

Záchyt plazmidy determinované rezistence ke kolistinu zprostředkované geny *mcr* v České republice

Detection of plasmid-determined colistin resistance mediated by mcr genes in the Czech Republic

Katarína Pomorská, Vladislav Jakubů, Markéta Zelendová, Monika Dolejská, Helena Žemličková

Souhrn • Summary

Od ledna 2018 probíhá v Národní referenční laboratoři pro antibiotika (NRL pro ATB) ve spolupráci s Veterinární a farmaceutickou univerzitou (VFU) Brno částečně retrospektivní studie zabývající se detekcí genů *mcr-1* až *mcr-5* u kmenů rezistentních ke kolistinu. Byly vyšetřeny kmeny z různých materiálů z období 2008 až do konce srpna 2018. U všech kmenů proběhla detekce rezistence ke kolistinu stanovením minimální inhibiční koncentrace (MIC) bujónovou mikrodiluční metodou. Kmeny rezistentní ke kolistinu byly pomocí multiplex PCR analyzovány na přítomnost genů *mcr*. Celkem bylo vyšetřeno 610 kmenů, z toho 8 (1,3 %) kmenů bylo pozitivních na *mcr-1* a 2 kmeny (0,3 %) byly pozitivní na *mcr-4*.

Since January 2018, a partially retrospective study focusing on the detection of the mcr-1 to mcr-5 genes in strains resistant to colistin has been conducted in the National Reference Laboratory for Antibiotics (NRL for ATB) in cooperation with the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno (VFU). Strains isolated from various materials from 2008 until the end of August 2018 were screened. In all strains, resistance to colistin was evaluated by determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) by the broth microdilution method. Colistin resistant strains were further screened for the presence of mcr genes using multiplex PCR. Of 610 strains analysed, eight (1.3 %) turned out positive for mcr-1 and two (0.3 %) for mcr-4.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2018; 27(9): 219–222

Klíčová slova: antibiotická rezistence, kolistin, *mcr* geny, *mcr-1*

Keywords: antibiotic resistance, colistin, *mcr* genes, *mcr-1*

Polypeptidová antibiotika (kolistin a polymyxin B) jsou antibiotika se spektrem účinku zacíleným na zástupce řádu *Enterobacteriales* a dále bakterie rodu *Pseudomonas* a *Acinetobacter*. Navzdory jejich nefro- a neurotoxicitě byla tato antibiotika, zejména pak kolistin, v posledních letech znovuzavedená do terapie infekcí způsobených multirezistentními bakteriemi [1, 2].

Kolistin se díky svému pozitivnímu náboji váže na lipopolysacharid (LPS) vnější membrány gramnegativních bakterií, který má záporný náboj. Po vazbě dochází k destabilizaci LPS, zvýšení permeability vnější membrány a následnému úniku cytoplazmatických tekutin z bakterie. Tento mechanismus účinku vede k buněčné smrti [2, 3].

Podobně jako u ostatních antibiotik byla po zavedení kolistinu a polymyxinu B do terapie zaznamenána získaná rezistence u přirozeně citlivých kmenů. Historicky byla rezistence kódována chromozomálně a měla tedy omezený epidemický potenciál. Nejčastějším mechanismem rezistence je alterace lipopolysacharidu, kdy dochází ke snížení záporného náboje, což znemožňuje navázání kolistinu [4]. Jde o kationovou substituci fosfátových skupin 4-amino-4-deoxy-L-arabinozou, adici fosfoetanolaminu, deacylaci, či hydroxylaci [4, 5]. Dalšími známými mechanismy rezistence je využívání efluxních pump a vytváření kapsuly [4, 6, 7].

Plazmidy kódovaný mechanismus rezistence ke kolistinu je spojen s přítomností genů *mcr* (modern / mobilized colistin resistance). Jejich integrace do chromozomů je reportována zcela výjimečně [8, 9]. Dosud bylo popsáno 8 různých variant *mcr* genů [10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17]. Geny *mcr-6* až *mcr-8* byly objeveny v průběhu této studie. Podle dostupných dat je zatím nejvíce rozšířený gen *mcr-1*. MCR-1 patří do skupiny fosfoetanolamin transferáz, které jsou zodpovědné za přidání fosfoetanolaminu na lipid A vnější membrány bakterií. LPS bakterií se pak stává více pozitivně nabitou molekulou, na kterou se pozitivně nabitý kolistin není schopen navázat [2]. Bylo dokázáno, že produkce MCR-1 u *Escherichia coli* (*E. coli*) vede k 4 až 8 násobně zvýšené MIC kolistinu [2].

Rezistence ke kolistinu, kódována genem *mcr-1* neseným plazmidy, byla u zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* poprvé detekována v Číně na podzim roku 2015 [10]. Objev plazmidy kódované rezistence ke kolistinu způsobil mezinárodní obavy, protože kolistin je často v humánní medicíně antibiotikem poslední volby pro léčbu pacientů s infekcemi způsobenými multirezistentními bakteriemi [2, 18]. Po prvním záchytu v Číně byla tato plazmidy kódovaná rezistence prokázána v dalších asijských zemích a postupně na všech světadílech [19, 20, 21, 22]. Vysoká prevalence genů *mcr* u veterinárních izolátů v Číně a zároveň vysoká spotřeba kolistinu u zvířat [23] ukazuje na možný zdroj plazmidy kódované rezistence právě z této země.

Díky následným studiím zaměřeným na hledání *mcr* genů v historických izolátech byl detekován první pozitivní záchyt *mcr-1* v 80. letech minulého století z kuřat (retrospektivní studie z Číny) [24]. Poté se izoláty s kolistino-

vou rezistencí zprostředkovanou plazmidy vyskytovaly sporadicky až do roku 2009, kdy byl retrospektivně zjištěn prudký nárůst *mcr-1* pozitivních izolátů [24]. Izoláty nesoucí gen *mcr-1* byly ve světě zachyceny nejen u zvířat a potravinářských produktů, ale od roku 2014 i u lidí [21, 22, 25]. Nanejvýš závažným zjištěním je, že *mcr-1* pozitivní kmeny byly izolovány u pacientů s infekcemi způsobenými multirezistentními bakteriemi produkujícími širokospektré β -laktamázy (ESBL) [21, 25, 26] nebo karbapenemázy [22, 27, 28].

Plazmidy kódované determinanty kolistinové rezistence představují závažné riziko pro nemocniční zařízení kvůli horizontálnímu a vertikálnímu šíření *mcr* genů mezi bakteriemi. Infekce způsobené multirezistentními bakteriemi, které získali *mcr* gen, vyžadují složitou léčbu a mohou být příčinou vyšší mortality [29]. French High Council for Public Health (HCSP) doporučuje rutinně testovat rezistenci ke kolistinu a následně přítomnost *mcr* u všech pacientů infikovaných, či kolonizovaných *Enterobacteriaceae* produkujícími karbapenemázy [30]. Doporučenou metodou testování citlivosti ke kolistinu je stanovení MIC pomocí bujonové mikrodiluční metody. E-test, disková difúzní, ani agarová diluční metoda nejsou pro testování vhodné, protože kolistin difunduje do agaru nerovnoměrně, což může zkreslovat výsledky [31]. Evropské centrum pro kontrolu a prevenci infekcí (ECDC) vydalo doporučení v oblasti surveillance a prevence šíření plazmidové kolistinové rezistence [29]. ECDC doporučuje sentinelové, prospektivní a retrospektivní molekulární studie na národní úrovni za účelem zjištění prevalence *mcr* pozitivních izolátů. V nemocnicích, ve kterých byl zaznamenán výskyt enterobakterií rezistentních ke karbapenemům, je doporučeno testování citlivosti ke kolistinu spolu s PCR detekcí *mcr* genů. ECDC i HCSP doporučují kontaktní izolaci (Věstník MZČR 2012, Částka 8, Článek 8: Postupy prevence infekcí a izolační režim [32]) v případě, že byly u pacientů prokázány enterobakterie nesoucí geny *mcr* a to bez ohledu na případné další mechanismy rezistence k ostatním antibiotikům (např. produkce širokospektrých β -laktamáz). Dále HCSP považuje za povinný rutinní screening kolistinové rezistence u pacientů, kteří jsou infikováni karbapenemáza pozitivními nebo jinými multirezistentními enterobakteriemi a přišli do kontaktu s *mcr* pozitivními pacienty, nebo byli ošetřováni stejným nemocničním personálem [30].

V NRL pro ATB bylo ve spolupráci s VFU Brno zahájeno testování kolistin rezistentních izolátů pocházejících z období 2008 – srpen 2018. Za uvedené období byly do NRL pro ATB zasílány invazivní kmeny v rámci surveillance EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) a multirezistentní kmeny izolované z různých klinických materiálů. Zároveň byly v roce 2018 laboratoře vyzvány, aby do NRL pro ATB zasílaly ke confirmaci enterobakterie a gramnegativní nefermentující bakterie rezistentní ke kolistinu. U všech zástupců řádu *Enterobacteriales*, rodů *Pseudomonas* a *Acinetobacter* byla stanovena MIC ke kolistinu bujonovou mikrodiluční metodou podle standardu ISO 20776-1 za použití breakpointů EUCAST (breakpoint pro rezistenci > 2 mg/l). Izoláty rezistentní ke kolistinu (rod *Citrobacter*, *Enterobacter*,

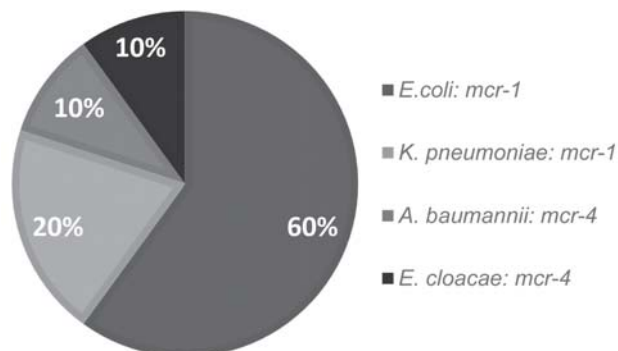
Escherichia, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*) byly dále vyšetřeny na přítomnost genů *mcr-1* až *mcr-5* metodou multiplex PCR. Přítomnost *mcr* genů (nebo jejich variant) byla reportována i u kmenů přirozeně rezistentních ke kolistinu [33], proto se v NRL pro ATB začaly vyšetřovat i tyto kmeny (ve studii ještě nejsou uvedeny). Za zkoumané období bylo celkově zachyceno 610 izolátů rezistentních ke kolistinu (MIC > 2 mg/l), z toho 8 izolátů (1,3 %) bylo pozitivních na *mcr-1* a 2 izoláty pozitivní na *mcr-4* (0,3 %). U všech izolátů byla MIC kolistinu \geq 8 mg/l (Tab. 1). Podíl jednotlivých *mcr* pozitivních druhů je na grafu 1. Nejvyšší záchyt byl v roce 2018, kdy bylo identifikováno 7 izolátů (4,4 %, n = 159) pozitivních na gen *mcr-1*. V roce 2017 byly identifikovány 2 izoláty (2,9 %, n = 69) nesoucí gen *mcr-1* (1 izolát) a *mcr-4* (1 izolát). V roce 2014 byl u 1 izolátu (1,9 %, n = 52) prokázán gen *mcr-4*.

Kmeny nesoucí gen zodpovědný za přenosnou rezistenci ke kolistinu byly rezistentní k některým dalším antibiotikům (Tab. 1). Dva kmeny byly pozitivní na β -laktamázu typu AmpC, jeden z nich navíc produkoval širokospektrou β -laktamázu, žádný kmen neprodukoval karbapenemázu. Izoláty nesoucí gen *mcr* pocházely z různých materiálů (Tab. 1) a byly izolovány od pacientů z různých lokalit České republiky, a to z Prahy (2 izoláty) a Moravskoslezského kraje (8 izolátů).

Ze studie prováděné v NRL pro ATB je zřejmé, že počet *mcr* pozitivních izolátů narůstá. Jako v ostatních státech, i v ČR patří *mcr* producenti zejména do druhu *E. coli* [23]. Je ale nutno poznamenat, že do NRL ATB jsou obecně zasílány zejména invazivní izoláty v rámci EARS-Net. Pro studii „Záchyt plazmidy determinované rezistence ke kolistinu zprostředkované geny *mcr* v České republice“ začaly být odesílány do NRL pro ATB všechny kolistin rezistentní izoláty i z neinvazivních vzorků až v roce 2018. To může mít za následek zkreslení výsledků retrospektivní části této studie.

Jelikož protiepidemiologická opatření u pacientů s kmeny pozitivními na *mcr* geny by měla být shodná s postupy u producentů karbapenemáz (doporučení ECDC [29] a HCSP [30]), bude NRL pro ATB testovat jejich přítomnost v co nejkratším možném čase a výsledek sdělí laboratoři elektronicky.

Graf 1: PODÍL JEDNOTLIVÝCH DRUHŮ POZITIVNÍCH NA GEN *MCR* ZA SLEDOVANÉ OBDOBÍ



Tabulka 1: IZOLÁTY REZISTENTNÍ KE KOLISTINU A POZITIVNÍ NA *MCR* GENY ZACHYCENÉ V NRL PRO ATB

rok	kmen	č. kmene	<i>mcr</i>	materiál	MIC kolistinu [mg/l]	korezistence**	pozn.***
2014	<i>Enterobacter cloacae</i>	26153	<i>mcr-4</i>	výtěr z rektu	>32	AMP, AMS, PPT, CTX, CTZ, CPM, MER	AmpC
2017	<i>Acinetobacter baumannii</i>	39741	<i>mcr-4</i>	tracheální aspirát	>16		
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40331	<i>mcr-1</i>	moč	>8		
2018	<i>Escherichia coli</i>	42906	<i>mcr-1</i>	moč	8	AMP, AMS, TRI, SXT, CIP	
		42913	<i>mcr-1</i>	výtěr z rektu	>8	AMP, AMS, PPT, CTX, CTZ, CPM, CTT, TRI, SXT, CIP, GEN, TOB	AmpC, ESBL
		43934	<i>mcr-1</i>	krk výtěr	8	AMP, AMS	
		44158	<i>mcr-1</i>	stěr LDK* defekt	8	AMP, AMS, CIP	
		44653	<i>mcr-1</i>	moč	8	AMP, AMS, TRI, SXT, CIP	
	45082	<i>mcr-1</i>	krev	8	AMP, AMS, TRI, SXT, CIP		
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	46049	<i>mcr-1</i>	hnis	>8	TRI, SXT, CIP	

* levá dolní končetina

**AMP - ampicilin, AMS - ampicilin/sulbaktam, CIP - ciprofloxacin, SXT - trimetoprim/sulfametoxazol, CPM - cefepim, CTT - ceftozolan/tazobaktam, CTX - cefotaxim, CTZ - ceftazidim, GEN - gentamicin, MER - meropenem, PPT - piperacilin/tazobaktam, TOB - tobramycin, TRI - trimetoprim

***AmpC - β -laktamáza typu AmpC, ESBL - širokospektrá β -laktamáza

Děkujeme spolupracujícím laboratořím zapojeným do PSMR (Pracovní skupina pro monitorování rezistence) za dlouhodobou spolupráci a zaslání kmenů pro účely této studie. Studie byla částečně podpořena projektem NV18-09-00605 „*Enterobacteriaceae* rezistentní ke karbapenémům a kolistinu: koncept jednoho zdraví v hodnocení humánních a jiných zdrojů rizikových mechanismů antimikrobiální rezistence“ Ministerstva zdravotnictví České republiky.

LITERATURA

- [1] Falagas M E, Kasiakou S K, Saravolatz L D. Colistin. The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clin Infect Dis* (2005); 40: 1333–134.
- [2] Poirel L, Jayol A, Nordmann, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev* (2017); 30: 557–596.
- [3] Dixon R A, Chopra I. Leakage of periplasmic proteins from *Escherichia coli* mediated by polymyxin B nonapeptide. *Antimicrob Agents Ch* (1986); 29: 781–788.
- [4] Olaitan A O, Morand S, Rolain J M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol* (2014); 5: 643.
- [5] Raetz C R H, Reynolds C M, Trent M S, Bishop R E. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem* (2007); 76: 295–329.
- [6] Campos M A, et al. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* (2004); 72: 7107–7114.
- [7] Padilla E, et al. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Ch* (2010); 54: 177–183.
- [8] Snesrud E, et al. Chromosomally Encoded *mcr-5* in Colistin-Nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Ch* (2018); 62(8): e00679-18.
- [9] Zurfluh K, et al. Draft Genome Sequence of *Escherichia coli* S51, a Chicken Isolate Harboring a Chromosomally Encoded *mcr-1* Gene. *Genome Announc* (2016); 4(4): e00796-16.
- [10] Liu Y-Y, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* (2016); 16: 161–168.
- [11] Xavier B B, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Eurosurveillance* (2016); 21: 30280.
- [12] Yin W, et al. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio* (2017); 8(3): e00543-17.
- [13] Carattoli A, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance* (2017); 22: 30589.
- [14] Borowiak M, et al. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J. Antimicrob Chemother* (2017); 72: 3317–3324.
- [15] AbuOun M, et al. *mcr-1* and *mcr-2* (*mcr-6.1*) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *J Antimicrob Chemother* (2017); 72: 2745–2749.
- [16] Yang Y-Q, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* (2018); 73: 1791–1795.
- [17] Wang X, et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infec* (2018); 7(1):122.

- [18] WHO. WHO list of critically important antimicrobials (WHO CIA list). *WHO*, (2017).
- [19] Olaitan A O, *et al.* Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* (2016); 16: 147.
- [20] Zurfluh K, *et al.* Occurrence of the Plasmid-Borne *mcr-1* Colistin Resistance Gene in Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in River Water and Imported Vegetable Samples in Switzerland. *Antimicrob Agents Ch* (2016); 60: 2594–2595.
- [21] Torpdahl M, *et al.* Detection of *mcr-1*-encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Salmonella* isolates from human infection in Denmark. *Int J Antimicrob Ag* (2017); 49: 261–262.
- [22] Mulvey M R, *et al.* Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* (2016); 16: 289–290.
- [23] Poirel L, Nordmann P. Emerging plasmid-encoded colistin resistance: the animal world as the culprit? *J Antimicrob Chemother* (2016); 71: 2326–2327.
- [24] Shen Z, *et al.* Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *Lancet Infect Dis* (2016); 16: 293.
- [25] Arcilla M S, *et al.* Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* (2016); 16: 147–149.
- [26] Hasman H, *et al.* Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Eurosurveillance* (2015); 20: 30085.
- [27] Falgenhauer L, *et al.* Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. *Lancet Infect Dis* (2016); 16: 282–283.
- [28] Poirel L, *et al.* Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Lancet Infect Dis* (2016); 16: 281.
- [29] European Centre for Disease Prevention and Control. Plasmid-mediated colistin resistance in *Enterobacteriaceae* - [13 June 2016], Stockholm (2016).
- [30] Lepelletier D, *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1*) among *Enterobacteriaceae* strains: Laboratory detection of resistance and measures to control its dissemination. *Med Maladies Infect* (2018); 48: 250–255.
- [31] Rebelo A R, *et al.* Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Eurosurveillance* (2018); 23(6): 17-00672.
- [32] Ministerstvo zdravotnictví České republiky. Věstník č. 8/2012. (2012). Dostupné z: http://www.mzcr.cz/legislativa/dokumenty/vestnik-c8/2012_6865_2510_11.html.
- [33] Wang X, *et al.* Presence of an *mcr-3* Variant in *Aeromonas caviae*, *Proteus mirabilis*, and *Escherichia coli* from One Domestic Duck. *Antimicrob Agents Ch* (2018); 62:e02106-17.

Mgr. Katarína Pomorská
NRL pro ATB, CEM-SZÚ

Mgr. Vladislav Jakubů
NRL pro ATB, CEM-SZÚ

Doc. MUDr. Helena Žemličková, Ph.D.
NRL pro ATB, CEM-SZÚ
Oddělení klinické mikrobiologie,
Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice,
Univerzita Karlova, Hradec Králové

Doc. RNDr. Monika Dolejská, Ph.D.
Středoevropský technologický institut
(CEITEC), Veterinární a farmaceutická
univerzita, Brno

Mgr. Markéta Zelendová
Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat,
Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno