

Záchyt kmene *Serratia marcescens* současně produkujícího metalo- β -laktamázu (MBL), širokospektrou β -laktamázu (ESBL) a dvě β -laktamázy typu AmpC ve FN Motol

Isolation of the strain Serratia marcescens producing metalo- β -lactamases (MBL) and wide acting ESBL and two β -lactamases typed AmpC in the University Hospital in Motol

Jaroslav Hrabák, Eliška Bébrová, Otakar Nyč, Marta Fridrichová,
Tamara Bergerová, Helena Žemličková, Pavla Urbášková

Souhrn • Summary

Serratia marcescens patří mezi sporadické, avšak díky své rezistenci významné původce infekcí. Článek popisuje kmen *S. marcescens* produkující čtyři různé β -laktamázy – ESBL (TEM-6), AmpC (inherentní AmpC a získanou AmpC - DHA-1) a MBL (VIM) izolovaný z moči od pacienta hospitalizovaného ve Fakultní nemocnici Motol. Kmen byl rezistentní ke všem dostupným antibiotikům. Šíření takových bakteriálních kmenů představuje reálnou hrozbu pro antibiotickou terapii infekčních onemocnění vyvolaných aerobními gramnegativními tyčkami.

Serratia marcescens is a sporadic, but usually resistant causative agent of infections. Strain of *S. marcescens* producing four different β -lactamases – ESBL (TEM-6), AmpC (intrinsic enzyme and DHA-1), and MBL (VIM type) is described. The strain resistant to all possible antibiotics useful for a treatment was isolated from a urine from patient hospitalized in University Hospital in Motol. Spreading of such strains is a serious risk for antibiotic treatment of infectious diseases caused by Gram-negative aerobic rods.

Zprávy EM (SZÚ, Praha) 2009; 18(4): 139–141.

Klíčová slova: metalo- β -laktamáza, DHA-1, TEM-6, VIM, *Serratia marcescens*
Keywords: metalo- β -lactamases, DHA-1, TEM-6, VIM, *Serratia marcescens*

Serratia marcescens patří mezi sporadické původce infekcí z čeledi *Enterobacteriaceae*. Kmeny *S. marcescens* způsobující nozokomiální infekce se často vyznačují vysokým stupněm rezistence, neboť tento druh je schopný účinné akvizice genů pomocí horizontálního přenosu genetické informace [12]. Primární rezistence k penicilinům a cefalosporinům první a druhé generace je způsobena konstitutivní produkcí inherentní AmpC [12]. U *S. marcescens* byly popsány získané β -laktamázy ESBL, AmpC a MBL. U *S. fonticola* byla zjištěna inherentní metalo- β -laktamáza molekulární skupiny B2 [13]. Kromě β -laktamáz se některé kmeny *S. marcescens* vyznačují produkcí dalších enzymů, resp. proteinů způsobujících rezistenci k ostatním skupinám antibiotik (např. proteiny Qnr chránící gyrázu před účinkem fluorochinolonů) [13].

Kmen *S. marcescens* vykazující vysoký stupeň rezistence (viz tabulka I.) byl izolován z moči pacienta hospitalizovaného ve Fakultní nemocnici Motol v roce 2008. Kmen byl zaslán na Ústav mikrobiologie LF UK a FN v Plzni ke stanovení mechanismů rezistence.

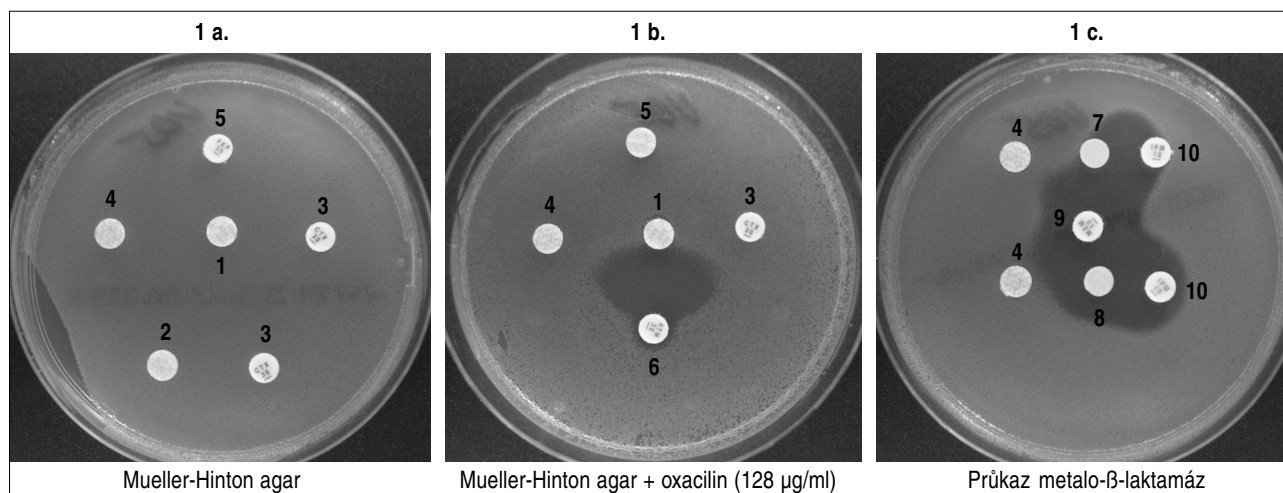
Byl proveden fenotypový průkaz β -laktamáz ESBL, AmpC a MBL [10, 11]. Výsledky jsou zdokumentovány na obrázku 1. Na Mueller-Hinton agaru nebyly patrné žádné inhibiční zóny, ani synergie (viz obr. 1a). Na

Mueller-Hinton agaru s oxacilinem byla zjištěna synergie mezi diskem s amoxicilinem/kyselinou klavulanovou a aztreonamem s charakteristickým tvarem „D“ (viz obr. 1b). Tento výsledek ukazuje na současnou produkci konstitutivní β -laktamázy AmpC (inhibice oxacilinem), inducibilní AmpC a ESBL (vytvoření typické „D“ synergie charakteru „zvonku“ díky účinkům kyseliny klavulanové – induktor v případě AmpC, inhibitor v případě ESBL). Nevytvoření žádných inhibičních zón mezi ostatními antibiotiky (cefotaxim, ceftazidim, cefepim) indikovalo produkci další β -laktamázy, která tato antibiotika hydrolyzuje a pouze aztreonam vůči ní zůstává stabilní. Vzhledem k tomu, že kmen byl vysoce rezistentní ke karbapenémům, byl proveden SDT (synergy disk test) pro průkaz produkce MBL (viz obr. 1c). Zjištěná synergie mezi 2-merkaptopopionovou kyselinou a karbapenemy (meropenem a imipenem) prokázala produkci metalo- β -laktamázy. Tím bylo vysvětleno vytvoření inhibiční zóny pouze mezi diskem s aztreonamem a k. klavulanovou, neboť aztreonam není metalo- β -laktamázami hydrolyzován.

Molekulární charakterizace založená na isoelektrické fokusaci extraktu kmene s následným značením nitrocefinem, resp. biologickým průkazem aktivity β -laktamáz [1] (MBL nejsou detekovatelné nitrocefinem) potvrdila přítomnost čtyř různých enzymů. PCR amplifikací a sekvenací amplifikačních produktů byly tyto β -laktamázy identifikovány jako TEM-6 (ESBL), DHA-1 (inducibilní AmpC – spolu s regulátorem AmpR), VIM (MBL) [6, 9], a inherentní β -laktamáza AmpC (zde bližší identifikace nebyla provedena). U metalo- β -laktamázy typu VIM ne-

Obrázek 1: FENOTYPOVÝ TEST PRŮKAZU β -LAKTAMÁZ U VYŠETŘOVANÉHO KMENE *S. MARCESCENS*.

Disky: 1 – amoxicilin/kyselina klavulanová, 2 – cefoxitin, 3 – cefotaxim, 4 – ceftazidim, 5 – cefepim, 6 – aztreonam, 7 – ethylendiamin tetraoctová kyselina (EDTA), 8 – merkaptopropionová kyselina, 9 – meropenem, 10 – imipenem



byla dosud provedena kompletní sekvenace genu, avšak na základě dosud dostupných informací se jedná o enzym podobný VIM-1.

Profil β -laktamáz u daného kmene je velmi unikátní. ESBL TEM-6 byla poprvé popsána A. Bauernfeindem a G. Hörlem v roce 1987 v Německu [2]. Od té doby je registrován její sporadický výskyt u různých druhů čeledi *Enterobacteriaceae*, nikdy však u *Serratia* spp. Kromě toho se jedná o ojedinelou alelickou variantu se dvěma bodovými mutacemi, jimiž se liší od dosud známých alel [2, 8]. Stejně tak ani produkce enzymu DHA-1 nebyla dosud nikdy popsána u tohoto druhu. Metallo- β -laktamázy typu VIM jsou v Evropě běžné a vyskytují se i v okolních státech. Bližší identifikace genetického uspořádání (charakterizace integronu třídy 1, na němž jsou některé geny rezistence nesené, replikonová typizace plazmidu, atd.) je v současnosti prováděna na Ústavu mikrobiologie LF UK v Plzni.

Nejčastějším producentem MBL je *Pseudomonas aeruginosa* [5]. Kmeny produkující MBL byly v ČR již nalezeny [8]. U enterobakterií se však jedná o první záchyt. *S. marcescens* patří mezi relativně časté producenty metallo- β -laktamáz z řad fermentujících gramnegativních tyčků [7, 14] – například v Polsku je nejčastějším zástupcem z čeledi *Enterobacteriaceae* produkujícím tyto enzymy (M. Gniadkowski, osobní sdělení).

Vzhledem k unikátnímu genetickému profilu izolovaného kmene však nelze určit, zda byl do ČR tento kmen importován, či zda došlo k akvizici jednotlivých genů rezistence zde. Další kmen *S. marcescens* produkující MBL byl identifikován na podzim roku 2008 z krve u pacienta hospitalizovaného v Nemocnici Havířov (P.U., J.H., H.Ž., nepublikovaná data). Tento kmen však produkoval pouze metallo- β -laktamázu a inherentní AmpC. S popisovaným kmenem byl tedy nepřibuzný.

Významným faktorem, na který je potřeba upozornit, je necitlivost izolovaného kmene k žádnému z dostupných antibiotik (viz Tabulka I. – vyšetřeno dle doporučení CLSI [4]). V případě izolace podobného kmene je zcela nezbytné přijmout preventivní hygienická opatření

jako v případě výskytu MRSA [3] tak, aby nedošlo k jeho šíření v nemocničním prostředí. Klonální šíření druhu *S. marcescens* v nemocničním zařízení již bylo popsáno a představuje reálnou hrozbu v případě nozokomiálních infekcí [12]. Další riziko spočívá v možném přenosu genu MBL na ostatní druhy čeledi *Enterobacteriaceae*. U těchto bakterií jsou léky volby infekcí způsobených multirezistentními kmeny (produkce ESBL, AmpC) karbapenemy. Jejich vyřazení tak, jak bylo registrováno např. u *Klebsiella pneumoniae* v některých nemocničních zařízeních v Řecku (<http://www.rivm.nl/earss>), představuje vážnou hrozbu při léčbě takových infekcí.

Autoři děkují účastníkům EARSS-CZ za spolupráci a dovolují si je požádat o zaslání jakéhokoliv kmene (nejen invazivního) *Serratia* spp. rezistentního k některému z karbapenemů (MIC > 4 µg/ml) k jeho další charakterizaci do Národní referenční laboratoře pro antibiotika SZÚ, resp. na Ústav mikrobiologie LF UK a FN v Plzni, spolu s elektronicky vyplněnou žádankou na stránkách <http://www.betalaktamazy.cz>.

Tabulka 1:
CITLIVOST KMENE *SERRATIA MARCESCENS* K ANTIBIOTIKŮM

Antibiotikum	MIC [µg/ml]	Antibiotikum	MIC [µg/ml]
Ampicilin	> 64	Meropenem	> 16
Amoxicilin/sulbaktam	> 64	Gentamicin	> 32
Piperacilin	> 64	Amikacin	64
Piperacilin/tazobaktam	> 64	Chloramfenikol	64
Cefazolin	> 64	Tetracyklin	> 64
Cefuroxim	> 64	Tigecyklin	2
Cefotaxim	> 16	Ko-trimoxazol	> 128
Cefoperazon	> 32	Trimethoprim	> 16
Ceftazidim	> 16	Furantoin	> 128
Cefepim	> 16	Kyselina oxolinová	> 32
Aztreonam	> 32	Ciprofloxacín	16

Autoři dále děkují Daně Červené za excelentní laboratorní spolupráci. Molekulární typizace kmenů produkujících MBL byla podpořena grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy č. MŠM 2E08003.

LITERATURA

1. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 1990; 18: 294–298.
2. Bauernfeind A, Hörl G. Novel R-factor borne beta-lactamase of *Escherichia coli* conferring resistance to cephalosporins. *Infection* 1987; 5: 257–259.
3. Bergerová T, Hedlová D, Jindrák V, et al. Doporučený postup pro kontrolu výskytu kmenů *Staphylococcus aureus* rezistentních k oxacilinu (MRSA) a s jinou nebezpečnou antibiotickou rezistencí ve zdravotnických zařízeních. *Prakt Lék* 2006; 86: 500–506. Dostupný také na www (http://www.cls.cz/dokumenty/dp_mrsa.doc).
4. Clinical Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth informational supplement. CLSI Document M100-S-16, PA, USA.
5. 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: 380–88.
6. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 321–322.
7. Fielt J, Baraniak A, Mrówka A, et al. Molecular epidemiology of acquired-metallo- β -lactamase-producing bacteria in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 880–86.
8. Goussard S, Sougakoff W, Mabilat C, et al. An IS1-like element is responsible for high-level synthesis of extended-spectrum beta-lactamase TEM-6 in *Enterobacteriaceae*. *J Gen Microbiol* 2007; 137: 2681–2687.
9. Hrabák J, Fridrichová M, Štolbová M, Bergerová T, Žemličková H, Urbášková P. First identification of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Euro Surveill* 2009; 14: 19102.
10. Hrabák J, Vaniš V, Bergerová T, et al. Průkaz metalo- β -laktamáz (MBL) u gramnegativních bakterií. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2007; 16(9): 417–22.
11. Hrabák J, Vaniš V, Bergerová T, Urbášková P: Průkaz β -laktamáz širokého spektra (ESBL) a typu AmpC u enterobakterií. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2007; 16 (1): 31–36.
12. Naumiuk L, Baraniak A, Gniadkowski M, et al. Molecular epidemiology of *Serratia marcescens* in two hospitals in Gdańsk, Poland, over a 5-year period. 2004; 42: 3108–3116. Erratum in: *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42: 3914.
13. Nishio H, Komatsu M, Shibata N, et al. Metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. *J Clin Microbiol* 2004, 42: 5256–5263.
14. Saavedra MJ, Peixe L, Sousa JC, et al. Sfh-I, a subclass B2 metallo-beta-lactamase from a *Serratia fonticola* environmental isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2330–2333.

Jaroslav Hrabák

Tamara Bergerová

Ústav mikrobiologie LF UK a FN v Plzni

Eliška Běbrová

Otakar Nyč

Ústav mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol

Marta Fridrichová

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