

Multirezistentní *Acinetobacter baumannii* nesoucí geny pro karbapenemázy NDM-1 a OXA-23 importované do České republiky

Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii strain carrying genes encoding carbapenemases NDM-1 and OXA-23 imported to the Czech Republic

Alexandr Nemeč, Lenka Křížová, Martina Maixnerová, Andrea Šmejcová, PSA*

Souhrn • Summary

Multirezistentní kmen *Acinetobacter baumannii* nesoucí gen pro metalo- β -laktamázu NDM-1 byl letos v červenci zachycen u pacienta hospitalizovaného na oddělení intenzivní péče v Ústí nad Labem. Kmen byl importován z Egypta a je in vitro rezistentní k β -laktámům a ostatním klinicky relevantním antibiotikům kromě kolistinu, tobramycinu, netilmicinu, doxycyklinu a tigecyklinu. Nese též gen pro karbapenemázu OXA-23 (v České republice dosud nedoložený) a řadu dalších genetických determinantů rezistence.

A multidrug-resistant Acinetobacter baumannii strain carrying the gene encoding metallo- β -lactamase NDM-1 was isolated from a patient hospitalized in an intensive care unit in Ústí nad Labem. The strain was imported from Egypt and is in vitro resistant to β -lactams and to other clinically relevant antimicrobial agents except for colistin, tobramycin, netilmicin, doxycycline and tigecycline. It also carries the gene encoding the OXA-23 carbapenemase (not yet reported from the Czech Republic) and a number of other resistance determinants.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2011; 20(8): 295–298.

Klíčová slova: metalo- β -laktamáza, rezistence ke karbapenemům, genotypizace
Keywords: metallo- β -lactamase, carbapenem resistance, genotyping

Multirezistentní (MR) *Acinetobacter baumannii* je významný původce infekcí pacientů v nemocniční intenzivní péči [1]. Celosvětovým problémem posledního desetiletí je rostoucí proporce kmenů *A. baumannii* rezistentních ke karbapenemům, původně nejúčinnějším antibiotikům pro léčbu acinetobakterových infekcí. Tento trend neminul ani Českou republiku. Studium populační struktury a antibiotické rezistence nemocničních izolátů acinetobakterů prováděné naší laboratoří od počátku 90. let ukázalo, že zatímco kmeny *A. baumannii* z let 1991–1997 byly ke karbapenemům běžně citlivé [2], proporce izolátů necitlivých (MIK k imipenemu a/nebo meropenemu ≥ 8 mg/l) k těmto antibiotikům dosahovala v letech 2004–2005 21 % [3]. Tato změna byla spojena s rozšířením MR kmenů epidemického Evropského (EU) klonu II rezistentních ke karbapenemům, jež nahradily populaci EU klonu I převažující v České republice v 90. letech. V poslední době byla publikována řada studií ukazujících, že EU klon II má zásadní, nikoliv však výlučnou, roli při celosvětovém šíření karbapenemové rezistence u acinetobakterů [4, 5].

Rezistenci *A. baumannii* ke karbapenemům způsobují různé mechanismy omezující účinek těchto antibiotik na enzymy syntetizující peptidoglykan buněčné stěny. Ač se na ní může podílet snížení koncentrace karbapenemů v místě zásahu pomocí aktivního efluxu (systém Ade-ABC) či sníženého influxu (např. ztráta porinu CarO) nebo modifikace proteinů vázajících penicilin, hlavní roli v ní mají β -laktamázy s karbapenemázovou aktivitou náležející k serinovým karbapenemázám typu OXA (*carbapenem-hydrolysing class D β -lactamases*, CHDL) nebo metalo- β -laktamázám (MBL) [1]. CHDL se podle sekvenční podobnosti člení do pěti skupin, které se téměř výlučně vyskytují pouze u rodu *Acinetobacter*: oxacilinázy typu OXA-23, OXA-40, OXA-58, OXA-143 a OXA-51 [1, 6]. První čtyři skupiny jsou získané CHDL (s výjimkou *Acinetobacter radioresistens*, u něhož je gen pro oxacilinázu typu OXA-23 původní součástí chromozomu), jejichž geny jsou asociované s mobilními genetickými elementy a jež se vyskytují pouze u některých kmenů. Oproti tomu chromozomální gen pro oxacilinázu typu OXA-51 (*bla*_{OXA-51-like}) je specifickou a stabilní součástí druhového genomu *A. baumannii* (dosud je popsáno 68 aminokyselinových variant OXA-51). Expresí *bla*_{OXA-51-like} je obvykle nízká a nevede ke karbapenemové rezistenci. Může však být zvýšena umístěním inzerční sekvence *ISA-bal* nesoucí silný promotor do regulační oblasti genu, což vede ke snížení citlivosti nebo rezistenci ke karbapene-

* Pracovní skupina pro acinetobaktery (další členové): MUDr. Magda Balejová (Laboratoř bakteriologie, Nemocnice České Budějovice), MUDr. Markéta Hanslianová (Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Brno Bohunice), MUDr. Petr Ježek (Oddělení klinické mikrobiologie a parazitologie, Oblastní nemocnice Příbram), Mgr. Eva Krejčí, PhD. (Oddělení bakteriologie a mykologie, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě), MUDr. Oto Melter, PhD. (Ústav lékařské mikrobiologie 2. LF UK a Fakultní nemocnice v Motole, Praha), MUDr. Pavla Paterová (Ústav klinické mikrobiologie LF UK a Fakultní nemocnice v Hradci Králové).

mům [1]. *ISAbal* nebo jiné inzerční sekvenční se mohou podílet i na mobilizaci a/nebo zvýšené expresi získaných CHDL. MBL se u acinetobakterů oproti CHDL vyskytují vzácněji. U *A. baumannii* byly prokázány MBL typů IMP, VIM, SIM [1] ale též nedávno popsané karbapenemázy typu NDM (NDM-1 a NDM-2) [7, 8]. Z uvedených karbapenemázových genů byly u české populace *A. baumannii* dosud doloženy *bla*_{OXA-51-like} s *ISAbal* v promotorové oblasti (genetická struktura běžná u kmenů s MIK ke karbapenemům ≥ 2 mg/l), *bla*_{OXA-58-like} a *bla*_{OXA-24-like}, byť dva posledně jmenované byly popsány pouze u dvou respektive jednoho izolátu z let 2005–2006 [3].

V letošním roce byla Laboratoří bakteriální genetiky (LBG) zorganizována studie, jejímž cílem bylo posoudit změny v populaci MR nemocničních kmenů rodu *Acinetobacter* v České republice oproti létům 2005–2006. Mezi kmény zaslanými do LBG spolupracujícími laboratořemi byl i izolát (LBG č. ANC 4097) s neobvykle vysokými hodnotami MIK pro β -laktamy a rezistentní k většině ostatních klinicky relevantních antibiotik (obr. 1). Kmen byl izolován v červenci letošního roku u pacienta hospitalizovaného na oddělení intenzivní péče v Ústí nad Labem. Podle později získaných informací byl pravděpodobně též kmen (charakterizovaný pro českou populaci acinetobakterů neobvyklým fenotypem rezistence; viz obr. 1) krátce předtím zachycen na stejném oddělení ze sputa jiného pacienta přicestovavšího z Egypta a následně provedená protiepidemická a hygienická opatření zabránila dalšímu šíření tohoto importovaného kmene v nemocnici (MUDr. M. Štolbová, osobní sdělení). Genotypová charakterizace ANC 4097 v LBG a ve spolupracujícím pracovišti v Univerzitní nemocnici v Bicetre v Paříži ukázala, že kromě řady běžných genů rezistence nese tento izolát i geny pro karbapenemázy dosud v České republice nezaznamenané, NDM-1 (Dr. L. Poirel, osobní sdělení) a OXA-23. Vzhledem k významu tohoto nálezu zde uvádíme předběžné výsledky dosud provedených vyšetření. Podrobná genetická analýza izolátu ANC 4097 se dokončuje ve spolupráci s pařížským pracovištěm a bude obsahem jiného sdělení.

Izolát ANC 4097 byl rezistentní (v závorkách uvedeny MIK v mg/l určené Etestem případně diluční mikrometodou) k imipenemu (>32), meropenemu (>32), ampicilin-sulbaktamu (>256), ceftazidimu (>256), cefotaximu (>256), cefepimu (>256), piperacilin-tazobaktamu (>256), amikacinu (>64), gentamicinu (32), ciprofloxacinu (>32) a tetracyklinu (128). Diskový difúzní test navíc ukázal rezistenci k aztreonamu, tikarcilinu, kotrimoxazolu a ofloxacinu (obr. 1). Částečná nebo úplná citlivost byla zachována pouze u doxycyklinu (2), tigecyklinu (2), netilmicinu (4), tobramycinu (0,5) a kolistinu (0,25). Etest pro průkaz MBL ukázal 24-násobné snížení MIK k imipenemu v přítomnosti inhibitoru EDTA (obr. 2), naznačující tak produkci MBL.

Metodou PCR byla vyšetřena přítomnost CHDL a MBL [3]. Pozitivní signál byl zjištěn pro geny kódující karbapenemázy typu OXA-51, OXA-23 a NDM. Určení sekvencí úplných kodujících oblastí ukázalo, že ANC 4097 nese geny *bla*_{OXA-23} a *bla*_{NDM-1}. Analýza oblastí přilehlých ke genům pro CHDL [3] prokázala přítom-

nost *ISAbal* v promotorových oblastech genů *bla*_{OXA-51-like} a *bla*_{OXA-23}. Obsaženy byly i geny pro efluxový systém AdeABC. Zvýšené hodnoty MIK k netilmicinu (oproti plně citlivé populaci *A. baumannii*) naznačují částečnou nadprodukcí tohoto systému, která však pravděpodobně nemá podstatný vliv na rezistenci ANC 4097 ke karbapenemům [9, 10]. Z uvedených výsledků plyne, že na vysoké rezistenci ke karbapenemům a dalším β -laktamům se u ANC 4097 kromě NDM-1 může podílet OXA-23 a chromozomální oxacilináza typu OXA-51. Nutno však připomenout, že z pouhé přítomnosti genů neplyne jejich fenotypové vyjádření a že nelze vyloučit přítomnost dalších enzymatických ani neenzymatických mechanismů karbapenemové rezistence.

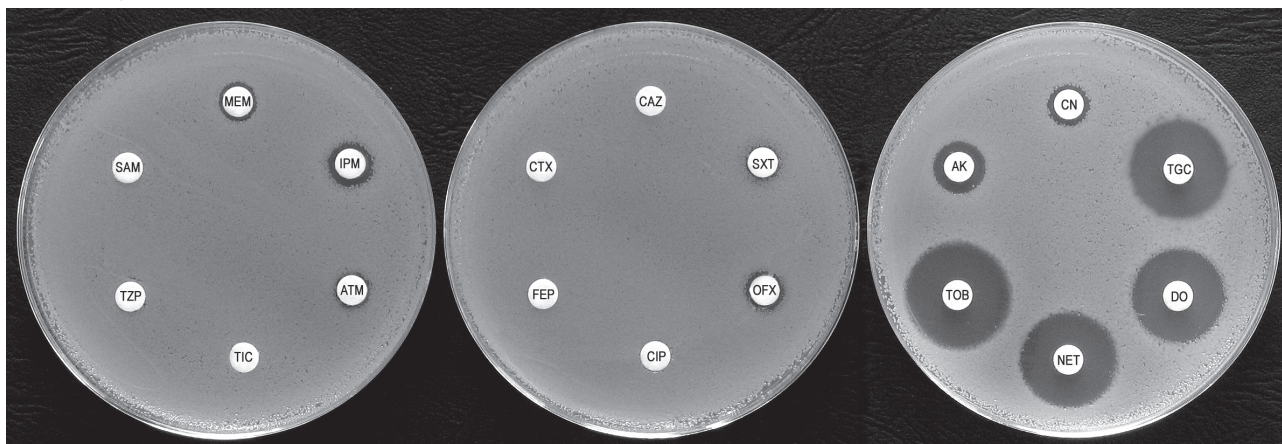
Pomocí PCR byla dále prostudována přítomnost dalších genů a genetických struktur se známou rolí v získané rezistenci *A. baumannii* [3]. Zjištěné genetické struktury byly v souladu s fenotypem rezistence. ANC 4097 nesl *bla*_{TEM-1-like} (rezistence k sulbaktamu) a geny pro fosfotransferázu APH(3')-VI (rezistence k amikacinu) a acetyltransferázu AAC(3)-I (rezistence ke gentamicinu), nikoliv však geny pro enzymy modifikující tobramycin a netilmicin a pro efluxovou pumpu TetB (citlivost na doxycyklin). Byla též zjištěna inserce *ISAbal* v promotorové oblasti genu pro druhově specifickou chromozomální β -laktamázu typu AmpC (rezistence k ceftazidimu). Všechny tyto geny a genetické struktury jsou u MR kmenů *A. baumannii* v České republice běžné a navíc charakteristické pro EU klon I, do něhož ANC 4097 podle předběžných výsledků genotypizace patří.

A. baumannii produkující OXA-23 nebo nesoucí gen pro tuto karbapenemázu byl izolován v mnoha evropských zemích a výskyt tohoto genu u českého izolátu proto nepřekvapuje. OXA-23 je omezena na rod *Acinetobacter* (s jedinou známou výjimkou kmene *Proteus mirabilis*) a nepředpokládá se její horizontální šíření do jiných bakteriálních rodů. Významnější je nález genu pro NDM-1, před dvěma roky popsanou metalo- β -laktamázu, jíž je v literatuře věnována značná pozornost [11, 12, 13]. NDM-1 byla prokázána u klinických izolátů různých druhů enterobakterií a to původně u kmenů izolovaných v Indii nebo z ní importovaných. Pozornost věnovaná NDM-1 plyne kromě jiného z neobyčejné rychlosti jejího globálního šíření, s ní spojených vysokých hodnot MIK ke karbapenemům (oproti jiným karbapenemázám) a lokalizace kódujícího genu na konjugativních plazmidech, které mohou též nést geny pro rezistenci k aminoglykozidům, rifampicinu, sulfonamidům, aztreonamu a dalším antibiotikům [13]. Nálezy NDM-1 u acinetobakterů jsou dosud ojedinělé [7, 14, 15], přítomnost části acinetobakterové inzerční sekvenční *ISAbal*25 před genem pro NDM-1 u enterobakterií nicméně naznačuje, že *A. baumannii* může být jedním z původních zdrojů diseminace této karbapenemázy [16].

Předchozí studie ukázaly, že šíření MR kmenů acinetobakterů [3] a dalších významných podmíněných patogenů mezi českými nemocnicemi je běžné [17, 18, 19] a pravděpodobně souvisí s nedostatečnými bariérovými a hygienickými opatřeními. Obavy ze šíření bakterií ne-

Obrázek 1: Citlivost kmene ANC 4097 k antibiotikům v diskovém difúzním testu

AK, amikacin (30 µg/disk); ATM, aztreonam (30); CAZ, ceftazidim (30); CIP, ciprofloxacín (5); CN, gentamicin (10); CTX, cefotaxim (30); DO, doxycyklin (30); FEP, cefepim (30); IMP, imipenem (10); MEM, meropenem (10); NET, netilmicin (30); OFX, ofloxacin (5); SAM, ampicilin+sulbaktam (10+10); SXT, trimetoprim+sulfometoxazol (1,25+23,75); TGC, tigecyklin (15); TIC, tikarcilin (75); TOB, tobramycin (10); TZP, piperacilin+tazobaktam (100+10).



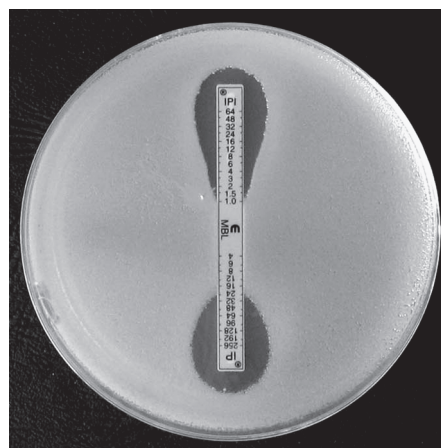
Laboratoř bakteriální genetiky (LBG; www.szu.cz/laborator-bakterialni-genetiky) se věnuje problematice taxonomie, populační struktury a genetických determinantů rezistence k antibiotikům u gramnegativních nefermentujících tyčinek, zvláště rodu *Acinetobacter* a druhu *Pseudomonas aeruginosa*. Dosud se kromě jiného podílela na popisu devíti nových klinicky významných druhů acinetobakterů (www.szu.cz/anemec/Classification.pdf), identifikovala epidemické MR klony *A. baumannii* [2, 20] a *P. aeruginosa* [19] v České republice a popsala nové genetické struktury spojené s antibiotickou rezistencí u těchto druhů [19, 21, 22]. Poskytuje konzultační a referenční činnost věnovanou těmto organismům a to zvláště v souvislosti s šířením multirezistentních kmenů v nemocničních zařízeních. Pracovníci LBG budou diagnostickým pracovištěm nadále zavázáni za zaslání kmenů acinetobakterů nejistého taxonomického zařazení, s neobvyklým fenotypem rezistence (zvláště vysoká kvantitativní rezistence ke karbapenémům, všem aminoglykozidům a/nebo rezistence ke kolistinu) nebo izolovaných ze závažných klinických a epidemiologických situací.

součích účinné mechanismy rezistence, které mohou dále komplikovat nemocniční péči, jsou proto oprávněné. Tato studie ilustruje důležitost znalosti struktury a vlastností populace významného nemocničního patogenu na státní úrovni, která je předpokladem pro rychlou detekci nebezpečných kmenů a nových mechanismů rezistence.

LITERATURA

1. Dijkshoorn L, Nemeč A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5(12): 939–951.
2. Nemeč A, Janda J, Melter O, Dijkshoorn L. Genotypic and phenotypic similarity of multiresistant *Acinetobacter bau-*

Obrázek 2:
Vyšetření produkce
metalo-β-laktamázu
u kmene ANC 4097
pomocí Estestu MBL
(AB bioMérieux).
Přítomnost EDTA (IPI)
významně snižuje MIK
pro imipenem.



mannii isolates in the Czech republic. *J Med Microbiol* 1999; 48(3): 287–296.

3. Nemeč A, Křížová L, Maixnerová M, Diancourt L et al. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62(3): 484–489.
4. Adams-Haduch JM, Onuoha EO, Bogdanovich T, Tian GB et al. Molecular Epidemiology of Carbapenem-Non-Susceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. *J Clin Microbiol* doi:10.1128/JCM.00619-11.
5. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(2): 233–238.
6. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(12): 5035–5038.
7. Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of *bla*_{OXA-23} with *bla*_{NDM-1} and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(10): 2253–2254.
8. Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG et al. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(6): 1260–1262.
9. Nemeč A, Maixnerová M, van der Reijden TJ, van den Broek PJ, Dijkshoorn L. Relationship between the AdeABC efflux

- system gene content, netilmicin susceptibility and multi-drug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60(3): 483–489.
10. Héritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(8): 3198–3202.
 11. Hrabák J. Nová získaná metalo- β -laktamáza NDM-1. *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ, Praha)* 2010; 19(6–7): 184–186.
 12. Nordmann P, Poirel L, Carrère A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. *J Clin Microbiol* 2011; 49(2): 718–721.
 13. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36(Suppl 3): S8–S14.
 14. Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, Yu Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(6): 1255–1259.
 15. Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, Wichelhaus TA et al. Molecular characterization of *bla*_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(9): 1998–2001.
 16. Poirel L, Schrenzel J, Cherkaoui A, Bernabeu S et al. Molecular analysis of NDM-1-producing enterobacterial isolates from Geneva, Switzerland. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(8): 1730–1733.
 17. Melter O, Aires de Sousa M, Urbásková P, Jakubů V et al. Update on the major clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* 2003; 41(11): 4998–5005.
 18. Nübel U, Dordel J, Kurt K, Strommenger B et al. A timescale for evolution, population expansion, and spatial spread of an emerging clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 2010; 6(4): e1000855.
 19. Nemeč A, Křížová L, Maixnerová M, Musílek M. Multi-drug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Res Microbiol* 2010; 161(3): 234–242.
 20. Nemeč A, Dijkshoorn L, van der Reijden TJK. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. *J Med Microbiol* 2004; 53(2): 147–153.
 21. Nemeč A, Dolzani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol* 2004; 53(12): 1233–1240.
 22. Křížová L, Dijkshoorn L, Nemeč A. Diversity and evolution of AbaR genomic resistance islands in *Acinetobacter baumannii* strains of European clone I. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(7): 3201–3206.
 23. 9. 2011

Doc. RNDr. Alexandr Nemeč, PhD.

Mgr. Lenka Křížová

Martina Maixnerová

Laboratoř bakteriální genetiky, SZÚ

Šrobárova 48, 100 42 Praha

anemec@szu.cz

MUDr. Andrea Šmejcová

Oddělení klinické mikrobiologie

Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem

Sociální péče 3316/12A, 401 13 Ústí nad Labem

Andrea.Smejцова@mnul.cz