

Detekce širokospektrých β -laktamáz (ESBL), β -laktamáz AmpC, metalo- β -laktamáz (MBL) a karbapenemáz KPC u gramnegativních tyček

Detection of extended-spectrum β -lactamases, AmpC β -lactamases, metallo- β -lactamases and Klebsiella pneumoniae carbapenemases in Gram-negative rods

Jaroslav Hrabák, Tamara Bergerová, Helena Žemličková, Pavla Urbášková

Souhrn • Summary

Předkládaná metodika umožňuje rutinní identifikaci hlavních typů klinicky významných β -laktamáz – širokospektré β -laktamázy (ESBL), β -laktamázy AmpC a metalo- β -laktamázy (MBL). V metodice je rovněž uvedena možnost průkazu karbapenemáz skupiny 2f, které představují v některých státech významný klinický a epidemiologický problém.

Methodologies for the identification of clinically important β -lactamases – extended-spectrum β -lactamase (ESBL), AmpC β -lactamase (AmpC), and metallo- β -lactamase (MBL) are reviewed. The detection of 2f carbapenemases that are a significant clinical and epidemiological problem in some countries is described as well.

Zprávy EM (SZÚ, Praha) 2009; 18(3): 100–106.

Klíčová slova: širokospektrá β -laktamáza, metalo- β -laktamáza, *Klebsiella pneumoniae* karbapenemáza, enterobakterie

Keywords: *extended-spectrum β -lactamase*, *metallo- β -lactamase*, *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*, *enterobacteria*

1. Úvod

V současnosti dochází k významným změnám v epidemiologii producentů klinicky významných β -laktamáz, mezi něž lze řadit širokospektré β -laktamázy (ESBL), β -laktamázy typu AmpC, metalo- β -laktamázy, a v některých státech i serinové karbapenemázy skupiny 2f (klasifikace podle Bush et al. [3]) [7, 8, 10, 15]. V České republice lze každoročně pozorovat vzestup výskytu ESBL u *Escherichia coli* (nyní převážně klonální šíření producentů enzymů skupiny CTX-M), nárůstu kmenů *Klebsiella pneumoniae* produkujících ESBL a AmpC (DHA-1). V minulém roce byla poprvé zjištěna produkce metalo- β -laktamáz (IMP-7) u *Pseudomonas aeruginosa* [9] a *Serratia marcescens* (VIM) (nepublikovaná data). Pro zvýšení senzitivity a specifity již publikovaných testů lze doporučit uspořádání testů popsaných v tomto článku.

2. Definice

2.1. Širokospektré β -laktamázy

Obecně přijímaná definice ESBL zahrnuje řadu faktorů, které exaktně popisují biochemické vlastnosti těchto enzymů. Jedná se o β -laktamázy hydrolyzující peniciliny, cefalosporiny všech generací a monobaktamy. Jsou inhibovány inhibitory β -laktamáz (např. klavulanovou kyselinou), nehydrolyzují karbapenemy a obvykle ani cefamyciny (např. cefoxitin). Dle funkční klasifikace navržené K. Bush et al. spadají do skupiny 2be, část do skupiny 2d [2, 7].

2.2. β -laktamázy AmpC

β -laktamázy AmpC jsou enzymy spadající do skupiny 1 (klasifikace Bush et al. [2]), resp. skupiny C podle Amblera. Z funkčního hlediska hydrolyzují peniciliny, cefamyciny, většinu cefalosporinů a monobaktamy, nehydrolyzují karbapenemy a nejsou inhibovány inhibitory β -laktamáz (např. klavulanovou kyselinou) [8].

2.3. Metalo- β -laktamázy

Substrátová specifita MBL zahrnuje peniciliny, cefalosporiny a karbapenemy. Monobaktamy (aztreonam) nejsou MBL hydrolyzovány. Nejsou inhibovány kyselinou klavulanovou, tazobaktamem nebo sulbaktamem, čili inhibitory β -laktamáz s β -laktamovým kruhem. Donorem molekuly vody při hydrolyze amidové vazby β -laktamu je kovový iont (obvykle zinek) vázaný v aktivním místě enzymu. V Amblerově klasifikaci jsou MBL zařazeny do skupiny B, v klasifikaci navržené K. Bush et al. se nachází ve skupině 3 [2, 4, 10].

2.4. Ostatní

2.4.1. OXA

Zahrnují skupinu velmi heterogenních β -laktamáz náležejících do funkční skupiny 2d, resp. D podle Amblera. Všechny β -laktamázy skupiny OXA hydrolyzují oxacilin a nejsou (popř. velmi slabě) inhibovány inhibitory β -laktamáz. Substrátová specifita enzymů OXA je značně různorodá – od penicilinů až po karbapenemy [10].

2.4.2. K1

β -laktamáza označovaná jako K1 je základní inherentní β -laktamázou druhu *Klebsiella oxytoca*. Je slabě inhibovatelná kyselinou klavulanovou, proto může při DDST vytvářet typickou inhibiční zónu označovanou jako „egg-like“. Základním charakteristickým znakem je hydrolyza aztreonamu [11].

2.4.3. Karbapenemázy 2f

Jedná se o serinové karbapenemázy spadající do funkční skupiny 2f (část skupiny AmpA). Jsou velmi slabě inhibovány kyselinou klavulanovou. Stejně jako v případě AmpC, jsou tyto enzymy inhibovány kyselinou boritou. Některými autory jsou řazeny k ESBL, avšak tato klasifikace není optimální [11].

3. Mikrobiologická diagnostika β -laktamáz

Většina testů používaných v laboratořích klinické mikrobiologie je založena na fenotypových metodách přímo vycházejících ze zmíněných definic – substrátové specifity a citlivosti k inhibitorům. Využití molekulárně-genetických technik je omezené, neboť tyto metody nemají schopnost popisu stupně rezistence vyšetřovaného kmene.

Metody průkazu ESBL, AmpC a MBL byly popsány dříve [11, 12]. Doporučené rozložení disků je znázorněno na obrázcích 1, 2, a 3.

3.1. ESBL

Průkaz širokospektrých β -laktamáz využívá inhibici hydrolyzy antibiotika klavulanovou kyselinou. Pro vyhledávání podezřelých kmenů lze použít výsledky vyšetření citlivosti pomocí diskové difúzní metody (IZ), resp. hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) [11]. Produkce ESBL je potvrzena vyšetřením synergie mezi kyselinou klavulanovou a cefalosporiny třetí, resp. čtvrté generace (viz dříve publikovaná metodika [11]).

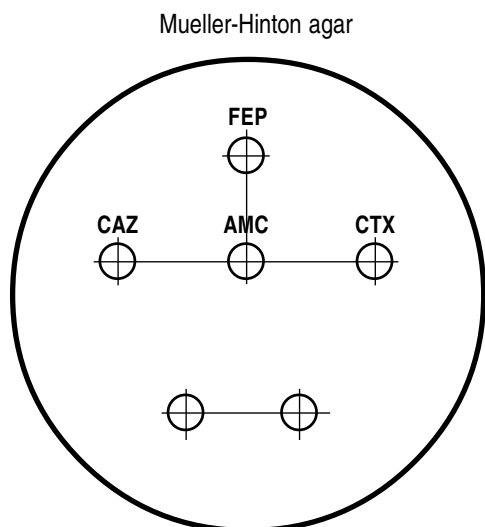
3.2. AmpC

Jako indikátorové antibiotikum může být použit cefoxitin. Toto antibiotikum velmi dobře hydrolyzuje většina AmpC β -laktamáz [8].

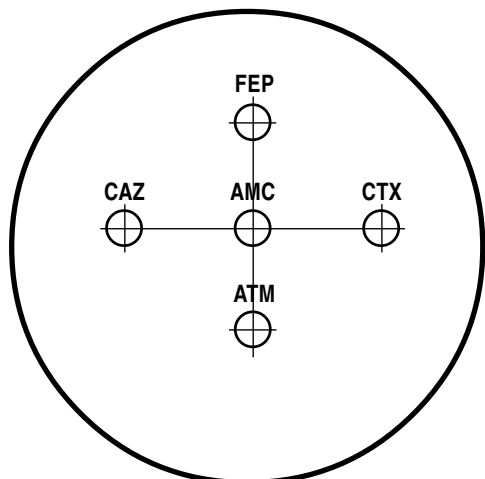
Inducibilní produkci AmpC lze prokázat jako antagonismus mezi diskem s induktorem a cefalosporiny třetí generace. Jako induktor lze použít kyselinu klavulanovou, cefoxitin, resp. imipenem (viz tabulka 1) [6, 8].

V případě konstitutivních producentů, resp. hyperproducentů je možné použít inhibitorů tak, jako při průkazu

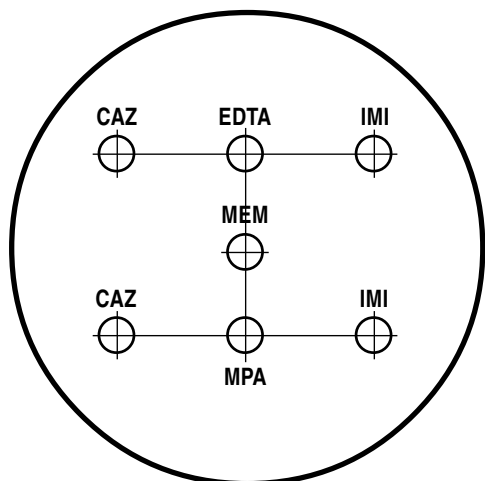
Obrázek 1: **DOPORUČENÉ ROZLOŽENÍ DISKŮ pro průkaz ESBL a AmpC**



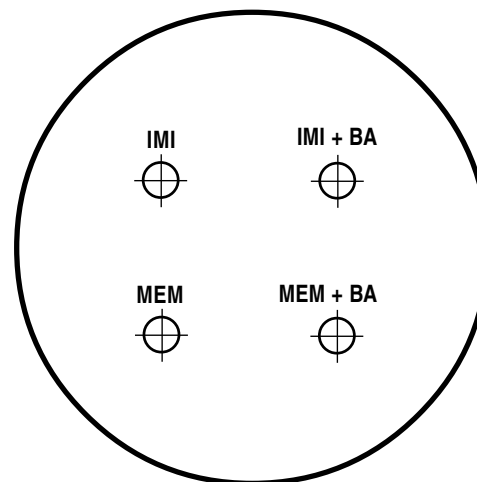
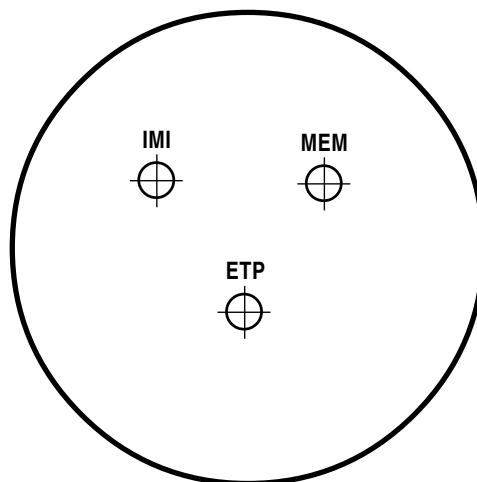
Mueller-Hinton agar se 128 mg/l oxacilinu (*inhibice AmpC*)



Obrázek 2: **DOPORUČENÉ ROZLOŽENÍ DISKŮ pro průkaz MBL**



Obrázek 3: **DOPORUČENÉ ROZLOŽENÍ DISKŮ pro skrining s průkaz KPC**

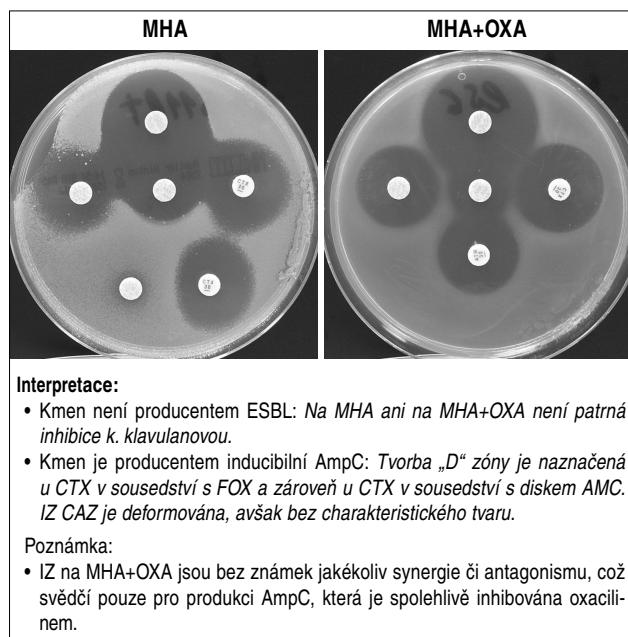


ESBL. Mezi důležité inhibitory AmpC patří oxacilin (kloxacilin), nebo kyselina boritá a její deriváty. Vzhledem k možné současné produkci ESBL je nejvhodnější použít Mueller-Hinton (MH) agar s oxacilinem (MHA+OXA) a srovnat průměr IZ s průměrem IZ na MH agaru bez přidavku inhibitoru [8]. Mimo tuto metodu byly vyvinuty metody založené na inhibici AmpC kyselinou boritou.

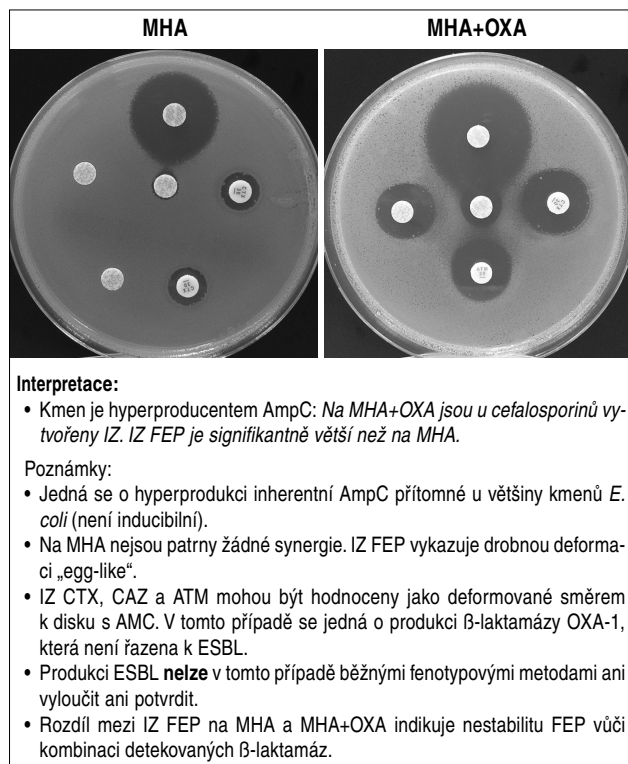
3.3. MBL

Metody průkazu MBL jsou založeny na průkaz inhibice těchto β -laktamáz chelátory kovových iontů (EDTA, kyselina 2-merkaptopropionová, atp.). Vzhledem k tomu, že u některých druhů (především *Acinetobacter* spp.) není EDTA dostatečně citlivá, je nutné použít kombinaci obou zmíněných inhibitorů – EDTA a kyseliny 2-merkaptopropionové (MPA) (viz tabulka 6). Uspořádání disků pro tuto metodu je zobrazeno na obrázku 1. Produkci MBL je nutné vždy konfirmovat spektrofotometrickou metodou hydrolyzy imipenemu prováděnou specializovanou laboratoří [1, 4, 12].

Tabulka 1: **Produkce inducibilní AmpC. Kmen *Escherichia coli* dobře citlivý ke karbapenemům ($MIC_{MER} \leq 0,125 \mu\text{g/ml}$)**



Tabulka 2: **Konstitutivní produkce inherentní AmpC, současná produkce β -laktamázy OXA-1. Kmen *Escherichia coli* dobře citlivý ke karbapenemům ($MIC_{MER} \leq 0,125 \mu\text{g/ml}$)**



3.4. Ostatní

3.4.1. OXA

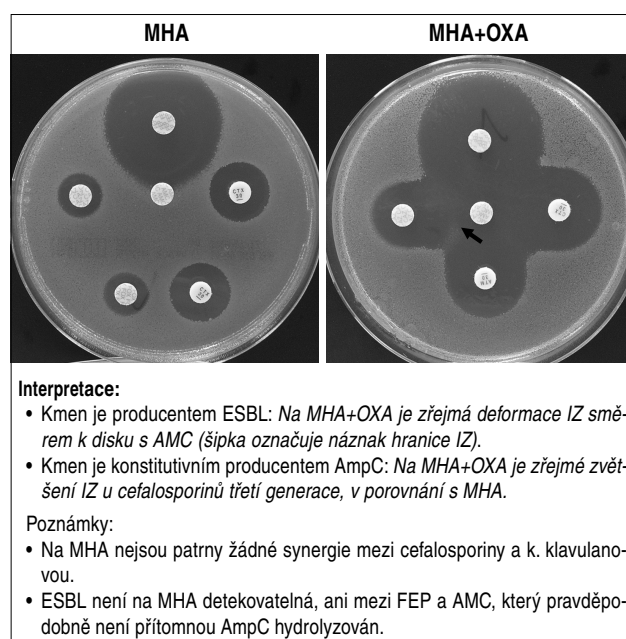
Jeich fenotypová detekce je velmi obtížná, proto lze spolehlivý průkaz provést pouze molekulárně-genetickými technikami [10]. Slabá inhibice kyselinou klavulanovou může v některých případech vést k nesprávné iden-

tifikaci producenta enzymů OXA s úzkým spektrem účinku (obvykle OXA-1) jako producenta ESBL (viz tabulka 2).

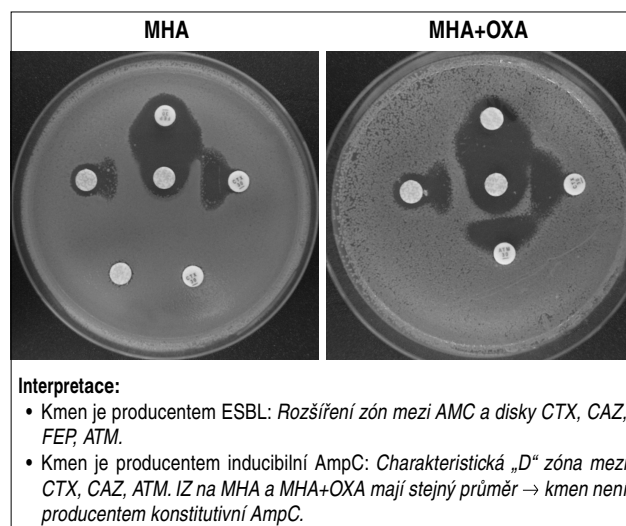
3.4.2. K1

Specifický test pro průkaz β -laktamázy K1 není k dispozici. Základním předpokladem pro správnou identifikaci je provedená druhová identifikace. Na hyperprodukcii K1 lze usuzovat podle antibiogramu, na základě vysokého stupně rezistence k aztreonamu, cefalosporinům první a druhé generace a snížené citlivosti k cefotaximu. Kmen

Tabulka 3: **Konstitutivní produkce AmpC a ESBL. Kmen *Morganella morganii* dobře citlivý ke karbapenemům ($MIC_{MER} \leq 0,125 \mu\text{g/ml}$). Referenční kmen CNCTC 7375**



Tabulka 4: **Současná produkce ESBL a inducibilní AmpC. Kmen *Klebsiella pneumoniae* dobře citlivý ke karbapenemům ($MIC_{MER} \leq 0,125 \mu\text{g/ml}$)**



při použití DDST nevykazuje deformaci zón, případně je patrná pouze deformace typu „egg-like“ [11].

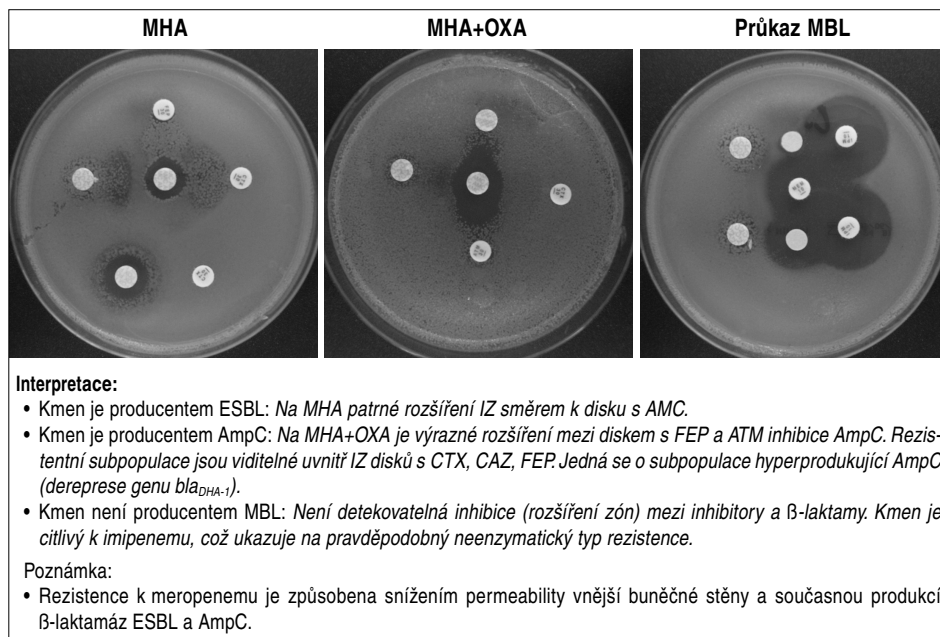
3.4.3. Karbapenemázy skupiny 2f

Karbapenemázy skupiny 2f jsou poměrně novým fenoménem v rezistenci enterobakterií ke karbapenemům [10]. Z tohoto důvodu dosud neexistují spolehlivé metody jejich detekce. V některých laboratořích se osvědčil průkaz produkce karbapenemázy tzv. 3D testem, avšak tento test je závislý na množství exprimovaného enzymu. Proto jeho standardizace pro rutinní aplikaci je obtížně proveditelná. Rovněž nelze použít DDST s kyselinou klabulanovou, neboť tyto karbapenemázy jsou inhibovány velmi slabě, přestože spadají do skupiny β -laktamáz inhibovatelných kyselinou klabulanovou a ostatními standardními inhibitory β -laktamáz (sulbaktam, tazobaktam) [10].

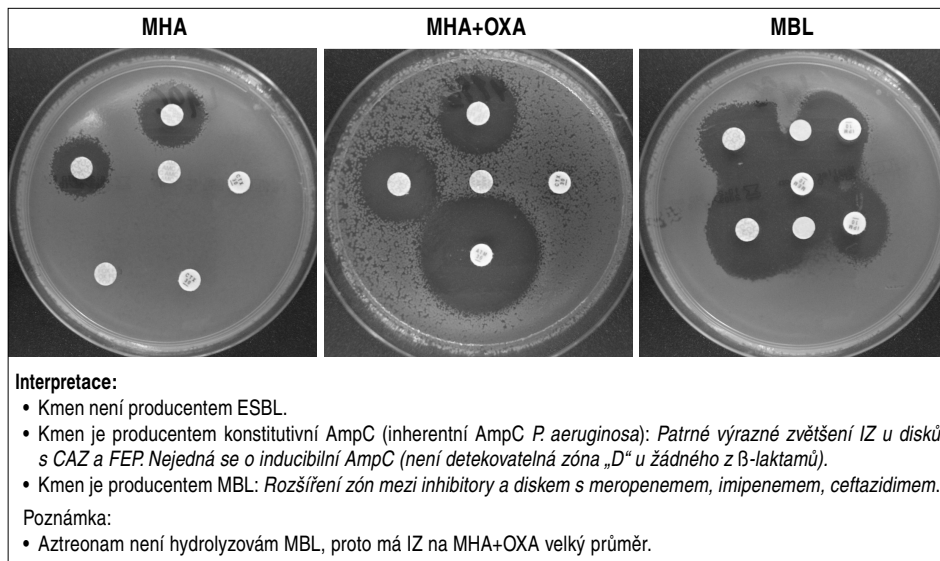
Pro rutinní vyhledávání podezřelých kmenů lze použít výsledky vyšetření MIC, resp. diskové citlivosti. Vhodným indikátorem se zdá být ertapenem [M. Gniadkowski, osobní sdělení]. Podezřelé kmeny jsou takové, které mají MIC meropenemu, imipenemu, nebo ertapenemu větší nebo rovno 0,5 $\mu\text{g/ml}$. V případě diskové citlivosti tato hranice dosud nejčastěji není, avšak za podezřelé lze považovat kmeny necitlivé alespoň k jednomu z karbapenemů (IZ meropenemu a imipenemu ≤ 16 mm, ertapenemu ≤ 19 mm) [3, 16].

Jako konfirmační test lze použít srovnání IZ imipenemu a meropenemu (disk 10 μg) a IZ imipenemu a meropenemu s přidávkou 300 μg kyseliny borité (viz obr. 3). Je-li průměr IZ u disků s karbapenemem s přidávkou kyseliny borité větší než 5 mm v porovnání s IZ u samotného karbapenemu, může se jednat o produkci β -laktamázy KPC [5, 14]. Vzhledem k možné falešné pozitivitě je vždy nezbytně nutné produkci tohoto enzymu potvrdit ve specializované laboratoři, která disponuje příslušnými kontrolními kmeny. Verifikace je prováděna PCR amplifikací s následnou sekvenací a/nebo spektrofotometrickým měřením hydrolyzy imipenemu.

Tabulka 5: **Současná produkce ESBL a AmpC. Kmen *Klebsiella pneumoniae* je rezistentní k meropenemu (MIC = 8 $\mu\text{g/ml}$)**



Tabulka 6: **Současná produkce AmpC a MBL. Kmen *Pseudomonas aeruginosa***



Disky pro konfirmační test je potřeba připravit vždy čerstvé. Disk s karbapenemem se napustí 20 μl roztoku kyseliny borité (zásobní roztok 15 mg/ml) tak, že výsledná koncentrace na disku je 300 μg . Disky je vhodné napouštět na sterilním podložním sklíčku a před použitím nechat alespoň 30 minut zaschnout [5, 14].

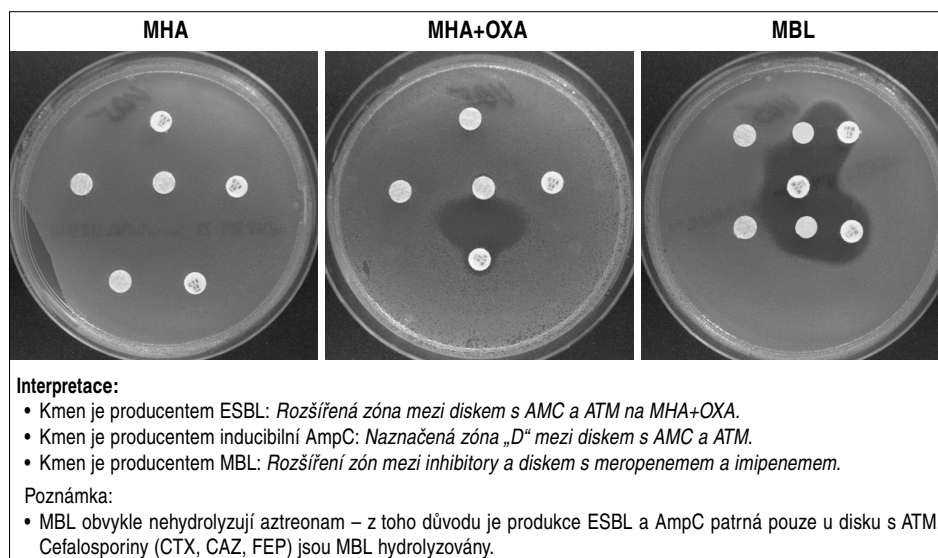
Příklad karbapenemáz 2f s různým stupněm rezistence je uveden v tabulce 8.

3.5. Současná produkce různých β -laktamáz

3.5.1. Produkce ESBL a konstitutivní produkce AmpC

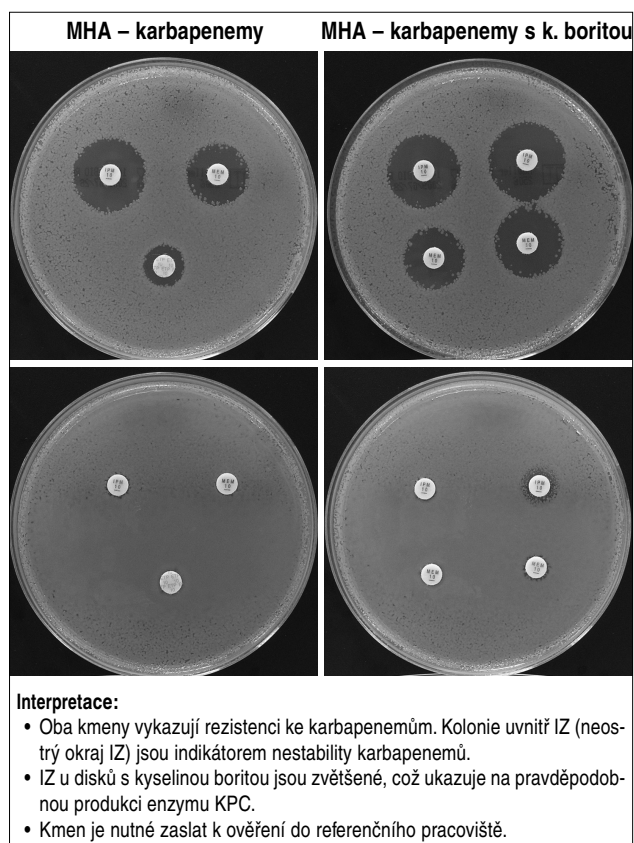
Konstitutivní produkce AmpC může maskovat vytvoření charakteristických deformací v případě současné produkce ESBL (viz Tabulka 3). Nejspolehlivější metodou k odfiltrování vlivu AmpC je použití MHA s oxacilinem

Tabulka 7: **Současná produkce ESBL, AmpC, MBL.**
Kmen *Serratia marcescens* rezistentní ke všem β -laktamům



s kyselinou klavulanovou a disky s cefalosporiny. AmpC je však většinou produkována v nízké hladině i bez přítomnosti induktoru, proto lze často pozorovat zvětšení IZ na MHA+OXA. Charakteristické pro tuto kombinaci je „useknutí“ zvětšené inhibiční zóny u disku s AMC (viz tabulky 4, 5). Hlavním indikátorem pro produkci inducibilní AmpC je opět rezistence k cefoxitinu.

Tabulka 8: **Různý stupeň rezistence u producentů karbapenemázy KPC (skupina 2f) u dvou kmenů *Klebsiella pneumoniae***



[11]. Konstitutivní produkce AmpC je charakterizována zvětšením IZ na MHA+OXA v porovnání s MHA. Jedním z hlavních indikátorů přítomnosti AmpC je rezistence k cefoxitinu [8].

3.5.2. Produkce ESBL a inducibilní produkce AmpC

Kmen, který současně produkuje inducibilní AmpC a ESBL, obvykle vytváří deformované IZ mezi diskem

3.5.3. Produkce MBL spolu s dalšími β -laktamázi schopnými hydrolyzovat oxy-imino-cefalosporiny (ESBL, AmpC)

Vzhledem k tomu, že MBL hydrolyzují všechny β -laktamy s výjimkou monobaktamů (aztreonamu), bývá stupeň rezistence takových kmenů velmi vysoký. Aztreonam je jediným antibiotikem, které v tomto případě může sloužit jako indikátor (tabulka 7). Jeho umístění na MHA+OXA umožňuje detekovat ESBL (rozšíření zóny) i inducibilní AmpC („useknutí“ zóny). V případě pochybností lze použít stejné uspořádání disků z MHA+OXA na MHA.

4. Klinická interpretace

Enzymatická aktivita mnoha set známých typů β -laktamáz schopných hydrolyzy cefalosporinů vyšších generací, případně karbapenemů, se vzájemně liší. Přesto biochemické konstanty nejsou jediným vodítkem ke stanovení stupně rezistence, neboť ten je významně závislý i na permeabilitě vnější buněčné stěny a tím prostupu antibiotika do periplasmového prostoru [10]. Na základě těchto argumentů je zřejmé, že jednoznačné interpretační kritérium pro producenty β -laktamáz nelze stanovit. Určitá interpretační kritéria lze nalézt v dokumentu EU-CAST [13].

4.1. ESBL

Producent ESBL by měl být hodnocen jako rezistentní ke všem β -laktamovým antibiotikům včetně kombinací se serinovými inhibitory β -laktamáz (kyselina klavulanová, tazobaktam, sulbaktam). Jedinou výjimku tvoří karbapenemy, které jsou všeobecně pokládány za léky volby u závažných infekcí způsobených producenty ESBL [7]. Dle expertních pravidel EUCAST by měl být kmen interpretován jako intermediárně citlivý k β -laktamovému antibiotiku, je-li hodnota MIC, resp. průměru IZ v citlivé kategorii. Jako rezistentní, je-li hodnota MIC (IZ) v intermediární kategorii [13].

4.2. AmpC

Producenti získané AmpC (může být inducibilní) by měli být hodnoceni jako rezistentní k cefalosporinům 1.–3. generace. I když nejsou cefalosporiny 4. generace (cefepim) obvykle hydrolyzovány v signifikantní míře, je vhodné jejich klinické použití zvážit u každého případu zvláště, s ohledem na změnu citlivosti za přítomnosti inhibitoru AmpC (srovnání IZ na MHA a MHA+OXA).

4.3. MBL

Producenti metalo- β -laktamáz by měli být považováni za rezistentní ke všem β -laktamům (včetně karbapenemů), kromě aztreonamu, je-li kmen k němu citlivý a neprodukuje-li některý z enzymů, který aztreonam hydrolyzuje (ESBL, AmpC, K1, atp.) [4].

Tato informace však slouží jen pro laboratorní účely, neboť aztreonam není v ČR dostupný.

4.4. KPC

Interpretační kritéria pro producenty KPC nebyla dosud publikována. Přesto panuje shoda, že by v případě citlivosti kmene k některému z β -laktamů tato antibiotika neměla být preferována a kmen by měl být považován za rezistentní ke všem β -laktamům.

5. Závěr

Rezistence k antibiotikům je neustále se rozvíjející problém, umožňující sledování evoluce v reálném čase. Proto nelze žádnou metodiku považovat za bezvýhradně spolehlivou. Stejný problém zatěžuje interpretaci výsledků vyšetření a interpretační kritéria. Ani tato kritéria nelze považovat za zcela rigidní. Předkládaná metodika vychází z nejnovějších odborných poznatků s ohledem na epidemiologickou situaci v České republice a bude pružně aktualizována (viz také <http://www.betalaktamazy.cz>).

Poděkování

Autoři děkují Daně Červené za výtečnou laboratorní spolupráci. Práce byla financována grantem MŠMT č. 2E08003. Účast J.H. a T.B. byla částečně podpořena výzkumným záměrem č. MSM 0021620819.

POUŽITÉ ZKRATKY

MHA	Mueller-Hinton agar		
MHA+OXA	Mueller-Hinton agar s přísádkem 128 mg/l oxacilinu		
IZ	inhibiční zóna		
MPA	merkaptopropionová kyselina		
ESBL	širokospektrá β -laktamáza		
EDTA	kyselina ethylendiamin tetraoctová		
MBL	metalo- β -laktamáza		
AMC	amoxicilin/kyselina klavulanová		
ATM	aztreonam	FOX	cefoxitin
MEM	meropenem	CTX	cefotaxim
IMI	imipenem	CAZ	ceftazidim
ETP	ertapenem	FEP	cefepim
BA	kyselina boritá		

LITERATURA

1. 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 Microb* 2000; 38: 40-43.

- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-1233.
- Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth informational supplement. CLSI Document M100-S-16, PA, USA; 2006.
- Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, et al. Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 380-388.
- Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type beta-lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 4083-4086.
- Dunne MW, Hardin DJ. Use of several inducer and substrate antibiotic combinations in a disk approximation assay format to screen for AmpC induction in patient isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., and *Serratia* spp. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5945-5949.
- Hrabák J. Klinicky významné β -laktamázy gramnegativních bakterií: širokospektré β -laktamázy (ESBL). *Epid mikrob imunol*, 2007, 56, 103-111.
- Hrabák J. Klinicky významné β -laktamázy gramnegativních bakterií: AmpC. *Epid mikrob imunol*, 2007, 56, 155-165.
- Hrabák J, Fridrichová M, Štolbová M, et al. First identification of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Euro Surveillance* 2009; 14: 19102.
- Hrabák J, Chudáčková E. Rezistence enterobakterií ke karbapenemům. *Epid mikrob imunol* 57, 2008: 125-136.
- Hrabák J, Vaniš V, Bergerová T, et al. Průkaz β -laktamáz širokého spektra (ESBL) a typu AmpC u enterobakterií. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2007; 16: 31-36.
- Hrabák J, Vaniš V, Bergerová T, et al. Průkaz metalo- β -laktamáz (MBL) u gramnegativních bakterií. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2007; 16: 417-422.
- Leclercq R, Cantón R, Giske C, et al. Expert rules in antimicrobial susceptibility testing, EUCAST, 2008, dostupné na http://www.escmid.org/fileadmin/src/media/PDFs/4ESCMID_Library/3Publications/EUCAST_Documents/Other_Documents/EUCAST_Expert_rules_final_April_20080407.pdf.
- Tsakris A, Kristo I, Poulou A, et al. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2008; 47: 362-367.
- Urbášková P, Jakubů V, Žemličková H, Macková B, a CZ-EARSS. Rezistence k antibiotikům u sedmi druhů invazivních bakterií, sledovaných v rámci EARSS v České republice v letech 2000–2006. *Prakt lék* 2007; 87(1): 32-39.
- Urbášková P. 1998. Rezistence bakterií k antibiotikům. Vybrané metody. Trios.

Jaroslav Hrabák

Tamara Bergerová

Ústav mikrobiologie LF UK a FN v Plzni

Helena Žemličková

Pavla Urbášková

Národní referenční laboratoř pro antibiotika

Státní zdravotní ústav v Praze

Kontaktní adresa:

Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D.

Ústav mikrobiologie LF UK a FN v Plzni

Dr. E. Beneše 13, 305 99 Plzeň

Jaroslav.Hrabak@lfp.cuni.cz