

## Záchyt serinové karbapenemázy typu GES v izolátech *Pseudomonas aeruginosa* v letech 2018–2019

*Detection of serine carbapenemase GES in Pseudomonas aeruginosa isolates in 2018–2019*

Lucia Mališová, Vladislav Jakubů, Katarína Pomorská, Helena Žemličková

### Souhrn • Summary

V letech 2018 až 2019 bylo do NRL pro antibiotika (NRL pro ATB) zasláno 1610 kmenů *Pseudomonas aeruginosa* z důvodu jejich confirmace na přítomnost karbapenemáz. U všech izolátů byla pomocí minimální inhibiční koncentrace stanovená citlivost k vybraným antibiotikům. Kvantitativní PCR potvrdila přítomnost karbapenemázy typu GES u 8,76 % (n = 141) kmenů. Všechny kmeny *P. aeruginosa* pozitivní na přítomnost karbapenemázy typu GES byly rezistentní k ceftolozan/tazobaktamu, gentamicinu a fluorochinolonům (levofloxacin, ciprofloxacin). Identifikace karbapenemázy typu GES pomocí MALDI-TOF MS (měření rozpadu meropenemu) nebyla dostatečně spolehlivá, pozitivní výsledek vykazovalo jen 40 % těchto izolátů. Oproti roku 2018, došlo v roce 2019 k zvýšenému výskytu (nárůst o 13 %) kmenů *P. aeruginosa*, které produkovaly karbapenemázu typu GES.

In 2018–2019, 1 610 strains of *Pseudomonas aeruginosa* were referred to the National Reference Laboratory for Antibiotics for confirmation of carbapenemase production. Based on MIC values, all isolates were screened for susceptibility to selected antibiotics. Quantitative PCR confirmed the presence of GES carbapenemase in 141 (8.76%) strains. All positive strains turned out to be resistant to ceftazidime/tazobactam, gentamicin, and fluoroquinolones (levofloxacin and ciprofloxacin). The identification of GES carbapenemase using MALDI-TOF MS (meropenem degradation rate measurement) was not reliable enough, with 40% of these isolates only showing a positive result. GES carbapenemase producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* showed a 13% increase in 2019 compared to 2018.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2020; 29(5): 207–209

**Klíčová slova:** *Pseudomonas aeruginosa*, karbapenemázy, GES

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenemases, GES

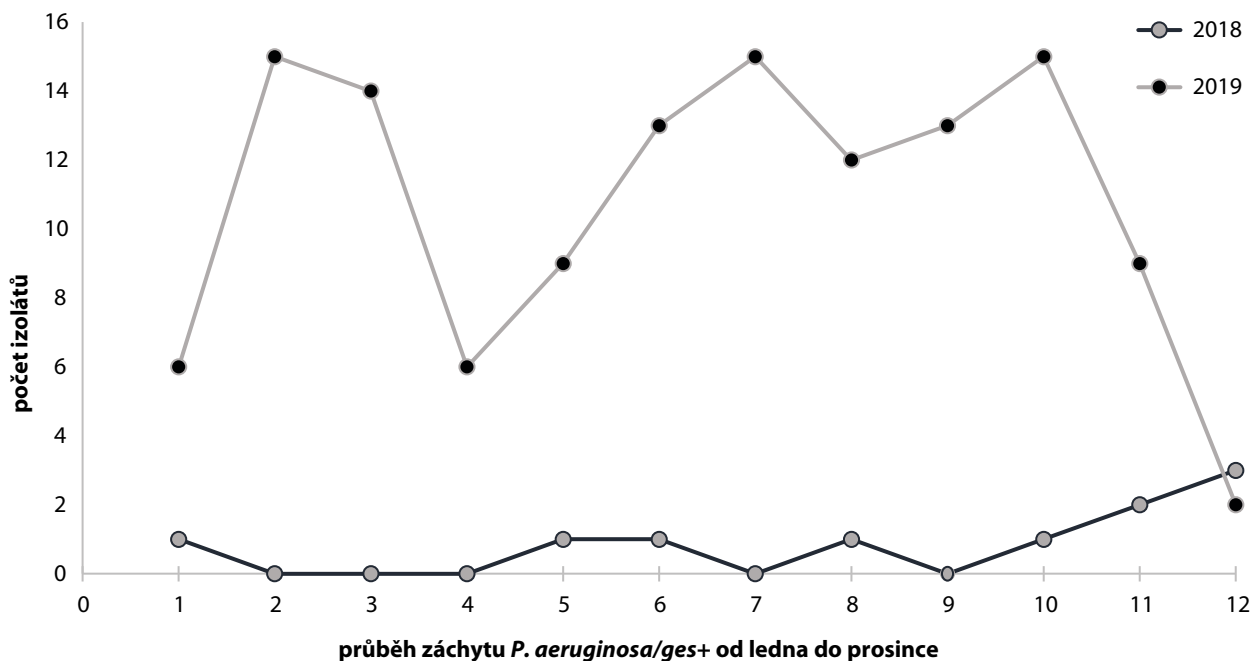
Karbapenemy jsou betalaktamová antibiotika, které se uplatňují zejména v léčbě těžkých nozokomiálních infekcí způsobených multirezistentními kmeny, včetně producentů betalaktamáz (širokospektré betalaktamázy typu ESBL, AmpC a jiné). Používají se zejména v úvodní terapii sepse, ventilátorové pneumonie, u těžkých nitrobřišních infekcí, neuroinfekcí a komplikovaných močových infekcí [1]. Jejich aktivita spočívá v úspěšné penetraci přes bakteriální membránu, afinitě k penicilin vázícím proteinům (PBP – 1, PBP – 2), následné inhibici syntézy buněčné stěny a smrti buňky. Účinnost těchto antibiotik je v současnosti ohrožena v důsledku šíření kmenů produkujících enzymy s hydrolytickou aktivitou tzv. karbapenemázy. Přidružený mechanismus rezistence, tj. snížená permeabilita vnější membrány může také výrazně ovlivnit účinnost karbapenemů v terapii [2]. Od 90. let, kdy byly popsány první karbapenemázy, se tyto enzymy rozšířily globálně do celého světa [3].

Kromě vertikálního či horizontálního transportu, mohou být karbapenemázy i přirozenou součástí genomu bakterií. Inherentní karbapenemázy byly detekovány u *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas* spp.,

*Flavobacterium* spp. a *Bacteroides fragilis* [4]. Dle struktury aktivního místa uvnitř karbapenemáz (Amblerova klasifikace betalaktamáz) existují serinové betalaktamázy a metalobetalaktamázy (kovový iont v aktivním místě enzymu). Tato práce pojednává o záchytu karbapenemáz typu GES (Guiana – širokospektrá betalaktamáza), které na základě struktury aktivního místa patří do skupiny A karbapenemáz. Jedná se o serinové betalaktamázy, které mohou být slabě inhibovány inhibitory betalaktamáz (kyselina klavulanová, tazobaktam). Kromě GES do této skupiny patří i jiné karbapenemázy: SME, IMI, NMC-A a KPC.

Výskyt serinových karbapenemáz u *Pseudomonas aeruginosa* není tak častý, jako je tomu v případě metalobetalaktamáz [5]. Skupina GES může být lokalizovaná jak na chromozomu, tak na integronech v rámci plazmidů, které jim v populaci zabezpečují snadnou diseminaci. Dosud bylo popsáno přibližně 31 variant rodiny GES. Karbapenem - hydrolytickou aktivitu mají ale jen některé z nich (GES-2, -4, -5, -6, -14, -15, -16, -18, -20, -24) [6]. Ostatní zástupci této rodiny připomínají svou aktivitou spíše ESBL. Karbapenemáza typu GES bývá detekována zejména u druhů *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, vyskytuje se však i u zástupců řádu *Enterobacterales* (*Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* spp.) [7].

V důsledku rychlého šíření kmenů produkujících karbapenemázy je detekce těchto enzymů velmi důležitou, a díky velké diverzitě jejich genů často i obtížnou, součástí

Graf 1: Záchyt izolátů *P. aeruginosa* obsahujících ges v letech 2018 a 2019 v NRL pro ATB

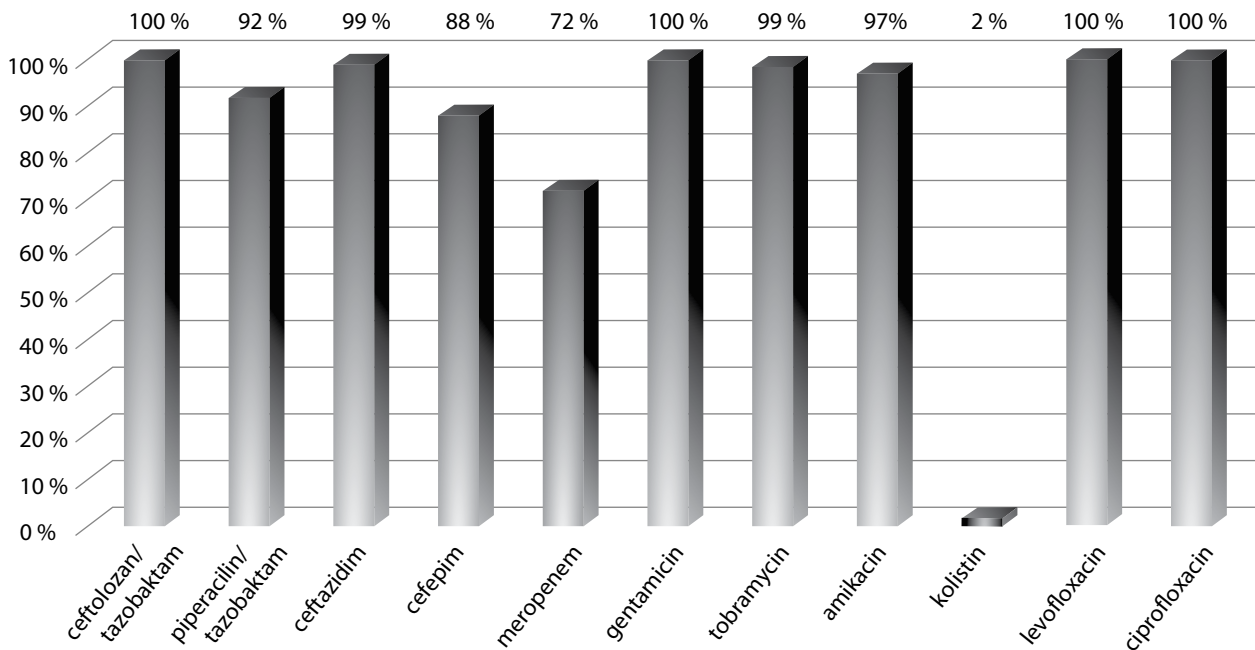
laboratorního vyšetření. Karbapenemáza typu GES není tak snadno detekovatelná jako jiné karbapenemázy. Aktivitu této serinové karbapenemázy není možné vyšetřovat pomocí kyseliny dipikolinové a chelátátoru kovových iontů (např. EDTA) používaných pro detekci metalobetalaktamáz (MBL). Test pomocí temocilinu (marker pro karbapenemázy typu OXA-48), či kyseliny fenylborité (inhibitor KPC) jsou také neúčinné. Biochemické testy (CarbaTest, RESIST-4, Xpert Carba-R a jiné) nezachytí změny pH (změna zbarvení) vždy úspěšně. Navíc, tyto testy jsou navrženy pro detekci karbapenemáz s větší frekvencí výskytu (OXA–like, KPC, VIM, NDM) a ne pro atypickou karbapenemázu jakou je GES [8]. Hydrolytický rozpad meropenemu, který je měřen pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS) tento typ enzymů ne vždy úspěšně zaznamená. Nápomocné jsou v tomto případě výsledky vyšetření citlivosti, zejména karbapenemů a ceftolozan/tazobaktamu (disková difuzní metoda nebo minimální inhibiční koncentrace; MIC), jednoznačným průkazem je pak detekce pomocí kvantitativní PCR (qPCR), či sekvenace.

Národní referenční laboratoř pro antibiotika (NRL pro ATB, Státní zdravotní ústav) monitoruje výskyt karbapenemáz ve spolupráci s Pracovní skupinou pro monitorování rezistence (PSMR). U všech izolátů *P. aeruginosa* zaslaných do NRL pro ATB je bujónovou mikrodiluční metodou stanovena citlivost (MIC) k vybraným antibiotikům (ceftolozan/tazobaktam, piperacilin/tazobaktam, ceftazidim, cefepim, meropenem, gentamicin, tobramycin, amikacin, kolistin, levofloxacin, ciprofloxacin) dle doporučení EUCAST. U izolátů *P. aeruginosa* s MIC meropenemu > 2 mg/L [9] se ověřuje přítomnost karbapenemáz pomocí fenotypové detekce, která je založená na zjištění případných deformací inhibičních zón v diskového difuzního testu. Při něm se kombinuje specifické uspořádání disků s antibiotiky (imipenem,

meropenem, ceftazidim) s 0,1M kyselinou EDTA (1μl), tzv. MBL test [10]. Jako pomocný test je používána detekce hydrolyzy meropenemu systémem MALDI-TOF MS (Microflex Bruker, Bremen, Germany) a qPCR (Bio-Rad).

V letech 2018 až 2019 bylo do NRL pro ATB zasláno ke confirmaci přítomnosti karbapenemáz celkem 1610 kmenů *P. aeruginosa* (2018/680; 2019/930). Celkový podíl kmenů z hemokultur byl 12 % (196), 1412 kmenů bylo izolovaných z různých dalších klinických materiálů (87,5 % (595/680), 2018; 87,8 % (817/930), 2019). V obou letech dominovaly hlavně izoláty zachycené z moči (35,3 % (240/680), 2018; 25,9 % (241/930), 2019).

Přítomnost karbapenemázy typu GES byla potvrzena pomocí qPCR celkem u 141 kmenů (8,7 %), v roce 2018 to bylo u 10 izolátů (1,5 %), v roce 2019 se jejich počet zvýšil na 131 izolátů (14 %) (Graf 1). Celkem 74 % kmenů pocházelo z Prahy, zbylé izoláty pocházely z lokalit Beroun, Kladno, Kolín, Liberec, Litoměřice, Náchod, Nový Jičín, Ostrava a Znojmo. Všechny kmeny *P. aeruginosa*/ges<sup>+</sup> byly rezistentní k ceftolozan/tazobaktamu, gentamicinu, fluorochinolonům (levofloxacin, ciprofloxacin) a nevykazovaly deformaci inhibičních zón při MBL diskovém difuzním testu. Vysoký podíl rezistence byl zaznamenán u ceftazidimu (99 %), tobramycinu (99 %), amikacinu (97 %), piperacilin/tazobaktamu (92 %), cefepimu (88 %) a meropenemu (72 %) (Graf 2). Tři izoláty byly rezistentní ke kolistinu (2 %) bez prokázání přítomnosti genů *mcr*. Žádná z dostupných fenotypových metod spolehlivě nedetekuje přítomnost karbapenemázy typu GES. Hmotnostní spektrometrie, která se v detekci jiných karbapenemáz jeví jako velmi účinná metoda, nedosahuje u karbapenemázy typu GES takové spolehlivosti. Vzhledem k tomu, že metoda MALDI-TOF MS je primárně určena pro detekci rozpadu karbapenemů v řádu *Enterobacterales* a rodu *Acinetobacter* spp. [11,

Graf 2: Přehled antibiotické rezistence u *P. aeruginosa/ges<sup>+</sup>* v letech 2018 až 2019

12, 13], detekce karbapenemáz v jiných druzích bakterií nemusí být tak spolehlivá. U kmenů produkujících GES-5, který se vyznačuje hydrolytickou aktivitou karbapenemů, byly zaznamenány falešně negativní výsledky rozpadu meropenemu, zatímco u kmenů produkujících karbapenemázy s ESBL aktivitou (např. GES-1) se objevují falešně pozitivní výsledky [14]. Pozitivní výsledek rozkladu meropenemu (MALDI-TOF MS) byl zaznamenán jen u 57 kmenů (40 %) *P. aeruginosa/ges<sup>+</sup>*.

I když karbapenemázy typu GES nejsou v populaci tak hojně zastoupeny, jako například metalobetalaktamázy, jsou nebezpečné z důvodu možného skrytého šíření v důsledku jejich obtížné fenotypové detekce. I z těchto důvodů má monitoring výskytu/šíření tohoto typu karbapenemáz své opodstatnění.

Poděkování: NRL pro ATB děkuje za spolupráci všem laboratořím v rámci skupiny PSMR (Pracovní skupina pro monitorování rezistence).

#### LITERATURA

1. Manageiro V, Romão R, Moura IB et al. Molecular Epidemiology and Risk Factors of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolates in Portuguese Hospitals: Results From European Survey on Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE). *Front Microbiol.* 2018; 9: 2834.
2. Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature.* 2000; 406: 775–781.
3. Diene SM and Rolain JM. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20: 831–838.
4. Codjoe FS and Donkor ES. Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci (Basel).* 2017; 21(6): 1 – 28.
5. Queenan AM and Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20: 440–458.
6. Bonnin RA, Jousset AB, Urvoy N et al. Detection of GES-5 Carbapenemase in *Klebsiella Pneumoniae*, a Newcomer in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61:e02263-16.
7. Hishinuma T, Tada T, Kuwahara-Arai K et al. Spread of GES-5 carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Japan due to clonal expansion of ST235. *PLoS One.* 2018; 13: e0207134.
8. Baeza LL, Pfennigwerth N, Greissl C, et al. Comparison of five methods for detection of carbapenemases in *Enterobacteriales* with proposal of a new algorithm. *Microbiol Infect.* 2019; 25: 1286.e9-1286.e15.
9. [http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/doporucene\\_postupy/surveillance\\_g/aktivni\\_surveillance\\_multi-rezistentnich\\_gramnegativnich\\_bakterii.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/doporucene_postupy/surveillance_g/aktivni_surveillance_multi-rezistentnich_gramnegativnich_bakterii.pdf)
10. Hrabák J, Vaníš V, Bergerová T, et al. Průkaz metalo-β-laktamáz (MBL) u gramnegativních bakterií. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2007; 16(9): 417 – 422.
11. Burckhardt I and Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49 (9): 3321–3324.
12. Carvalhaes CG, Cayô R, Assis DM et al. Detection of SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* and class D β-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates by use of liquid chromatography-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. 2013; *J. Clin. Microbiol.* 51 (1), 287–290.
13. Vogne C, Prod'hom G, Jaton K et al. A simple, robust and rapid approach to detect carbapenemases in Gram-negative isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: validation with triple quadrupole tandem mass spectrometry, microarray and PCR. 2014; *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 20(12): O1106–1112.
14. Miltgen G, Plésiat P, Mille A et al. Detection of Carbapenemase Activity in *Pseudomonas Aeruginosa* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). 2018; *J Microbiol Methods.* 2018; 145: 66–68.

Lucia Mališová, Vladislav Jakubů,  
Katarína Pomorská, Helena Žemličková  
NRL pro antibiotika, CEM, SZÚ