

Výskyt *Enterobacteriaceae* produkujících karbapenemázy (CPE, Carbapenemase Producing *Enterobacteriaceae*) v České republice v letech 2014–2015

The incidence of Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae in the Czech Republic in 2014 – 2015

Helena Žemličková, Anna Skálová, Vladislav Jakubů, Kateřina Chudějová, Veronika Rotová, Petra Španělová, Costas C. Papagiannitsis, Jaroslav Hrabák

Souhrn • Summary

Enterobakterie produkující karbapenemázu (CPE – Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*) představují globální problém, který má přímý vliv na zvládnutí jimi způsobených závažných infekcí. V Evropě dochází v některých státech k nárůstu karbapenemové rezistence. Existují však státy (např. Izrael), kde se situaci podařilo stabilizovat a dokonce i zlepšit. V roce 2014 bylo v České republice zaznamenáno 19 případů kolonizace nebo infekce CPE. V roce 2015 tento počet stoupl na 30 případů. Přesto lze Českou republiku hodnotit jako zemi s nízkým výskytem CPE. Dosud byly zaznamenány pouze ojedinělé outbreaky, které se díky metodickému pokynu vydanému Ministerstvem zdravotnictví daří zvládat.

Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (CPE) represent a global problem which has a direct effect on the treatment of serious infections caused by such bacteria. In Europe, carbapenem resistance has been increasing, but in some countries (e.g., Israel), the prevalence of CPE stabilized or is even declining. In 2014, 19 cases of colonization or infection by CPE was detected in the Czech Republic. In 2015, the number of those cases increased to 30. Even so, the Czech Republic remains a low-prevalence country. Only few sporadic outbreaks have been identified. Those outbreaks, however, were quickly brought under control by following the Czech guidelines issued by the Ministry of Health.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2016; 25(6-7): 235–238.

Klíčová slova: karbapenemázy, OXA-48, enterobakterie, surveillance

Keywords: carbapenemases, OXA-48, enterobacteria, surveillance

Úvod

Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* tvoří běžnou součást intestinální mikroflóry člověka, zároveň ovšem patří k častým původcům komunitních infekcí a infekcí spojených se zdravotní péčí. Rezistence k antibiotikům se u těchto bakterií šíří velice rychle a během posledních dekád došlo k rapidnímu nárůstu počtu enterobakterií rezistentních k aminopenicilinům a cefalosporinům.

Trendy antibiotické rezistence invazivních bakterií jsou sledovány v rámci mezinárodní evropské surveillance antibiotické rezistence European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) [1]. Zatímco v ČR je u enterobakterií rezistence ke karbapenemům pouze ojedinělá (0,1 % v roce 2014), na úrovni Evropy došlo k signifikantnímu nárůstu frekvence rezistence, z 6 % v roce 2011 na 7,3 % v roce 2014. Výskyt rezistence se v jednotlivých státech velmi liší a procento izolátů rezistentních ke karbapenemům se v evropských státech pohybuje od 0 % až k 62,3 % (Řecko).

Závažným problémem současnosti je vzestup rezistence ke karbapenemovým antibiotikům u enterobakterií, která je zprostředkována metalo-beta-laktamázi (především typu VIM nebo NDM), serinovými karbapenemázami (typu

KPC) nebo oxacilinázami (typ OXA-48). Mikrobiologický průkaz produkce karbapenemázy je poměrně obtížný a vyjma základního fenotypového screeningu za použití indikátorových antibiotik, je třeba potvrdit přítomnost enzymu detekcí karbapenemázové aktivity (např. MALDI-TOF MS detekce, Carba NP test), případně prokázat přítomnost genu rezistence metodou PCR [2, 3].

Výskyt různých typů karbapenemáz má určitá geografická specifika. Na příklad v Itálii a Izraeli dominují producenti KPC (obvykle u *Klebsiella pneumoniae* CC258), VIM a KPC v Řecku, typ OXA-48 v severní Africe, Turecku a státech s úzkými vazbami na tyto lokality (např. Francie a Německo). V posledních letech došlo k celosvětovému rozšíření metalo-beta-laktamázy NDM z indického subkontinentu. Za globální šíření genů karbapenemáz v bakteriálních populacích je zodpovědný horizontální přenos genetické informace především epidemicky úspěšných vysoce konjugativních plazmidů a také některých epidemicky úspěšných klonů [4].

Jelikož přístup k mikrobiologické diagnostice se v různých státech liší, povědomí o prevalenci CPE, včetně zastoupení určitých typů karbapenemáz lze anticipovat z nálezů pacientů, kteří jsou z těchto regionů repatriováni.

Situace v České republice

Výskyt producentů karbapenemáz je v ČR systematicky monitorován od roku 2011. V porovnání s předchozími roky, došlo v roce 2015 k nárůstu počtu případů, který byl patrně způsobený 3 outbreaky *Klebsiella pneumoniae*,

Escherichia coli a *Enterobacter cloacae* produkujícími OXA-48 ve FN Plzeň (6 pacientů), FN Motol (2 pacienti) a FN Ostrava (3 pacienti). U 4 případů byl popsán *in vivo* přenos plazmidu kódujícího gen bla_{OXA-48} (IncL) na jiný sekvenční typ případně jiný druh během několika dní od záchytu prvního producenta karbapenemázy OXA-48. Zatímco v letech 2011–2013 bylo zaznamenáno celkem 49 případů (2011 – 16 případů, 2012 – 18 případů, 2013 – 15 případů), v roce 2014 bylo v ČR evidováno celkem 19 případů kolonizace nebo infekce CPE, v roce 2015 to bylo 30 případů. U 6 pacientů se jednalo o importovanou nákazu (Egypt, Indie, Čína, Tunisko, Rumunsko, Vietnam, Rusko) nebo byl pacientem cizinec (4 případy – Itálie, Ukrajina [3]).

Zapojení České republiky do mezinárodních studií

Česká republika je prostřednictvím Ústavu mikrobiologie LF UK v Plzni a Národní referenční laboratoře pro antibiotika SZÚ zapojena do několika mezinárodních pracovních skupin zaměřených na problematiku produkce karbapenemáz u enterobakterií a pseudomonád. Nejvýznamnější aktivitou bylo zapojení do European Study on Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE), která byla organizována prostřednictvím ECDC. Během této aktivity se čeští reprezentanti (doc. Hrabák, doc. Žemličková) podíleli na vypracování několika studií [5, 6]. Významná byla 6měsíční studie, která v ČR probíhala v deseti vybraných nemocnicích na přelomu let 2013/2014 [7]. V rámci této studie byly v ČR zachyceny pouze 2 izoláty CPE.

Další rozvíjející se aktivitou zaměřenou na enterobakterie produkující karbapenemázy jsou studie organizované v rámci ESCMID Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance (ESGARS), zde je reprezentantem za ČR doc. Hrabák.

Šíření karbapenemáz typu OXA-48 v České republice

Do konce roku 2013 byly v České republice detekovány pouze dva sporadické případy výskytu karbapenemázy

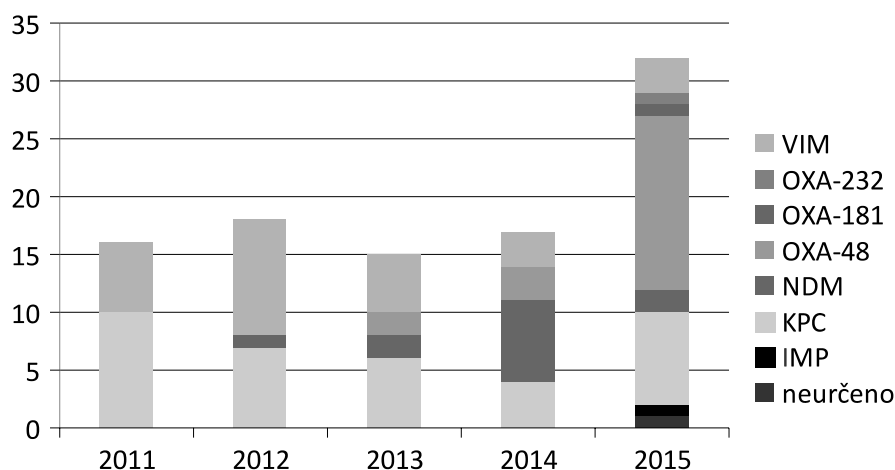
OXA-48. Od ledna roku 2014 do konce roku 2015 došlo na našem území k výskytu třech významných outbreaků, zahrnujících celkem 11 pacientů a dalších devíti sporadických případů. Všechny outbreaky byly spojeny se šířením vysoce konjugativního Inc L plazmidu o velikosti přibližně 60 kb, který je spojován s nynější diseminací karbapenemázy typu OXA-48 v Evropě. U čtyř pacientů došlo k prokazatelnému horizontálnímu přenosu Inc L plazmidu nesoucího gen bla_{OXA-48} . Hodnoty minimální inhibiční koncentrace ke karbapenemům byly u většiny izolátů v citlivé kategorii dle hraničních hodnot EUCAST. Tento fakt může významně přispívat k nerozpoznanému šíření karbapenemázy OXA-48, což ve spojení s vysokým rizikem horizontálního přenosu představuje významnou klinicko-epidemiologickou hrozbu.

V období 2014–2015 bylo zachyceno a následně analyzováno celkem 21 producentů OXA-48 (16 *Klebsiella pneumoniae*, 4 *Escherichia coli*, 1 *Enterobacter cloacae*) získaných od dvaceti pacientů, hospitalizovaných v celkem sedmi českých nemocnicích. Čtyři pacienti měli epidemiologicky významnou cestovní anamnézu (Rusko, Rumunsko, Tunisko, Ukrajina), povětšinou byli přímo repatriováni ze zahraničního zdravotnického zařízení. Naprostá většina izolátů pocházela od pacientů hospitalizovaných na jednotkách intenzivní péče. Dle MLST (MultiLocus Sequence Typing) bylo zjištěno celkem 11 sekvenčních typů (ST) u *K. pneumoniae*, 3 sekvenční typy *E. coli*. U naprosté většiny izolátů byl gen bla_{OXA-48} součástí Inc L plazmidu, ve třech případech byl gen bla_{OXA-48} lokalizován chromozomálně. V současnosti jsou všechny plazmidy kompletně sekvenovány pro zjištění jejich evoluční příbuznosti.

Největší outbreak (časové rozmezí: duben 2014 až prosinec 2015) čítající celkem 6 pacientů byl zaznamenán ve Fakultní nemocnici v Plzni a byl spojen převážně s šířením klonu ST101. Pravděpodobným zdrojem těchto kmenů je zřejmě hospitalizace dvou pacientů s předchozí cestovní anamnézou (Rumunsko, jeden případ neznámý). Všichni pacienti byli hospitalizováni na stejném oddělení intenzivní péče. U dvou pacientů došlo k prokazatelnému horizontálnímu přenosu Inc L plazmidu

z kmene *Klebsiella pneumoniae* na kmen *Escherichia coli*. Během doby trvání outbreaku, a následně 3 měsíce po zachycení posledního OXA-48-pozitivního izolátu, byl prováděn pravidelný týdenní screening všech pacientů hospitalizovaných na daném oddělení (výtěr z krku, nosu, rektu). K detekci pozitivních izolátů byl použit MacConkey agar s obsahem meropenemu (0,5 mg/L) a hydrogenuhlčitanu sodného (50 mM). Pacienti se záchytem karbapenemáza-pozitivního kmene byli převedeni do režimu izolace. Přes opakované snahy o zjištění možné příčiny přenosu, nebyl možný rezervoár identifikován.

Graf 1: PŘEHLED ZACHYCENÝCH TYPŮ KARBAPENEMÁZ V LETECH 2011–2015



Poznámka: V roce 2015 byly zaznamenány dva případy současné produkce dvou typů karbapenemáz (IMP+VIM a NDM+OXA-232).

Doporučení pro detekci a interpretaci karbapenemáz u *Enterobacteriaceae*

Přestože je výskyt producentů karbapenemáz na území České republiky nízký, měla by být každá laboratoř se statutem antibiotického střediska schopná základního vyšetření produkce karbapenemázy.

Pro základní skrínig a aktivní vyhledávání podezřelých kmenů lze využít epidemiologický předěl karbapenemových antibiotik. Nutno podotknout, že se epidemiologické předěly liší u jednotlivých druhů z čeledi *Enterobacteriaceae* a jednotlivých karbapenemů. Skrínigové hodnoty jsou uvedeny v tabulce 1 [2]. Ovšem karbapenemázy typu OXA-48 mohou mít velmi nízké MIC / velké průměry inhibičních zón ke karbapenemům, proto nemusí být na první pohled snadno detekovatelné ani za použití uvedených skrínigových hodnot. U takových kmenů může na přítomnost karbapenemázy typu OXA-48 upozornit snížená citlivost k některému z karbapenemů se současnou citlivostí k cefalosporinům třetí a čtvrté generace.

Pro potvrzení karbapenemázové aktivity lze použít některou z přímých metod detekce hydrolýzy amidové vazby beta-laktamového kruhu karbapenemu [2]. Mezi tyto metody patří Carba NP test, který je dostupný komerčně, případně MALDI-TOF MS detekce. V případě karbapenemázy typu OXA-48 je významným faktorem rekarboxylace residua lysinu v aktivním místě, kterou lze zajistit zvýšením koncentrace CO₂ v reakčním pufru. Bohužel toto nelze principiálně zajistit v případě Carba NP testu, proto tento test vykazuje nízkou senzitivitu u karbapenemáz tohoto typu [8, 9].

MALDI-TOF MS detekce karbapenemázové aktivity s přidavkem hydrogenuhličitanu amonného umožňuje zvýšit senzitivitu metody pro karbapenemázy typu OXA-48 [8, 9]. Oproti publikované metodě [10] je reakční pufr následujícího složení: 20 mM Tris-HCl, 0,01 % sodium dodecyl sulfát (SDS), 50 mM NH₄HCO₃, pH 7,0. Při přípravě je nejprve pH pufru s Tris-HCl upraveno na hodnotu 7,0, následně je přidán hydrogenuhličitan amonný, pH znovu upraveno a finálně přidán 0,01 % SDS a meropenem do výsledné koncentrace 0,1 mM. Alikvotovaný roztok reakčního pufru lze uchovávat při -80 °C po dobu minimálně 1 měsíce. Nelze opakovaně zmrazit. Měření a interpretace výsledků jsou prováděny dle dříve popsanych doporučení [8, 9].

V případě outbreaků je možné použít PCR pro rychlou detekci. Tato metoda však detekuje pouze známé varianty

karbapenemáz. Proto jí nelze považovat za metodu zlatého standardu [2].

Pro podmínky našich laboratoří tak lze doporučit metodu detekce hydrolýzy karbapenemů pomocí MALDI-TOF MS nebo Carba NP test. Suspektní izoláty by měly být dále odesílány ke confirmaci do Národní referenční laboratoře pro antibiotika SZÚ nebo do Laboratoře antibiotické rezistence a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii Ústavu mikrobiologie LF UK v Plzni. Zásilané izoláty musí být doplněné průvodkou zadanou prostřednictvím webové aplikace dostupné na internetových stránkách Národní referenční laboratoře pro antibiotika (<http://apps.szu.cz/earsnet/kp/pruvodka.php>).

Pro interpretaci výsledků vyšetření citlivosti neexistuje v Evropě shoda [11]. Lze očekávat, že i EUCAST přehodnotí svá doporučení založená na principu „as found“ [C. Giske, osobní sdělení]. Interpretace by tak měla vždy vycházet z klinického stavu pacienta a navržená terapie reflektovat vyšší pravděpodobnost selhání léčby při použití karbapenemů.

Závěr

Přestože je výskyt CPE v České republice velmi nízký, nelze tuto situaci podcenit. V poslední době dochází na našem území k šíření producentů karbapenemáz typu OXA-48. Ty se mohou šířit i z komunity, čímž představují závažný epidemiologický problém. Rovněž jejich detekce v podmínkách rutinní laboratoře může být velmi obtížná. Zároveň běžně dochází k horizontálnímu přenosu plazmidů kódujících gen *bla*_{OXA-48} (IncL) i v podmínkách *in vivo*, a tak k šíření rezistence na ostatní příslušníky čeledi *Enterobacteriaceae*. Infekce způsobené producenty OXA-48 proto mohou být obtížně zvladatelné.

Každá diagnostická laboratoř na úrovni antibiotického střediska by proto měla být schopná provádět základní testy pro detekci karbapenemáz. Při výskytu CPE, ať se jedná o kolonizaci nebo infekci pacienta, je nezbytně nutné dodržovat Metodický pokyn vydaný Ministerstvem zdravotnictví ČR [12], neboť jen tak lze výskyt těchto bakterií udržet pod kontrolou.

LITERATURA

1. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2015.

Tabulka 1: KLINICKÉ BREAK-POINTY A SKRÍNINGOVÉ HODNOTY PRO KARBAPENEMY U PŘÍSLUŠNÍKŮ ČELEDI *ENTEROBACTERIACEAE*

	Klinický break-point (hodnoty pro citlivost)				Skrínigové hodnoty	
	MIC [mg/L]		Disková difúzní metoda [mm]		MIC [mg/L]	Disková difúzní metoda [mm]
	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI		
Ertapenem	≤0.5	≤0.25	≥25	≥23	>0.125	<25
Imipenem	≤2	≤1	≥22	≥23	>1	<23
Meropenem	≤2	≤1	≥22	≥23	>0.125	<25

2. Hrabák J, Papagiannitsis CC, Chudáčková E. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* 2014; 20: 839–853.
3. Kalpoe JS, Al Naiemi N, Poirel L, Nordmann P. Detection of an Ambler class D OXA-48-type beta-lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* strain in The Netherlands. *J Med Microbiol.* 2011; 60(Pt 5): 677–678.
4. Ruppe E, Armand-Lefevre L, Estellat C, Consigny PH, El Mniai A, Boussadia Y, et al. High rate of acquisition but short duration of carriage of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* after travel to the Tropics. *Clin Infect Dis.* 2015; 61(4): 593–600.
5. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, Vatopoulos A, Gniadkowski M, Toth A, Pfeifer Y, Jarlier V, Carmeli Y, CNSE Working Group.: Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveilance* 2010, 15(46): pii=19711.
6. Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambić Andrašević A, Cantón R, Carmeli Y, Friedrich AW, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Nordmann P, Poirel L, Rossolini GM, Seifert H, Vatopoulos A, Walsh T, Woodford N, Donker T, Monnet DL, Grundmann H and the European Survey on Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Eurosurveillance* 2013; 18(28):pii=20525.
7. Hrabák J, Študentová V, Jakubů V, Adámková V, Dvořáková L, Balejová M, Bergerová T, Chmelařová E, Ježek P, Kabelíková P, Kolář M, Paterová P, Tejkalová R, Papagiannitsis CC, Žemličková H. Prevalence Study on Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Czech Hospitals – Results from Czech Part of European Survey on Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE). *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie* 64, 2015: 87–91.
8. Studentova V, Papagiannitsis CC, Izdebski R, Pfeifer Y, Chudackova E, Bergerova T, Gniadkowski M, Hrabak J. Detection of OXA-48-type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in diagnostic laboratories can be enhanced by addition of bicarbonates to cultivation media or reaction buffers. *Folia Microbiologica* 2015; 60: 119–129.
9. Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, Petinaki E, Hrabák J. MALDI-TOF MS meropenem hydrolysis assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for the direct detection of carbapenemase activity. *Journal of Clinical Microbiology* 2015; 53: 1731–1735.
10. Hrabák J, Walková R, Žemličková H, Bergerová T, Urbášková P. Detekce karbapenemáz u enterobakterií pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (MS), fenotypových inhibičních testů a molekulárně-mikrobiologickými technikami. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2012; 21(4): 148 – 156.
11. Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM, Ho PL, Keness Y, Doi Y, Paterson D, Woodford N (2012) Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *J Antimicrob Chemother.* 2002; 67: 1569–1577.
12. Ministerstvo zdravotnictví. Metodický pokyn ke kontrole výskytu importovaných případů kolonizace a/nebo infekce enterobakteriemi produkujícími karbapenemázu. *Věstník Ministerstva zdravotnictví ČR* 2012; 8: 10–19.

Helena Žemličková
Vladislav Jakubů
Petra Španělová
NRL pro antibiotika
Centrum epidemiologie a mikrobiologie
Státní zdravotní ústav, Praha

Anna Skálová
Kateřina Chudějová
Veronika Rotová
Costas C. Papagiannitsis
Jaroslav Hrabák
Laboratoř antibiotické rezistence
a aplikací hmotnostní spektrometrie
v mikrobiologii,
Ústav mikrobiologie a Biomedicínské centrum,
Lékařská fakulta v Plzni,
Universita Karlova v Praze,
Alej Svobody 76, 323 00 Plzeň