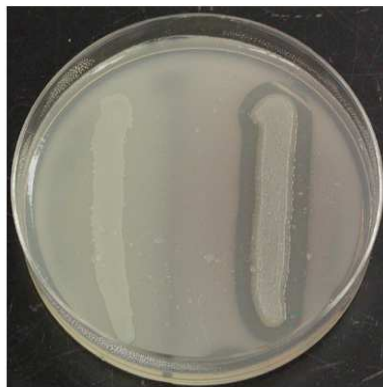
Fragment kolonii z podłoża LA, pobrany za pomocą jałowego tipsa nanosimy na strefę reakcyjną paska testowego i równomiernie rozprowadzamy. Po ok. 30 sekundach porównujemy zabarwienie pasków testowych z zamieszczoną na opakowaniu kolorową skalą.

- Sprawdzenie aktywności DNazy

Czystą kulturę badanego szczepu pobraną z podłoża LA posiewamy na powierzchnię wcześniej przygotowanego (według zaleceń producenta) agaru testowego na obecność Dnazy.

Na każdej z płytek wysiewamy również szczepy referencyjne – *Staphylococcus aureus* (DNazo-dodatni) i *Escherichia coli* (DNazo-ujemna). Inkubujemy 24 godziny w 37°C.

Następnie na płytce wylewamy po 400  $\mu$ l 1N kwasu solnego i obserwujemy zmętnienie podłoża i pojawienie się strefy przejaśnienia wokół kolonii Dnazo-dodatnich.



Rys. 2. Oznaczanie aktywności DN-azy.

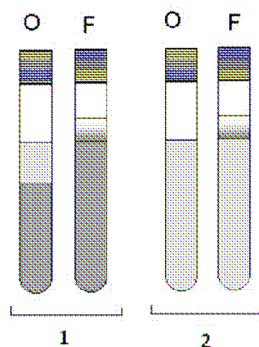
- Utlenianie i fermentacja cukrów – podłoże Hugh-Leifsona

Podłoże przygotowujemy według zaleceń producenta w 3 osobnych kolbach, do każdej z nich dodajemy 100 ml/litr 10% wyjałowionego przez filtrację roztworu węglowodanu, odpowiednio glukozy, laktozy i ksylozy, po czym starannie mieszamy.

Tak przygotowane podłoże rozlewamy do probówek tak, aby słupek pożywki miał ok. 5 cm.

W połowie probówek natychmiast po wystudzeniu pokrywamy podłoże ok. 1 cm warstwą jałowej parafiny. Czystą hodowlę badanego szczepu zaszczepiamy metodą wkłucia do dna probówki podłoże z każdym węglowodanem (jedną probówkę z parafiną i jedną bez). Pozostawiamy na 48 godzin w 37°C.

Po upływie podanego czasu oceniamy zmianę zabarwienia w probówkach. Żółte zabarwienie w jedynie w probówce bez parafiny wskazuje na rozkład oksydacyjny, natomiast zmiana koloru w obu probówkach – z parafiną i bez – oznacza rozkład fermentacyjny badanego węglowodanu.



Rys. 3. Interpretacja wyników testu na utlenianie/fermentację cukrów (podłoże Hugh-Leifsona) O – oxidation (utlenianie); F – fermentation (fermentacja).

#### Powielanie fragmentów DNA metodą PCR

Jako matrycy używamy DNA chromosomalnego. Do reakcji dodajemy: primery do stężenia końcowego 1 $\mu$ M, deoksynukleotydy do stężenia końcowego 0,2 mM, bufor dla polimerazy Taq, polimerazę Taq w ilości 0,2 jednostki na reakcję, wodę do objętości końcowej 10 lub 50  $\mu$ l.

Parametry reakcji, takie jak czas anealingu i elongacji DNA, temperatura hybrydyzacji starterów do matrycy czy liczba cykli, dobieramy w zależności od wykorzystywanych oligonukleotydów i długości produktu. Reakcję przeprowadzamy w termocyklerze Mastercycler Personal (Eppendorf, Niemcy).

#### Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym

Rozdział elektroforetyczny przeprowadzamy w poziomym aparacie do elektroforezy przy użyciu żelu agarozowego o odpowiednim dla długości produktu stężeniu (od 1 do 2%) w buforze TAE. Próbkę DNA mieszamy z barwnikiem obciążającym w stosunku 5:1 i наносimy do studzienek żelu.

Rozdział przeprowadzamy przy napięciu 100V/cm długości żelu. Następnie żel barwimy w roztworze bromku etydyny przez około 5-10 minut a potem oglądamy w świetle UV o długości fali  $\lambda$  354 nm i wykonujemy zdjęcie przy użyciu aparatu *Gel DocTM XR System* (Bio-Rad, USA).

#### Sekwencjonowanie wybranych i powielonych odcinków DNA

Aby ostatecznie potwierdzić gatunkową przynależność wytypowanych i przebadanych izolatów, zdecydowano się na sekwencjonowanie 16S rDNA i recA. Są to rejonu wysoce konserwatywne a gen recA jest bardzo często wykorzystywany w identyfikacji bakterii z rodzaju *Acinetobacter*.

#### Powielenie fragmentów DNA metodą PCR

przeprowadzamy z oczyszczonym DNA chromosomalnym poszczególnych izolatów. Następnie wykonujemy rozdział elektroforetyczny otrzymanych produktów reakcji PCR w celu wstępnego sprawdzenia czy wytypowane izolaty należą do gatunku *Acinetobacter baumannii*.

Jeżeli w wyniku elektroforezy otrzymamy wynik pozytywny, ponownie amplifikujemy i oczyszczamy fragmenty 16S rDNA i recA. Do oczyszczania fragmentów DNA do sekwencjonowania używamy zestawu Clean-up firmy A&A Biotechnology, według zaleceń producenta.

Tak przygotowany materiał przesyłamy do sekwencjonowania, który wykonuje zewnętrzna firma. Uzyskane w ten sposób wyniki weryfikujemy przy użyciu programu FinchTV, porównujemy z bazą danych i oceniamy, czy wytypowane przez nas izolaty należą do gatunku *Acinetobacter baumannii*.

#### Badanie izolatów metodą elektroforezy pulsacyjnej

Zmodyfikowano protokół REA-PFGE do typowania *Acinetobacter baumannii*. [25, 26]

- Przygotowanie bloczków agarozowych
- 1) Wytypowanym izolatem bakteryjnym zaszczepiamy ok. 50 ml jałowej pożywki LB – całonocna hodowla: 18 godz. 37 $^{\circ}$ C lub wysiewamy na podłoże LA;
- 2) Wybieramy pojedynczą kolonię bakteryjną i przenosimy ją za pomocą jałowej ezy do 1 ml buforu CBS, delikatnie mieszamy tak aby otrzymać w miarę jednorodną zawiesinę, lub zawirujemy 1ml hodowli nocnej o OD – 1,0-1,3 (1000g;5 min.;4 $^{\circ}$ C), osad przemywamy 1 ml CSB i ponownie wirujemy, a następnie osad bakteryjny zawieszamy w 1 ml CSB. Tak przygotowana zawiesinę komórek bakteryjnych można przetrzymywać w temperaturze pokojowej do czasu zmieszania z roztworem agarozu, ale nie dłużej niż 5 min.
- 3) Przed wykonaniem zawiesiny bakteryjnej, przygotuj 2% roztwór niskotopliwej agarozu w buforze CSB lub ddH $_2$ O, wymieszaj roztwór agarozu z 10% roztworem SDS, tak aby końcowe stężenie SDS wynosiło 1%, raz rozpuszczoną agarozę trzymaj w łaźni wodnej w temp. 50-60 $^{\circ}$ C aż do użycia.
- 4) W jednym czasie wykonuj 1 bloczek (aby uniknąć kontaminacji). Wymieszaj 165  $\mu$ l roztworu agarozu/SDS i 135  $\mu$ l zawiesiny komórek bakteryjnych, delikatnie rozpipetuj i jak najszybciej przenieś ok. 200  $\mu$ l mieszaniny do wyjałowionej formy do bloczków. Formę umieść w temp. 4 $^{\circ}$ C, aż do stężenia – ok. 20 min.
- 5) W celu lizy komórek bakteryjnych zatopionych w bloczkach agarozowych należy zastygnięte bloczki przenieść do jałowych próbek, dodać po 2 – 3 ml buforu CSL-1 (tak aby całkowicie zakryć bloczek) i umieścić w łaźni wodnej

- w temp. 37°C na 2 godz. Następnie należy ponownie przełożyć bloczki do jałowych probówek i dodać po 2 – 3 ml buforu CSL-2 i wstawić do łaźni wodnej o temp. 55 °C na całą noc.
- 6) Następnego dnia przełóż bloczki do jałowych probówek i płucz 3 razy 4 ml ddH<sub>2</sub>O (30min.;50°C) a potem 3 razy 4 ml buforu TE (30min.;50°C). Tak przygotowane bloczki, zalane 3 ml buforu TE, można przechowywać w temp. 4°C przez 4 tygodnie.
- Trawienie restrykcyjne DNA zatopionego w bloczkach
- 7) Wcześniej przygotowane bloczki tniemy na 6 części, jedną z nich przenosimy do probówki Eppendorfa o poj.1,5 ml i zalewamy 200 µl buforu restrykcyjnego zawierającego albuminę bydlęcą w ilości 100 µg/ml i inkubujemy w 37°C w łaźni wodnej przez 10 min. Następnie odciągamy bufor i dodajemy 200µl świeżego buforu restrykcyjnego, zawierającego enzym restrykcyjny rzadko tnący *ApaI* w ilości 30 U/bloczek , inkubujemy w temp. 30°C w łaźni wodnej przez 2 godz.
- Przygotowanie żelu agarozowego
- 8) Przygotuj 110 ml 1% roztworu wysokotopliwej agarozы w buforze boranowym (0.5x TBE) i pozostaw w łaźni wodnej w temp. 50°C do czasu wylania żelu.
  - 9) Potrawione bloczki agarozowe wyjąć z buforu i umieścić na zębach grzebienia elektroforetycznego, nadmiar buforu usunąć za pomocą bibuły. Odczekać 5 min. aż bloczki przykleją się do grzebienia, po czym umieścić grzebień w formie do żelu i powoli wylać 100 ml roztworu agarozы, tak aby nie powstały bąbelki. Delikatnie usunąć grzebień po ok. 30 min. a powstałe otwory zalać pozostałą częścią roztworu agarozы.
  - 10) Do przygotowania każdego żelu użyj DNA szczepu wzorcowego *A.baumannii* zatopionego w bloczkach i trawionego enzymem *ApaI*, a także wzorców masowych.
- Elektroforeza
- 11) Przełóż ostrożnie tak przygotowany żel agarozowy do komory elektroforetycznej i wlej powoli 2000 ml buforu 0,5xTBE, tak aby żel był całkowicie pokryty.
  - 12) Ustaw parametry rozdziału i rozpocznij elektroforezę
    - czas – 22 godz.
    - napięcie – 200V
    - czas trwania impulsów – initial 5 sec/final 30 sec
    - temperatura – 14°C
  - 13) Po zakończeniu, w celu wybarwienia, umieść rozwinięty żel na 20 min. w pojemniku z roztworem bromku etydyny o stężeniu 5µg/ml, a potem oglądaj i wykonaj fotografię po oświetleniu żelu światłem UV.

## WYNIKI

Wykonano badania epidemiologiczne w kierunku wykrywania *Acinetobacter baumannii* z próbek pobranych w różnych placówkach opieki zdrowotnej, próbek środowiskowych otrzymanych z terenu misji wojskowych oraz z próbek pobranych z okrętów podwodnych (miejsca długotrwałego przebywania żołnierzy).

Badane próbki były wysiewane w kilku rozcieńczeniach na podłoże LAM (Leeds *Acinetobacter* Medium), które jest podłożem wybiórczo-różnicującym. Kolonie *Acinetobacter baumannii* na tym podłożu są okrągłe, różowe, wypukłe, gładkie o średnicy ok. 1-2 mm po 24 godz. inkubacji. Kolonie, które wyrosły na podłożu LAM i spełniały powyższe warunki, testowano dalej.

Wybrane izolaty badano na obecność oksydazy cytochromowej przy użyciu barwnego testu paskowego. Oksydaza cytochromowa jest enzymem należącym do porfiryn żelazowych, który utlenia zredukowany cytochrom c, przechodząc przy tym w zredukowaną nieaktywną postać.

Ulega ponownej aktywacji poprzez transport elektronów do tlenu cząsteczkowego. Układ oksydaza cytochromowa - cytochrom c w obecności tlenu cząsteczkowego może transportować elektrony z wielu związków organicznych. Izolaty, które dawały wynik negatywny na obecność oksydazy cytochromowej (brak zabarwienia), posiewano na agar testujący obecność DNazy.

Kolonie wytwarzające DNazę hydrolizują kwas dezoksyrybonukleinowy w bezpośrednim sąsiedztwie ich środowiska hodowlanego. Test wywołymano przy użyciu kwasu solnego, wtedy to następowała precypitacja DNA i obserwowano pojawianie się strefy przejaśnienia wokół posiewu.

Gdy wynik okazywał się ujemny, izolat poddawano ostatniemu testowi na zdolność do utleniania i fermentacji. Posłużono się w tym celu podłożem Hugh-Leifson'a, z dodatkiem odpowiednich cukrów, odpowiednio: glukozy, laktozy i ksylozy.

Bakterie *Acinetobacter baumannii* są zdolne do tlenowego rozkładu tych cukrów, ale nie potrafią ich fermentować, gdyż są bezwzględnie tlenowcami. Uzyskanie wyników testów biochemicznych opisanych powyżej pozwoliło na wstępne stwierdzenie przynależności odpowiednich izolatów do gatunku *Acinetobacter baumannii*.

Równocześnie przeprowadzono badanie metodą *real-time* PCR, przy użyciu trzech przetestowanych wcześniej par oligonukleotydów i sond, pozwalających wykryć obecność materiału genetycznego *Acinetobacter baumannii*.

Otrzymane wyniki porównywano z oznaczeniami fenotypowo-biochemicznymi badanymi próbek środowiskowych. Gdy wykonane badania były zgodne, przeprowadzono testowanie otrzymanych izolatów za pomocą posiewu na płytce GEN III firmy BIOLOG, które pozwalają na procentową identyfikację wytypowanego mikroorganizmu.

Również w celu potwierdzenia otrzymanych wyników oczyszczano materiał genetyczny badanych izolatów, a następnie przeprowadzano PCR odcinków recA i 16SrDNA i porównywano za pomocą elektroforezy otrzymany wynik z mikroorganizmem modelowym, którym w naszych badaniach jest *Acinetobacter baumannii* ATCC17978.

### **WYNIKI ZBIORCZE BADAŃ REAL-TIME PCR W KIERUNKU ACINETOBACTER BAUMANNII**

---

#### **Próbki środowiskowe z terenu misji wojskowej I – 2009**

---

84 pobrane próbki środowiskowe; uzyskano 8 izolatów *A.baumannii* potwierdzonych badaniami fenotypowymi, PCR odcinków 16S i recA oraz sekwencjonowaniem odcinka 16S

---

#### **Próbki z placówki opieki zdrowotnej I – 2010**

---

30 pobranych próbek ; *real-time* PCR S1 i S10 3 próbki dodatnie ; te same próbki potwierdzone przez badania fenotypowe , PCR 16S i rec A oraz sekwencjonowanie

---

#### **Próbki z placówki opieki zdrowotnej II – 2011**

---

26 miejsc pobrania próbek x 2 = 52 próbki ; z 7 miejsc *real-time* PCR S1 i S10 dodatni ; izolaty potwierdzające badanie *real-time* PCR udało się uzyskać z 1 miejsca pobrania

---

#### **Próbki z placówki opieki zdrowotnej III – 2011**

---

20 pobranych próbek ; *real-time* PCR S1 i S10 6 próbek dodatnich ; te same próbki potwierdzone przez badania fenotypowe , PCR 16S i rec A

---

#### **Próbki środowiskowe z okrętów – 2011**

---

20 pobranych próbek ; *real-time* PCR S1 i S10 wszystkie próbki ujemne

---

#### **Próbki z placówki opieki zdrowotnej IV – 2011**

---

20 pobranych próbek ; *real-time* PCR S1, S10, S3 6 próbek dodatnich; tylko z 2 próbek uzyskaliśmy izolaty, które zostały potwierdzone przez badania fenotypowe , PCR 16S i rec A

84 pobrane próbki środowiskowe; uzyskano 8 izolatów *A.baumannii* potwierdzonych badaniami fenotypowymi, PCR odcinków 16S i recA oraz sekwencjonowaniem odcinka 16S

---

#### **Próbki z placówki opieki zdrowotnej I – 2010**

---

30 pobranych próbek ; *real-time* PCR S1 i S10 3 próbki dodatnie; te same próbki potwierdzone przez badania fenotypowe , PCR 16S i rec A oraz sekwencjonowanie

---

#### **Próbki z placówki opieki zdrowotnej II – 2011**

---

26 miejsc pobrania próbek x 2 = 52 próbki ; z 7 miejsc *real-time* PCR S1 i S10 dodatni; izolaty potwierdzające badanie *real-time* PCR udało się uzyskać z 1 miejsca pobrania

---

#### **Próbki z placówki opieki zdrowotnej III – 2011**

---

20 pobranych próbek ; *real-time* PCR S1 i S10 6 próbek dodatnich; te same próbki potwierdzone przez badania fenotypowe , PCR 16S i rec A

---

#### **Próbki środowiskowe z okrętów – 2011**

---

20 pobranych próbek ; *real-time* PCR S1 i S10 wszystkie próbki ujemne

---

#### **Próbki z placówki opieki zdrowotnej IV – 2011**

---

20 pobranych próbek ; *real-time* PCR S1, S10, S3 6 próbek dodatnich; tylko z 2 próbek uzyskaliśmy izolaty, które zostały potwierdzone przez badania fenotypowe , PCR 16S i rec A

84 pobrane próbki środowiskowe; uzyskano 8 izolatów *A.baumannii* potwierdzonych badaniami fenotypowymi, PCR odcinków 16S i recA oraz sekwencjonowaniem odcinka 16S

---

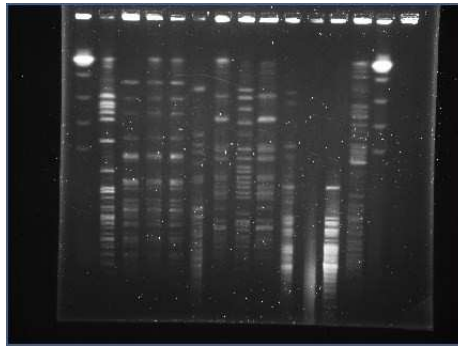


Przebadaliśmy blisko 500 próbek z różnych środowisk, nie wszystkie wyniki dodatnie w badaniu *real-time* PCR udało się nam potwierdzić uzyskaniem izolatu z badanej próbki, co utwierdza nas w przekonaniu, iż nie jest to łatwy do zdiagnozowania metodami klasycznymi gatunek bakterii.

#### Badania PFGE - wyniki

W pierwszym etapie badań zmodyfikowano protokół PFGE dla *Acinetobacter baumannii*.

Następnie przeprowadzono rozdział elektroforetyczny potrawionych materiałów genetycznych pochodzących z obiektów opieki zdrowotnej i środowiskowych. Wyniki tych badań potwierdziły domniemanie, iż trzy próbki z jednego z obiektów opieki zdrowotnej S12, S13 i S14 są izolatami blisko spokrewnionymi.



Rys. 4. Izolaty *Acinetobacter baumannii* próbki szpitalne S12, S13, S14 i inne izolaty środowiskowe.

#### BIBLIOGRAFIA

- Krawczyk B: Diagnostyka molekularna w zakażeniach szpitalnych. *Post.Mikrobiol.* 2007, No 46, 367-378
- Maragakis L, Perl T: *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance and Treatment Options. *Clin. Infect. Dis.* 2008, No 46, 1254-1263, doi: 10.1086/529198
- Meijie J, Zhijun Z, Shuping Z: Epidemiological Characteristics and Drug Resistance Analysis of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in China Hospital at Certain Time Polish Journal of Microbiology, 2014, Vol.63, No 3
- Jawad A, Seifert H, Snelling A.M, Heritage J, Hawkey P.M: Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1998, July, 1938-1941
- Zmudziński M, Gospodarek E, Gierlotka K: Mechanizmy oporności pętelczek *Acinetobacter spp.* na antybiotyki nie  $\beta$ -laktamowe. *Post. Mikrobiol.* 2007, No 46, 335-342
- Zapor M.J, Moran K.A: Infectious diseases during war time. Current opinion in Infectious Diseases, 2005, No18, 395-399
- Peleg A, Seifert H, Paterson D: *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008, Jul, 538-582, doi: 10.1128/CMR.00058-07
- Falagas M.E, Karveli E.A, Siempos I.I, Vardakas K.Z: *Acinetobacter* infections: a growing threat for critically ill patients. *Epidemiol. Infect.* 2008, No136,1009-1019
- Wendt C, Dietze B, Dietz E, Rüdén H: Survival of *Acinetobacter baumannii* on Dry Surfaces. *J. Clin. Microbiol.* 1997 June, 1394-1397
- Villgas M.V, Hartstein A.I: *Acinetobacter* outbreaks. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2003, No 24, 284-295
- Murray C.K, Roop S.A, Hospenthal D.R: Bacteriology of war wounds at the time of injury. *Mil. Med.* 2006, No 171,821-825
- Griffith M.E, Ceremuga J.M, Ellis M.W, Guymon C.H, Hospenthal D.R, Murray C.K: *Acinetobacter* skin colonization of US army soldiers. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2006, No 27, 659-661
- Griffith M.E, Lazarus D.R, Mann P.B, Boger J.A, Hospenthal D.R, Murray C.K: *Acinetobacter* skin carriage among US army soldiers deployed in Iraq. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2007, No 28, 720-722
- Kur J, Krawczyk B: Comparison of DNA-based typing methods of microbial organisms for epidemiological studies. *Adv. Agric. Sci.* 2002, No 8, 7-20
- Seifert H, Schulze A, Bagiński R, Pulverer G: Comparison of Four Different Methods for Epidemiologic Typing of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 1994, July, 1816-1819
- Riley L.W: *Molecular Epidemiology of Infectious Diseases.* ASM Press 2004
- Clifford R.J, Milillo M, Prestwood J, Quintero R, Zurawski D.V, Kwak Y.I, Waterman P.E, Lesho E.P, McGann P: Detection of Bacterial 16S rRNA and Identification of Four Clinically Important Bacteria by Real-Time PCR. *PLOS ONE* 2012, November, Vol.7 Iss.11, doi: 10.1371/journal.pone.0048558
- Martin-Pena R, Dominguez-Herrera J, Pachon J, McConnell M.J: Rapid detection of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* using quantitative real-time PCR. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013, February 23
- Scheinert P, Krause R, Ullmann U: Molecular differentiation of bacteria by PCR amplification of the 16S- 23S rRNA spacer. *J. Microbiol. Meth.* 1996, No 26, 103-117
- Krawczyk B, Lewandowski K, Kur J: Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the *recA* sequences. *Mol. Cell Probes*, 2002, No16, 1-11
- Krawczyk B, Kur J: Molecular diagnostic in microbiology. *Publ. Polit. Gd.* 2008
- Mackay I.M: Real-Time PCR in Microbiology, from Diagnosis to Characterization. *Caister Academic Press* 2007
- McConnell M.J, Perez-Ordóñez A, Perez-Romero P, Valencia R, Lepe J.A, Vazquez-Barba I, Pachon J: Quantitative Real-Time PCR for Detection of *Acinetobacter baumannii* Colonization in the Hospital Environment. *J. Clin. Microbiol.* 2012, February, 1412-1414, doi: 10.1128/JCM.06566-11
- Jawad A, Hawkey P.M, Heritage J, 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, Oct, p. 2353-2358
- Bannerman *et al.*: PFGE Typing Protocol Recommended by ARPAC for *Acinetobacter baumannii*, *J. Clin. Microbiol.* 1995, No 33, 551-555
- Durmaz R, Otlu B, Koksall F, Hosoglu S, Ozturk R; The Optimization of a Rapid Pulsed Field Gel Electrophoresis Protocol for the Typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* *Jpn. J. Infect. Dis.* 2009, No 62,372-377

**mgr biol. Małgorzata Dąbrowiecka**  
Zakład Medycyny Morskiej  
i Hiperbarycznej  
Wojskowy Instytut Medyczny  
ul. Grudzińskiego 4 81-103 Gdynia 3  
skr. poczt. 18  
tel. 58/6264109