

## **Izoláty *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis* rezistentní k linezolidu v České republice od roku 2009 až 2018**

*Linezolid resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates in the Czech Republic in 2009–2018*

**Lucia Mališová, Vladislav Jakubů, Martin Musílek, Helena Žemličková**

### **Souhrn • Summary**

V letech 2009 až 2018 bylo v Národní referenční laboratoři pro antibiotika (NRL pro ATB) vyšetřeno celkem 1 194 kmenů *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis*. U 80 (6,7 %) izolátů (75 *E. faecium*, 5 *E. faecalis*) byl zjišťován mechanismus rezistence k linezolidu. U izolátů *E. faecium* byla nejčastější příčinou rezistence k tomuto antibiotiku mutace v 23S rRNA 50S ribozomální podjednotky, u *E. faecalis* to byla rezistence kódovaná genem *optrA*. Od roku 2016 stoupá počet izolátů, u kterých byla v NRL pro ATB potvrzena rezistence vůči linezolidu.

*From 2009 to 2018, the National Reference Laboratory for Antibiotics (NRL for ATB) examined 1 194 strains of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. Eighty strains (6.7 %) were screened for the linezolid resistance mechanism. The most common linezolid resistance mechanism in *E. faecium* was a mutation of G2576T in the 23S rRNA ribosome subunit. In *E. faecalis*, linezolid resistance was encoded by the *optrA* gene. Since 2016, isolates with linezolid resistance confirmed by the NRL for ATB are on the rise.*

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2019; 28(4): 137–139

**Klíčová slova:** *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, linezolid, 23S rRNA, *cfr*, *optrA*

**Key words:** *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, linezolid, 23S rRNA, *cfr*, *optrA*

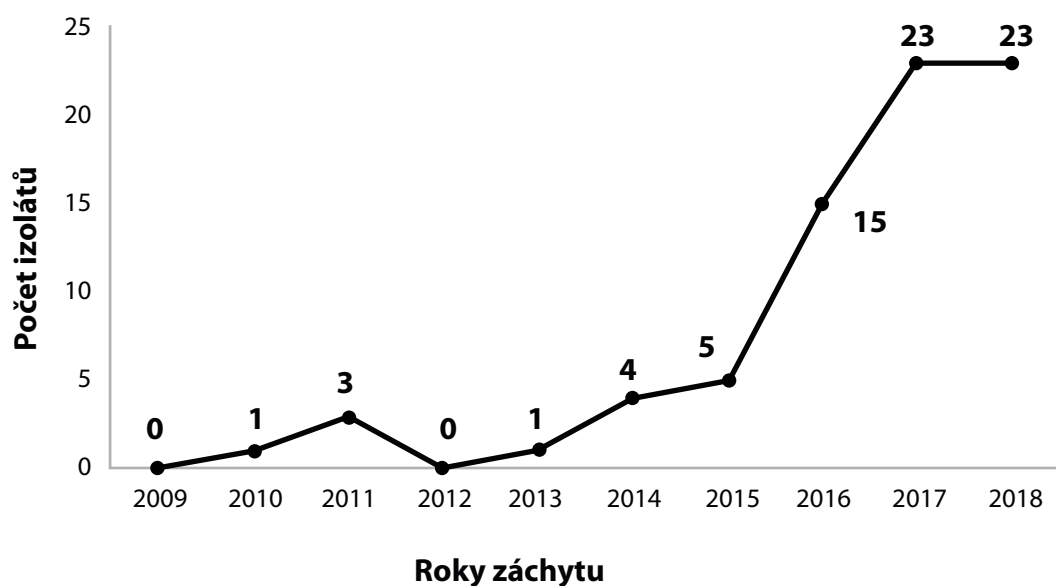
Enterokoky jsou gram pozitivní bakterie a střevní komenzály, které jsou schopné vyvolat komunitní či nozokomiální nákazy. Jsou původci močových infekcí, infekcí ran, bakterémií, enkokarditid, jsou často izolovány z nitrobřišních abscesů a peritonitidy. Dodnes bylo popsáno přibližně 50 druhů enterokoků, nejčastějšími zástupci této skupiny vyvolávající onemocnění u člověka jsou *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis*. Enterokoky jsou přirozeně rezistentní k řadě antibiotik včetně cefalosporinů, sulfonamidů a aminoglykosidů [1]. Rezistence k betalaktamovým antibiotikům je u enterokoků způsobena modifikací penicilin vázících proteinů (penicillin-binding protein, PBP), zejména PBP5 a je příčinou rezistence k aminopenicilinům u *E. faecium*. Kromě přirozeně nízké rezistence na aminoglykosidy z důvodu jejich snížené absorpce, mohou enterokoky získat vysokou rezistenci k aminoglykosidům. Získaná vysoká rezistence ruší vzájemnou terapeutickou synergii mezi betalaktamy nebo glykopeptidy a aminoglykosidy. První kmeny enterokoků rezistentních ke gentamicinu (high level resistance, HLR) se začaly objevovat po roce 1979 [2]. V současnosti komplikuje léčbu enterokokových infekcí rezistence k linezolidu

a/nebo vankomycinu, tj. záložním antibiotikům pro léčbu enterokokových infekcí [3].

Linezolid je oxazolidinonové antibiotikum, které působí bakteriostaticky pouze na gram pozitivní bakterie, u gram negativních mikrobů je aktivně transportováno ven z buňky (effluxový mechanismus). Účinek linezolidu spočívá v jeho vazbě na 50S ribozomální podjednotku na A místo peptidyl-transferázového centra (PTC), kde interaguje s mnoha nukleotidy 23S ribozomální RNA (rRNA). Vazbou na ribozóm tak nutí nukleotidy z 23S rRNA k nepatrným změnám v pozicích, což má za následek narušení přesného polohování aminoacyl-tRNA v A místě PTC a tím narušení proteosyntézy.

V současné době je popsáno 6 mechanismů zodpovědných za rezistenci k linezolidu: mutace v genu pro 23S rRNA (v doméně V), mutace v genech pro L3 nebo L4 ribozomální proteiny, na plazmidu přenášené geny *cfr* (chloramfenikol-florfenikolová rezistence), *optrA* (oxazolidinon-fenikolová rezistence, ABC transportér) a *poxtA* (rezistence k tetracyklinu, oxazolidinon-fenikolová rezistence, F podskupina ABC transportérů).

Gen pro 23S rRNA se nachází v buňce v několika kopiích. K vyjádření klinické rezistence je zapotřebí, aby byly mutacemi zasaženy nejméně tři kopie. Dané mutace v 23S rRNA pak snižují schopnost linezolidu navázat se na PTC na ribozomu. Nejčastější, i když ne jedinou bodovou mutací uplatňující se v tomto mechanismu, je

Graf 1: Počet izolátů *E. faecium* a *E. faecalis* rezistentních vůči linezolidu vyšetřených v letech 2009–2018 v NRL pro ATB

záměna guaninu v poloze 2576 v 23S rRNA za tymin [4,5]. Proteiny L3 a L4 hrají významnou roli ve stabilizaci a konformaci PTC ribozomu. Mutace v genech (*rplC*, *rplD*), které kódují tyto proteiny, způsobují změny v aminokyselinovém složení L3 nebo L4, což vede k změně nejenom jejich konformace, destabilizaci PTC, ale vedou i k narušení samotného procesu translace. Mutace v obou genech jsou velmi vzácné a vyskytují se především u rodu *Staphylococcus*, nejvíc případů bylo zaznamenáno u *Staphylococcus epidermidis* [6]. Rezistence k linezolidu způsobená přítomností genu *cfr* byla popsána v roce 2005 u *Staphylococcus aureus* [7]. Tento gen kóduje ribozomální metyltransferázu, která katalyzuje post-transkripční metylaci nukleotidu A2503 v 23S rRNA [7]. Gen *optrA* byl poprvé popsán v roce 2015 v Číně, a vyskytuje se častěji u hospodářských zvířat než u lidí. Je také častěji detekován u *E. faecalis* než *E. faecium* [8]. Příbuzný genu *optrA*, gen *poxtA*, je nejnovějším typem mechanismu popsaným u *S. aureus* v roce 2018 [9].

Národní referenční laboratoř pro antibiotika (NRL pro ATB, Státní zdravotní ústav, Praha) vyšetřuje *E. faecium* a *E. faecalis* v rámci rutinní činnosti referenční laboratoře. U daných izolátů je mikrodiluční metodou vyšetřena minimální inhibiční koncentrace (MIC) vybraných antibiotik (ampicilin, tigecyklin, linezolid, vankomycin, teikoplanin, streptomycin a gentamicin) dle aktuálního doporučení EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). U izolátů rezistentních k linezolidu (MIC > 4 mg/l) je pomocí polymerázové řetězcové reakce (PCR) ověřena přítomnost genu *cfr* a *optrA*, pomocí sekvenace jsou zjišťovány mutace v genech pro 23S rRNA, L3 a L4.

Od roku 2009–2018 bylo v NRL pro ATB vyšetřeno celkem 571 izolátů *E. faecium*, z toho 75 kmenů bylo rezistentních k linezolidu (13 %). Kmeny rezistentní k linezolidu

byly izolovány v 8 různých lokalitách České Republiky. Celkem 62 kmenů (11 %) bylo rezistentních jak k linezolidu, tak současně k vankomycinu. U *E. faecalis* byla rezistence k linezolidu méně častá, z celkem 623 izolátů bylo rezistentních k linezolidu 5 kmenů (0,8 %). Všechny 5 izolátů *E. faecalis* bylo zároveň citlivých k vankomycinu.

Mechanismus rezistence k linezolidu se podařilo objasnit u 72 (96 %) izolátů *E. faecium*. U 71 izolátů byla potvrzena mutace 23S rRNA, konkrétně záměna guaninu a tyminu v pozici 2576 (G2576T), jeden izolát obsahoval gen *cfr*.

U všech izolátů *E. faecalis* rezistentních k linezolidu byl pomocí PCR potvrzen výskyt genu *optrA* a vyloučena přítomnost dalších mechanismů této rezistence (*cfr*, mutace v 23S rRNA).

Kmeny *E. faecium* (n = 75) byly izolovány z různých klinických materiálů, třetina izolátů (n = 29; 39 %) pocházela z výtěru z rekta a stolice, 6 (8 %) izolátů bylo vykultivováno z hemokultury. Všechny kmeny *E. faecalis* (n = 5) byly izolovány z krve.

Nárůst záchyty izolátů *E. faecium* a *E. faecalis* rezistentních vůči linezolidu prokázaných v NRL pro ATB v letech 2009–2018 je znázorněn v grafu 1.

NRL pro ATB zaznamenala od roku 2016 zvýšený výskyt izolátů *E. faecium* a *E. faecalis*, u kterých byla potvrzena rezistence k linezolidu (případně vankomycinu). Epidemiologické studie přitom potvrzují, že výskyt enterokoků v souvislosti s infekcemi a perzistujícími kolonizacemi má vážné zdravotní a ekonomické dopady. Proto je nutný nepřetržitý monitoring výskytu a šíření těchto izolátů rezistentních k rezervním antibiotikům tj. linezolidu či vankomycinu. NRL pro ATB děkuje všem spolupracujícím laboratořím (Pracovní skupina pro monitorování rezistence), které zasílají kmeny enterokoků do NRL pro ATB laboratoře ke confirmaci rezistence k linezolidu.

**LITERATURA:**

1. Yu Z, Chen Z, Cheng H, et al. Recurrent linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* infection in a patient with pneumonia. *Int J Infect Dis.* 2015; 30: 49-51.
2. Forward KR, Kennedy JK, Degagne PA, et al. The rapid emergence of high level gentamicin resistance in enterococci. *Can J Infect Dis.* 1990; 1: 97-100.
3. Yadav G, Thakuria B, Madan M, et al. Linezolid and Vancomycin Resistant Enterococci: A Therapeutic Problem. *J Clin Diagn Res.* 2017; 11: GC07-GC11.
4. Klitgaard RN, Ntokou E, Nørgaard K, et al. Mutations in the Bacterial Ribosomal Protein L3 and Their Association with Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59: 3518-3528.
5. Cai J C, Hu YY, Zhang R, et al. Linezolid-resistant clinical isolates of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and *Enterococcus faecium* from China. *J Med Microbiol.* 2012; 61: 1568-1573.
6. Patel SN, Memari N, Shahinas D, et al. Linezolid resistance in *Enterococcus faecium* isolated in Ontario, Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013; 77: 350-353.
7. Kehrenberg C, Schwarz S. Distribution of Florfenicol Resistance Genes *fexA* and *cfr* among Chloramphenicol-Resistant Staphylococcus Isolates, *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 1156-1163.
8. Wang Y, Lv Y, Cai J, et al. A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70: 2182-2190.
9. Antonelli A, D'Andrea MM, Brenciani A, et al. Characterization of *poxTA*, a novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73: 1763-1769.

*Lucia Mališová, Vladislav Jakubů, Helena Žemličková*

*NRL pro antibiotika CEM – SZÚ*

*Martin Musílek*

*NRL pro meningokokové infekce CEM – SZÚ*