

## První záchyt kmenů *Pseudomonas aeruginosa* produkujících metallo- $\beta$ -laktamázu v České republice

### *First detection of metallo-beta-lactamase-producing strains of Pseudomonas aeruginosa in the Czech Republic*

Helena Žemličková, Jaroslav Hrabák, Marta Fridrichová, Marta Štolbová, Pavla Urbášková

#### Souhrn • Summary

Metallo- $\beta$ -laktamázy jsou enzymy schopné hydrolyzovat  $\beta$ -laktamová antibiotika, včetně karbapenemů. Tento typ získané rezistence je velice závažný z klinického i epidemiologického hlediska. Článek uvádí informace o prvním záchytu kmenů *Pseudomonas aeruginosa* produkujících metallo- $\beta$ -laktamázu typu IMP-7 v souboru invazivních izolátů vyšetřovaných v rámci evropské surveillace antibiotické rezistence – EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System).

*Metallo-beta-lactamases are enzymes able to hydrolyze beta-lactam antibiotics, including carbapenems. This type of acquired antibiotic resistance is of considerable clinical and epidemiological concern. The first report of IMP-7 metallo-beta-lactamase-producing strains of Pseudomonas aeruginosa is presented. They were detected among isolates from invasive infections collected in the Czech Republic within the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS).*

Zprávy EM (SZÚ, Praha) 2009; 18(1): 22–24.

Karbapenemy označují skupinu antibiotik (imipenem, meropenem, ertapenem), které patří mezi léky volby pro terapii závažných infekcí způsobených multirezistentními gramnegativními bakteriemi. Rezistence k těmto rezervním antibiotikům je závažná, neboť značně limituje terapeutické možnosti. U gramnegativních bakterií se uplatňují dva základní mechanismy rezistence k této skupině antibiotik – enzymatická hydrolýza molekuly karbapenemu  $\beta$ -laktamázy a snížení permeability vnější buněčné stěny změnou exprese membránových porinů. Zatímco takto vzniklá rezistence bývá obvykle jen dočasná (po vysazení antibiotika je obvykle rezistentní subpopulace nahrazena citlivou), rezistence způsobená produkcí specifických  $\beta$ -laktamáz je z epidemiologického hlediska velice závažná, neboť geny těchto enzymů jsou obvykle lokalizované na mobilních genetických elementech, což přispívá ke snadnému horizontálnímu přenosu tohoto typu rezistence.

Metallo- $\beta$ -laktamázy (MBL) patří do skupiny karbapenemáz a jsou inherentně přítomné v genomu některých bakterií, jako je tomu např. u *Stenotrophomonas maltophilia* a *Aeromonas hydrophila*. První získaná MBL byla detekována u kmene *Serratia marcescens* v Japonsku v roce 1991 [1]. Ačkoliv výskyt těchto enzymů je v současnosti nejfrekvencovanější u pseudomonád a acinetobakterů, nárůst rezistence ke karbapenemům u kmenů enterobakterií v důsledku produkce MBL začíná být stále významnější.

Standardním vyšetřením citlivosti nelze produkci MBL odlišit od rezistence ke karbapenemům způsobené snížením permeability buněčné stěny. Ke zjištění produkce tohoto enzymu je tedy zapotřebí použít doplňkové testy, které jsou založeny na schopnosti některých látek, především chelátorů dvojmocných kationtů, tyto enzymy

inhibovat. Metodika pro rutinní detekci MBL včetně selekčních kritérií pro výběr kmenů k testování byla publikována ve Zprávách CEM [2].

NRL pro antibiotika Státního zdravotního ústavu Praha (NRL/ATB) shromažďuje údaje o antibiotické rezistenci u hlavních původců invazivních infekcí v České republice. Mezi druhy sledovanými v rámci evropské surveillace EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) jsou také invazivní kmeny *P. aeruginosa*. V průběhu roku 2008 bylo do NRL/ATB v rámci EARSS surveillace zasláno celkem 448 kmenů *P. aeruginosa* izolovaných z krve, či likvoru. U všech kmenů byla pomocí standardní bujónové mikrodiluční metody vyšetřena minimální inhibiční koncentrace (MIC) 12 antibiotik, včetně zástupce karbapenemů – meropenemu. U kmenů s hodnotou MIC meropenemu  $\geq 4$  mg/l (n = 162, tj. 35,9 %) byla produkce MBL vyšetřena standardním diskovým testem synergie indikátorových  $\beta$ -laktamů – imipenemu, meropenemu a ceftazidimu, s inhibitorem – ethylendiamintetraoctovou kyselinou (EDTA), obr. 1.

Čtyři kmeny (tj. 1,1 % ze všech 448 vyšetřených invazivních kmenů) vytvářely charakteristický fenotyp producenta MBL. První dva MBL-produkující izoláty byly získány od dvou pacientů hospitalizovaných s měsíčním časovým odstupem na stejném oddělení Masarykovy nemocnice Ústí nad Labem. Následné dva izoláty byly zjištěny ve dvou pražských nemocnicích. Dodatečným epidemiologickým šetřením byly získány další dva MBL-produkující kmeny pocházející z hnisu a sekretu z dýchacích cest od dalších pacientů hospitalizovaných na stejných odděleních nemocnic v Ústí nad Labem a Praze.

Produkce MBL byla u izolátů ověřena spektrofotometrickou metodou [3]. Pomocí multiplex PCR [4] byla

**Obrázek 1: Producent MBL.**

Inhibiční zóny ceftazidimu a imipenemu jsou deformovány směrem ke středovému disku s EDTA.



foto: Vladislav Jakubů

MBL následně zařazena do skupiny IMP. Celý gen *bla*<sub>IMP</sub> byl amplifikován sadou specifických primerů a sekvenován [5]. U všech izolátů byla prokázána neobvyklá MBL – IMP-7. Přítomnost genu *bla*<sub>IMP-7</sub> spolu s dalšími geny rezistence (např. *aac(6′)-Ib* – aminoglykosidová acetyltransferáza) na integronu třídy 1 byla potvrzena PCR a sekvenací s interními primery pro *bla*<sub>IMP-7</sub> a primery specifickými pro 5′ CS a 3′ CS části integronu (konservativní sekvence) [5]. V současnosti je prováděna další molekulárně-epidemiologická charakterizace kmenů.

MBL typu IMP-7 byla poprvé nalezena v Kanadě u izolátů ze dvou rehabilitačních center v letech 1995–1996 [6]. Následně byla identifikována v Malajsii [7], v roce 2007 v Japonsku [8] a na Slovensku [9]. Vždy se jednalo o kmeny *P. aeruginosa*.

Pokud je tento enzym exprimován laboratorním kmenem *E. coli*, způsobuje vysoký stupeň rezistence k ceftazidimu, sníženou citlivost k piperacilinu a cefalosporinům IV. generace. Citlivost ke karbapenemům obvykle zůstává zachována, případně pouze drobně změněna [6]. Klinické izoláty jsou však obvykle vysoce rezistentní ke všem β-laktamům, včetně karbapenemů. To ukazuje na zvláštní chování této β-laktamázy, jejíž aktivita je pravděpodobně potencována i snížením permeability vnější buněčné stěny pseudomonád.

Lokalizace genu *bla*<sub>IMP-7</sub> na integronu třídy 1 spolu s dalšími geny rezistence (např. *aac(6′)-Ib*) upozorňuje na možnou ko-selekcí rezistentních kmenů při používání i ostatních skupin antibiotik (nejen β-laktamů), např. aminoglykosidů. Proto je šíření takových kmenů vysoce závažný problém z epidemiologického, i klinického hlediska. Při výskytu těchto kmenů v nemocničních zařízeních by měla být uplatňována stejná hygienická opatření, jako v případě výskytu meticilin-rezistentních *Staphylococcus aureus* [10].

U pseudomonád izolovaných v ČR dosud nebyl popsán výskyt enzymatické rezistence ke karbapenemům.

I v ostatních sousedních zemích je výskyt rezistence ke karbapenemům, jehož příčinou je produkce MBL, doposud relativně nízký. Přesto v některých státech, např. v Řecku, je prevalence karbapenem rezistentních kmenů pseudomonád i enterobakterií vysoká a jejich procentuální podíl stále narůstá (viz data EARSS – <http://www.rivm.nl/earss>). S ohledem na charakter šíření enzymatického typu rezistence a zásadně nepříznivým dopadem na účinnou antibiotickou léčbu, je zjištění výskytu MBL producentů u kmenů *P. aeruginosa* v České republice velmi znepokojivým faktem. Úkolem mikrobiologů a nemocničních epidemiologů by měla být nejen včasná diagnostika tohoto typu rezistence, ale i zavedení efektivních preventivních opatření, které umožní kontrolu šíření těchto kmenů.

Molekulární typizace producentů MBL byla podpořena grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy č. MŠM 2E08003. Za dlouhodobou a excelentní spolupráci děkujeme všem účastníkům CZ-EARSS.

**Účastníci CZ-EARSS v roce 2008**

N. Bartoníková, Zlín; M. Bárťová, Praha; E. Bendová, Praha; T. Bergerová, Plzeň; Z. Bohunová, Liberec; V. Buchta, Hradec Králové; E. Čápková, Tábor; M. Dovalová, Opava; M. Glasnák, Benešov; M. Hanslianová, Brno-Bohunice; V. Hásková, Hořovice; B. Heinigeová, Jindřichův Hradec; M. Horníková, České Budějovice; B. Horová, Praha; E. Chmelařová, Ostrava; J. Janečková, Litomyšl; A. Jedličková, Praha; P. Ježek, Příbram; V. Jindrák, Praha; R. Jirsa, Mladá Boleslav; M. Kolář, Olomouc; P. Linhart, Havlíčkův Brod; M. Machučová, Nový Jičín; D. Malotová, Šternberk; J. Miklová, Uherské Hradiště; M. Mlynaříková, Most; H. Nedvěďová, Klatovy; J. Niemczykova, Havířov; O. Nýč, Praha; V. Petkov, Praha; Z. Pokorná, Brno; J. Pomykal, Kolín; B. Puchálková, Karlovy Vary; M. Rumlerová, Kladno; A. Sekáčová, Vsetín; J. Scharfen, Trutnov; H. Skačániová, Jihlava; E. Steinerová, Praha; E. Šimečková, Strakonice; E. Štátná, Přerov; M. Štolbová, Ústí nad Labem; R. Tejkalová, Brno; L. Trojan, Třebíč; E. Veselá, Náchod; E. Zálabská, Pardubice; D. Zamazalová, Nové Město na Moravě.

**LITERATURA**

- [1] Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankum R, et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo-β-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 71-78.
- [2] Hrabák J, Vaniš V, Bergerová T, et al. Průkaz metallo-β-laktamáz (MBL) u gramnegativních bakterií. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*, 2007; 16: 417-22.
- [3] Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, et al. Cloning and characterization of *bla*<sub>VIM</sub>, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1584-90.
- [4] Ellington M. J., Kistler J., Livermore D.M., Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-β-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007; 59: 321-322.
- [5] Fielt J, Baraniak A, Mrówka A, et al. Molecular epidemiology of acquired-metallo-β-lactamase-producing bacte-

- ria in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 880-86.
- [6] Gib AP, Trbuddharat C, Moore RA, et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*<sub>IMP</sub> allele, *bla*<sub>IMP-7</sub>. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 255-58.
- [7] Ho SE, Subramaniam G, Palasubramaniam S, Navaratnam P. Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Malaysia Producing IMP-7  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3286-87.
- [8] Kouda S, Kuwahara R, Ohara M, et al. First isolation of *bla*<sub>IMP-7</sub> in a *Pseudomonas aeruginosa* in Japan. *J Infect Chemother* 2007; 13: 276-77.
- [9] Ohlasova D, Kmet V, Niks M. First report of the carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-7 metallo-beta-lactamase in Slovakia. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30: 370-71.
- [10] Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, et al. Metallo- $\beta$ -

lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 380-88.

*Helena Žemličková*  
*Marta Fridrichová*  
*Pavla Urbášková*  
*Národní referenční laboratoř pro antibiotika*  
*SZÚ Praha*  
*e-mail: hzemlickova@szu.cz*

*Jaroslav Hrabák*  
*Ústav mikrobiologie*  
*LF UK a FN Plzeň*

*Marta Štolbová*  
*Oddělení klinické mikrobiologie*  
*Masarykovy nemocnice, Ústí n. Labem*