

Extenzivně rezistentní kmeny *Acinetobacter baumannii* nesoucí geny pro karbapenemázu OXA-23 a metylázu ArmA v nemocnicích České republiky

Extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii strains carrying genes encoding carbapenemase OXA-23 and methylase ArmA in hospitals of the Czech Republic

Lenka Radolfová-Křížová, Martina Maixnerová, Vladislav Jakubů, Alexandr Nemeč

Souhrn • Summary

Od června 2015 do května 2016 byly v sedmi nemocnicích České republiky zachyceny extenzivně rezistentní kmeny *Acinetobacter baumannii* náležející k celosvětově rozšířenému epidemickému klonu II. Tyto kmeny nesly geny pro karbapenemázu OXA-23 a metylázu ArmA a byly rezistentní ke všem β -laktamům a aminoglykosidům. Tento rezistotyp je v České republice nový a jeho šíření může dále omezit léčebné možnosti u acinetobakterových infekcí.

Extensively drug-resistant strains of Acinetobacter baumannii belonging to worldwide epidemic clone II were isolated in seven Czech hospitals between June 2015 and April 2016. These strains carried the genes encoding the OXA-23 carbapenemase and ArmA methylase and were resistant to all β -lactams and aminoglycosides. This resistotype is new in the Czech Republic and its dissemination may further complicate the therapy of Acinetobacter infections.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2016; 25(6-7): 231–234.

Klíčová slova: aminoglykosidy, celogenomová sekvenace, epidemický klon II, genotypizace, karbapenemy

Keywords: aminoglycosides, whole genome sequencing, epidemic clone II, genotyping, carbapenems

Acinetobacter baumannii je jednou z nejvýznamnějších podmíněně patogenních bakterií komplikujících nemocniční péči. Jeho klinicko-epidemiologický význam plyne především z neobyčejné schopnosti účinně vyvíjet a šířit rezistenci k antimikrobním látkám [1]. Tuto schopnost mají zejména kmeny celosvětově rozšířených (tzv. evropských nebo mezinárodních) epidemických klonů I a II [2]. V České republice převládá od přelomu milénia epidemický klon II [3], k jehož rozšíření pravděpodobně přispěla odolnost kmenů tohoto klonu vůči karbapenemům, původně nejúčinnějším lékům pro léčbu infekcí vyvolaných multirezistentními kmeny acinetobakterů. Populaci klonu II charakterizuje vysoká variabilita mechanismů navozujících rezistenci ke všem skupinám klinicky využitelných antibiotik [3].

Získané enzymatické mechanismy, jež způsobují rezistenci *A. baumannii* ke karbapenemům, zahrnují především β -laktamázy třídy D (OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143 a OXA-235), dále metalo- β -laktamázy (MBL) třídy B (NDM, IMP, VIM a SIM) a vzácně β -laktamázy třídy A (GES-14, KPC). Z uvedených karbapenemáz byly u české populace *A. baumannii* dosud zaznamenány OXA-23, OXA-24/40, OXA-58 a NDM-1 [3, 4, 5, 6]. Klinicky významná rezistence často plyne i ze zvýšené exprese genu pro β -laktamázu OXA-51, který je stabilní součástí druhového genomu *A. baumannii*. Tuto expresi obvykle způsobu-

je inzerční sekvenace IS*Aba1* se silným promotorem, umístěná před kódující oblast genu pro OXA-51 [1, 7].

Významnou alternativou pro léčbu infekcí způsobených multirezistentními acinetobaktery jsou aminoglykosidy. Hlavní příčinou rezistence k aminoglykosidům u *A. baumannii* jsou horizontálně získané geny pro enzymy modifikující tato antibiotika. U českých izolátů byly dosud prokázány geny pro acetyltransferázu AAC(3)-I, fosfotransferázy APH(3')-I a APH(3')-VI a nukleotidyltransferázy ANT(2'')-I a ANT(3'')-I [8]. Tyto geny jsou součástí integronů třídy 1 (*aac(3)-I* a *ant(3'')-I*) nebo kompozitních transpozonů (*aph(3')-I* a *aph(3')-VI*) [9]. K aminoglykosidové rezistenci přispívá i efluxový systém typu AdeABC, transmembránová pumpa, jež aktivně transportuje z buňky vedle aminoglykosidů i některé β -laktamy, fluorochinolony, tetracykliny a tigecyklin [10, 11]. V posledním desetiletí byly z různých, zejména asijských zemí navíc hlášeny kmeny *A. baumannii* produkující metylázu typu ArmA [12]. Tento enzym metyluje guanin v pozici 1405 na ribozomální 16S rRNA, což brání vazbě aminoglykosidů na zásahové místo na ribozómu a vede k vysoké rezistenci ke všem klinicky použitelným aminoglykosidům [13]. Gen pro ArmA (*armA*) nese kompozitní transpozon Tn1548 umístěný na konjugativních plazmidech, což umožňuje horizontální šíření genu. Významné je, že kmeny *A. baumannii* s ArmA často nesou i karbapenemázu OXA-23, byť geny pro tyto enzymy nejsou umístěny na stejném plazmidu [12].

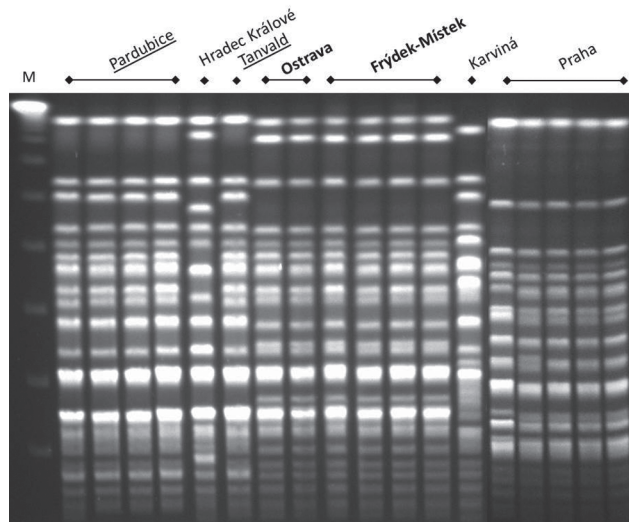
Tato studie vznikla na základě záhytu kmene *A. baumannii* rezistentního ke všem β -laktamům a aminoglykosidům v nemocnici v Pardubicích v červnu 2015. Tento kmen byl zaslán do Národní referenční laboratoře pro antibiotika k potvrzení karbapenemové rezistence. V následujících 11 měsících byly další 22 izoláty s podobným fenotypem rezistence, pocházející ze sputa, tracheálního as-

pirátu, krve, ran a moče, zachyceny nejen v Pardubicích, ale i v dalších šesti českých a moravských nemocnicích (FN Hradec Králové; FN Ostrava; Nemocnice ve Frýdku-Místku; Nemocnice Tanvald; Nemocnice s poliklinikou Karviná-Ráj, pracoviště Orlová; FN Na Bulovce v Praze). Vzhledem ke klinicko-epidemiologické závažnosti vzniklé situace jsme se rozhodli určit mechanismy rezistence zodpovědné za neobvyklý profil rezistence u těchto 23 izolátů a posoudit jejich epidemiologickou souvislost.

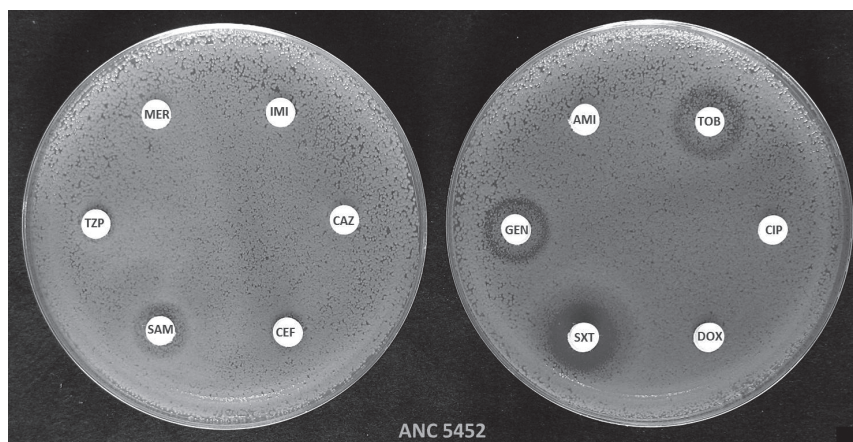
Metodou multiplex PCR zaměřenou na klonálně specifické sekvence DNA [14] byly všechny izoláty zařazeny do epidemického klonu II. Makrorestrikční analýza genomové DNA (PFGE) [3] dále ukázala, že i přes shodný neobvyklý fenotyp rezistence náleželo 23 izolátů k pěti různým, byť vzájemně podobným genotypům (**obr. 1**). Identické makrorestrikční profily vždy korelovaly s místem původu izolátů, což naznačuje jejich bezprostřední epidemiologickou vazbu v dané nemocnici. Tanvaldské izoláty měly navíc genotyp shodný s izoláty z Pardubic a podobně tomu bylo u izolátů z Frýdku-Místku a Ostravy (**obr. 1**). V jednotlivých nemocnicích šlo tedy nejspíše o izolované epidemické epizody způsobené lokálně specifickými kmeny, které se v některých případech rozšířily do dalších nemocnic.

Diskovým difúzním testem [15] byla prokázána rezistence u všech izolátů k imipenemu, meropenemu, ampicilin-sulbaktamu, ceftazidimu, cefotaximu, cefepimu, piperacilin-tazobaktamu, aztreonamu, amikacinu, gentamicinu, netilmicinu, tobramycinu, ciprofloxacinu, ofloxacinu a doxycyklinu. Ke kotrimoxazolu a tigecyklinu byly izoláty rezistentní nebo intermediárně citlivé. Vysokou míru rezistence ke klinicky významným antibiotikům ilustruje

Obrázek 1: Příklady makrorestrikčních profilů studovaných izolátů *A. baumannii*. Podtržené a tučně jsou zvýrazněny lokality, v nichž byly zachyceny izoláty se shodnými profily. M, molekulový marker (48,5 kb).



Obrázek 2: Profil antibiotické rezistence izolátu ANC 5452 v diskovém difúzním testu. AMI, amikacin (30 µg/disk); CAZ, ceftazidim (30); CIP, ciprofloxacín (5); GEN, gentamicin (10); DOX, doxycyklin (30); CEF, cefepim (30); IMI, imipenem (10); MER, meropenem (10); SAM, ampicilin+sulbaktam (10+10); SXT, trimetoprim+sulfametoxazol (1,25+23,75); TOB, tobramycin (10); TZP, piperacilin+tazobaktam (100+10). Disky pocházely od firmy Oxoid.

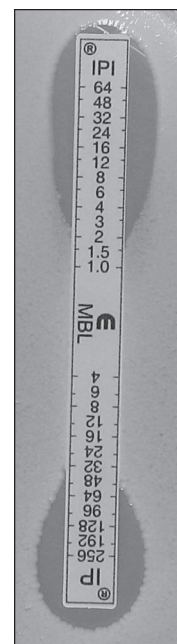


obr. 2 na příkladu izolátu ANC 5452 z Ostravy. Úplná citlivost byla u všech izolátů zachována pouze ke kolistinu (0,25-0,5 mg/l; stanoveno diluční mikrometodou). Pomocí Etestu byla potvrzena vysoká kvantitativní rezistence k imipenemu (≥ 32 mg/l), amikacinu (>256 mg/l), gentamicinu (>256 mg/l) a netilmicinu (>256 mg/l). Etest pro průkaz MBL prokázal 24-násobné snížení minimální inhibiční koncentrace (MIC) k imipenemu v přítomnosti EDTA (**obr. 3**), ukazující na produkci MBL. V tomto případě však šlo o známou falešnou pozitivitu tohoto testu u *A. baumannii* produkujících karbapenemázu OXA-23 [16].

Průkaz genů rezistence byl proveden pomocí konvenční (end-point) PCR. Všechny izoláty nesly gen pro karbapenemázu OXA-23 (*bla*_{OXA-23}) s *ISAbal* v promotorové oblasti a gen *armA*. U dvou izolátů ze dvou nejpočetnějších skupin (z Pardubic a Ostravy) byly určeny celogenomové sekvence [primární sekvenční data byla připravena v EMBL v Heidelbergu, jejich sestavení de novo pak pomocí programu Geneious (Biomatters, New Zealand) v Laboratoři bakteriální genetiky]. Analýza těchto genomů prokázala přítomnost *bla*_{OXA-23} s *ISAbal* v promotorové oblasti a genu *armA*, který nesl transpozon *Tn1548* uložený na plazmidu o velikosti >177 kb. Geny pro MBL ani *ISAbal* umístěné v promotorové oblasti *bla*_{OXA-51} nebyly v genomech ani pomocí konvenční PCR u ostatních izolátů zjištěny. Za vysokou míru karbapenemové rezistence i za falešně pozitivní Etest MBL u všech studova-

Obrázek 3:

Vyšetření produkce metalo- β -laktamáz u kmeně ANC 5452 pomocí Etestu MBL (AB bioMérieux). U kmenů *A. baumannii* produkujících OXA-23 dochází k falešné pozitivitě testu [16] – přítomnost EDTA (IPI) významně snižuje MIC pro imipenem (IP) v nepřítomnosti metalo- β -laktamázy.



ných izolátů tedy velmi pravděpodobně odpovídá OXA-23. Skupiny místně specifických kmenů se nicméně vzájemně lišily přítomností dalších genů rezistence, např. genu pro β -laktamázu TEM-1, karbapenemázu OXA-58 nebo fosfotransferázy APH(3')-I a APH(3')-VI. Tato zjištění potvrzují již zmíněnou genetickou plasticitu rezistomu typickou pro klon II.

Přestože kmeny *A. baumannii* nesoucí *bla*_{OXA-23} byly v českých nemocnicích již dříve zachyceny, šlo dosud ve směr o ojedinělé nálezy [4, 5, 6], a hlavní příčinou rezistence ke karbapenemům byla dosud nadprodukce chromozomální OXA-51 [3]. Šíření kmenů s OXA-23 je alarmující, neboť tento mechanismus poskytuje oproti OXA-51 kvantitativně vyšší rezistenci ke karbapenemům a omezuje účinnost i dalších β -laktamů. Ještě závažnější je pak zjištění, že studované kmeny zároveň nesou (pro Českou republiku novou) metylázu ArmA, jež způsobuje kvantitativně vysokou rezistenci ke všem aminoglykosidům (obr. 4a, 4b), které lze jinak docílit pouze kombinací několika mechanismů (obr. 4c). Současná produkce OXA-23 a ArmA tak zcela vyřazuje dvě nejvýznamnější skupiny antibiotik používaných v nemocniční péči. A spolu s rezistencí k fluorchinolonům (mutace v genech pro topoizomerázy) a tetracyklinům (efluxová pumpa TetB), běžnými u klonu II, ponechává minimální léčebné možnosti.

V souvislosti s metylázou ArmA je nutno zmínit jev, který umožňuje rozeznat přítomnost tohoto mechanismu v rutinním difúzním testu. Jde o nehomogenní růst kmenů produkujících ArmA kolem disků s aminoglykosidy. Byl tento jev v souvislosti s ArmA v literatuře popsán [17, 18], jeho příčina zatím není zcela objasněna. Situaci ilustruje obr. 4 s ANC 5190 a ANC 5452, jež zastupují dvě genotypově a lokálně odlišné skupiny studovaných izolátů. U obou izolátů je nehomogenní růst patrný pouze v případech, kdy je ArmA mechanismem jediným (všechny aminoglykosidy vyjma kanamycinu u ANC 5190; gentamicinu, netilmicinu a tobramycinu u ANC 5452). Současná exprese efluxu AdeABC, jež neposkytuje kvantitativně vysokou rezistenci (z aminoglykosidů je neúčinnější na gentamicin a netilmicin), se v bezprostřední blízkosti disku neuplatňuje. Na rozdíl od ANC 5190 a ANC 5452 se u archivního izolátu

NIPH 281 bez ArmA zmíněný nehomogenní růst nevyskytuje (obr. 4c).

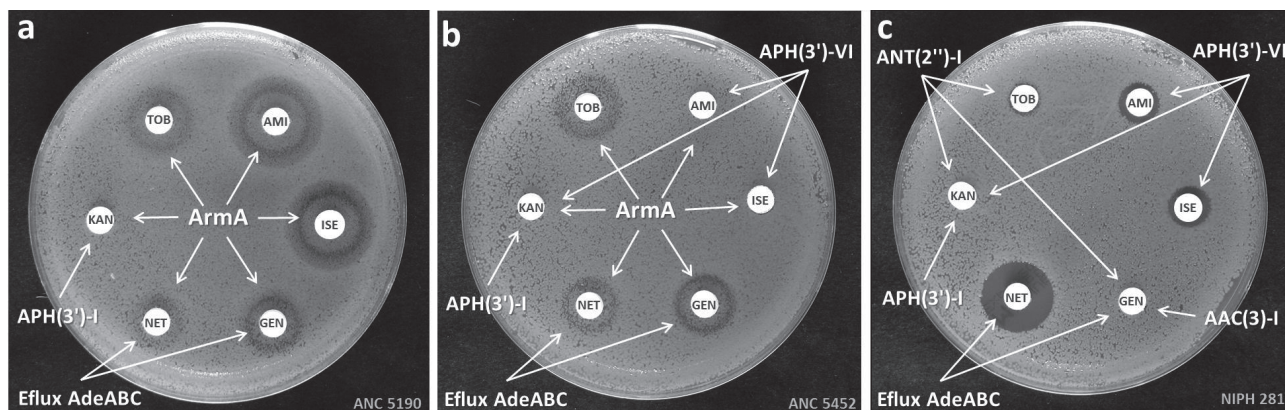
Z výsledků genotypizace nelze jednoznačně stanovit, jakým způsobem k šíření kmenů došlo. Možné scénáře zahrnují (i) import jediného kmene s OXA-23 a ArmA ze zahraničí a jeho následné rozšíření a genetickou diverzifikaci, (ii) současný zahraniční import několika kmenů klonu II s OXA-23 a ArmA, (iii) získání *armA* českými kmeny klonu II s již přítomnou OXA-23 horizontálním přenosem od jiných bakterií nebo (iv) kombinace těchto možností. Třebaže použité metody genotypizace spolehlivé rozlišení uvedených alternativ neumožňují, odpověď na tuto otázku dnes nabízí určení celogenomových sekvencí izolátů reprezentujících jednotlivé lokální populace a jejich srovnání navzájem i s dostupnými genomovými sekvencemi izolátů z různých zemí. Tato analýza se nyní v laboratoři bakteriální genetiky provádí.

Smyslem tohoto sdělení je především upozornit na nový typ rezistence u nemocničních kmenů *A. baumannii* v České republice, jež zahrnuje vysoce účinnou kombinaci dvou mechanismů rezistence poskytující úplnou rezistenci in vitro k β -laktamovým a aminoglykosidovým antibiotikům. Kmeny s tímto typem rezistence se rok od svého prvního záchytu objevily v několika nemocnicích, kde obvykle vyvolaly lokální epidemické epizody. Vedle rizika dalšího šíření těchto kmenů je možný i horizontální přenos metylázy ArmA na jiné druhy nemocničních patogenů. Důležité je proto výskyt kmenů s tímto typem rezistence sledovat, k čemuž lze v diagnostických laboratořích využít charakteristický fenotyp tohoto typu rezistence v diskovém difúzním testu.

Autoři děkují kolegům z klinické laboratoře **Nemocnice Pardubice, FN Hradce Králové, ZÚ Ostrava, SPADIA LAB a.s. Ostrava, PREVEDIG spol. s r.o. Praha, Krajské nemocnice Liberec, MeDiLa spol. s r.o. Pardubice, FN Na Bulovce, České Laboratorní s.r.o. Laboratoře OmniLab Praha** za zaslání izolátů a spolupráci.

Studie byla podpořena MZ ČR – RVO (Státní zdravotní ústav – SZU, 75010330).

Obrázek 4: Příklady mechanismů rezistence k aminoglykosidům a jejich kombinací u izolátů *A. baumannii* (a) ANC 5190 (Pardubice, 2015), (b) ANC 5452 (Ostrava, 2015) a (c) NIPH 281 (Příbram, 1994 [8]). AMI, amikacin (30 μ g/disk); GEN, gentamicin (10); ISE, isepamicin (30); KAN, kanamycin (30); NET, netilmicin (30); TOB, tobramycin (10). Disky pocházely od firmy Oxoid vyjma isepamicinu (Bio-Rad). Vysvětlení mechanismů rezistence je uvedeno v hlavním textu.



LITERATURA

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21(3): 538-582.
2. Diancourt L, Passet V, Nemeč A, Dijkshoorn L, Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 2010; 5(4): e10034.
3. Nemeč A, Křížová L, Maixnerová M, Diancourt L, van der Reijden TJ, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multi-drug-resistant strains of European clone II. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62(3): 484-489.
4. Nemeč A, Křížová L, Maixnerová M, Šmejcová A, PSA. Multirezistentní *Acinetobacter baumannii* nesoucí geny pro karbapenemázy NDM-1 a OXA-23 importovaný do České republiky. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2011; (20)8: 295-298.
5. Křížová L, Paterová P, Nemeč A. Výskyt kmene *Acinetobacter baumannii* rezistentního ke karbapenemům a nesoucího geny *bla*_{OXA-23} a *bla*_{PER-1} ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Sborník abstraktů 25. konference Pečenkovy epidemiologické dny (Harrachov, 18.-20.9.2012), 2012: 107.
6. Senkyrikova M, Husickova V, Chroma M, Sauer P, Bardon J, Kolar M. *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 detected in the Czech Republic. *Springerplus* 2013; 2(1): 296.
7. Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. OXA-235, a novel class D β-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(5): 2121-2126.
8. 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(Pt 12): 1233-40.
9. Karah N, Dwibedi CK, Sjöström K, Edquist P, Johansson A, Wai SN, Uhlin BE. Novel Aminoglycoside Resistance Transposons and Transposon-Derived Circular Forms Detected in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60(3): 1801-1818.
10. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(12): 3375-3380.
11. Ruzin A, Keeney D, Bradford PA. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tetracycline in *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(5): 1001-1004.
12. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* 2015; 45(6): 568-585.
13. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 2007; 45(1): 88-94.
14. Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C, Kaufmann ME, Pitt TL. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(8): 807-815.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First Informational Supplement M100-S15. CLSI, Wayne, PA, USA, 2011.
16. Segal H, Elisha BG. Use of Etest MBL strips for the detection of carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(3): 598.
17. Jung S, Yu JK, Shin SH, Park KG, Jekarl DW, Han K, Park YJ. False susceptibility to amikacin by VITEK 2 in *Acinetobacter baumannii* harboring *armA*. *Ann Clin Lab Sci* 2010; 40(2): 167-171.
18. Brigante G, Migliavacca R, Bramati S, Motta E, Nucleo E, Manenti M, Migliorino G, Pagani L, Luzzaro F, Viganò FE. Emergence and spread of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone producing both the carbapenemase OXA-23 and the 16S rRNA methylase ArmA. *J Med Microbiol* 2012; 61(5): 653-661.

Mgr. Lenka Radolfová, Ph.D.

Martina Maixnerová

Doc. RNDr. Alexandr Nemeč, Ph.D.

Laboratoř bakteriální genetiky, SZÚ Praha

Mgr. Vladislav Jakubů

Oddělení bakteriální rezistence

na antibiotika a Sběrka kultur, SZÚ Praha