

## Záchyt kmenů *Haemophilus influenzae* rezistentních k cefotaximu

### Detection of cefotaxime-resistant strains of *Haemophilus influenzae*

Vladislav Jakubů, Pavla Urbášková a Helena Žemličková

#### Souhrn

V Národní referenční laboratoři pro antibiotika, Státní zdravotní ústav, Praha, byl zaznamenán nárůst počtu kmenů *Haemophilus influenzae* zaslaných mikrobiologickými laboratořemi pro ověření rezistence k aminopenicilinům u izolátů, které neprodukují  $\beta$ -laktamázu. V průběhu roku 2015 byly detekovány čtyři kmeny s rezistencí k cefotaximu. Takové kmeny se podle literatury vyskytují především v oblasti Koreje a Japonska, v Evropě je jejich výskyt velice vzácný. Předmětem tohoto krátkého sdělení je popis mechanismů rezistence na  $\beta$ -laktamová antibiotika u *H. influenzae*, včetně stručného popisu jejich molekulárně biologické podstaty.

*The National Reference Laboratory for Antibiotics of the National Institute of Public Health, Prague, has noticed an increased number of Haemophilus influenzae strains among the non-beta-lactamase producing isolates referred by microbiological laboratories for further testing of resistance to aminopenicillins. Four cefotaxime-resistant strains were detected in 2015. Such strains have been reported to occur particularly in Korea and Japan but are rare in Europe. The aim of this short communication is to describe beta-lactam resistance mechanisms in Haemophilus influenzae, including their molecular biological aspects.*

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2015; 24(11-12): 387–388.

**Klíčová slova:** *Haemophilus influenzae*, rezistence, cefotaxim, BLNAR

**Keywords:** *Haemophilus influenzae*, resistance, cefotaxime, BLNAR

*Haemophilus influenzae* patří mezi růstově náročné gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky. Kmeny *H. influenzae* mohou produkovat polysacharidové pouzdro nebo mohou být neopouzdržené. Invazivní infekce typu meningitidy či epiglottitidy jsou obvykle způsobeny *H. influenzae* typu b (Hib), neopouzdržené kmeny, označované jako tzv. netypovatelné, jsou spojené především s neinvazivními infekcemi horního respiračního traktu (otitis media acuta, sinusitida, konjunktivitida, akutní exacerbace chronické bronchitidy). Zavedení plošného očkování proti Hib minimalizovalo výskyt závažných hemofilových invazivních onemocnění a v současnosti je většina infekcí vyvolána neopouzdrženými (netypovatelnými) hemofily [1].

Lékem volby hemofilových respiračních infekcí (otitida, sinusitida, komunitní pneumonie) jsou aminopeniciliny. Zatímco rezistence k cefotaximu, (resp. k ceftriaxonu), které jsou rezervovány pro terapii závažných invazivních infekcí je celosvětově velice vzácná, výskyt rezistence k aminopenicilinům je v některých státech poměrně frekventní [2, 3]. Rezistence k aminopenicilinům je u hemofilů tradičně spojena s produkcí betalaktamázy, která je inhibována kyselinou klavulanovou nebo sulbaktamem. U *H. influenzae* byl popsán výskyt dvou různých typů  $\beta$ -laktamáz, TEM-1 a ROB-1 [4]. Oba tyto enzymy jsou přenášeny plasmidy a jsou produkovány konstitutivně ve velkém množství. Geny kódující ROB-1  $\beta$ -laktamázu, známou od roku 1981, jsou přítomny na malých plasmidech (4-5 Kbp). Druhá, a v celosvětovém měřítku mnohem více rozšířená TEM – 1  $\beta$ -laktamáza je asociovaná s dvěma typy

plazmidů, nekonjugativními (10 kbp) a konjugativními (40 kbp). Na konjugativních plasmidech jsou, vyjma genu pro produkci betalaktamázy, zpravidla přítomny i geny determinující rezistenci k dalším antibiotikům a v důsledku snadného horizontálního přenosu, hrají tyto mnohem větší úlohu při šíření rezistence k antibiotikům. Detekce produkce  $\beta$ -laktamázy je založena na hydrolyze chromogenního cefalosporinu, nitrocefínu. Kmeny produkující  $\beta$ -laktamázu jsou rezistentní k aminopenicilinům, MIC ampicilinu/amoxicilinu je obvykle vyšší než 16 mg/l a několikanásobně tak přesahuje breakpoint těchto antibiotik pro citlivé kmeny ( $\leq 1$  mg/l, respektive 2 mg/l) [5]. Kmeny produkující  $\beta$ -laktamázu jsou citlivé ke kombinaci ampicilinu či amoxicilinu s inhibitory  $\beta$ -laktamáz, stejně jako k cefalosporinům druhé a třetí generace.

Druhým mechanismem rezistence k aminopenicilinům je snížená vazba aminopenicilinů v důsledku geneticky podmíněných mutací proteinu PBP3 (penicillin-binding protein), kódovaného genem *ftsI* [6, 7]. Izoláty vykazující tento typ rezistence se označují jako  $\beta$ -laktamáza negativní ampicilin rezistentní (BLNAR) a na rozdíl od kmenů hemofilů produkujících  $\beta$ -laktamázu, snížená citlivost k aminopenicilinům u nich není ovlivnitelná inhibitory  $\beta$ -laktamáz. Produktem genu *ftsI* je transpeptidáza FtsI, která se účastní syntézy peptidoglykanu. Fts proteiny obecně hrají roli při formování divisomu (strukturální kruhový útvar uvnitř buňky, přichycený k cytoplazmatické membráně), i při tvorbě septa při dělení buněk. Mutace v genu *ftsI*, mají za následek substituci aminokyselin v transpeptidázové oblasti proteinu PBP3. Důsledkem těchto aminokyselinových záměn je pak snížení afinity penicilinů a cefalosporinů ke zmíněnému proteinu. Na afinitu  $\beta$ -laktamů mají vliv pouze mutace (aminokyselinové záměny) v blízkosti funkčně nezbytných vysoce konzervovaných aminokyselinových motivů v pozicích 379 (motiv SSN; serin-serin-asparagin) a 512

(motiv KTG; lysin-threonin-glycin) proteinu PBP3.

Na základě přítomnosti či absence specifických mutací jsou kmeny BLNAR rozděleny do tří základních skupin (I až III). Právě pozice přítomných mutací určuje, na jaké  $\beta$ -laktamy bude kmen rezistentní a v jaké výši. Kmeny se sníženou citlivostí k ampicilinu ( $MIC \leq 1-2$  mg/l) nejčastěji patří do skupiny I a II, zatímco skupinu III tvoří kmeny, které jsou vysoce rezistentní k aminopenicilinům i cefalosporinům [6]. Nejčastěji nalézanou mutací je substituce asparaginu za lysin v pozici 526 (N526K), skupina II, a substituce argininu za histidin v pozici 517 (R517H), skupina I. Tyto dvě odlišné mutace představují první fázi vývoje rezistence k  $\beta$ -laktamům. Při testování citlivosti na antibiotika je řada kmenů BLNAR k aminopenicilinům a cefalosporinům 2. generace citlivá a detekce těchto kmenů může být obtížná. Patrně nejcitlivější fenotypovou metodou záchytu těchto kmenů je skrínig pomocí disku s obsahem 1 J penicilinu [5, 8]. Kmeny náležející do skupiny III mají, vyjma základní mutace v pozici 526, ještě několik dalších mutací v oblasti SSN motivu. Tyto kmeny se vyznačují vyšší hladinou rezistence k aminopenicilinům (včetně kombinace s inhibitory  $\beta$ -laktamázy) a k cefalosporinům 2., a i 3. generace. Oba mechanismy rezistence, tedy enzymatický i neenzymatický, se mohou vzájemně kombinovat, a izoláty s mutací PBP3 a produkující  $\beta$ -laktamázu byly zachyceny i v NRL pro antibiotika. Frekvence výskytu neenzymatické rezistence k aminopenicilinům celosvětově narůstá. V České republice byl výskyt těchto kmenů vzácný, avšak pravidelně sledování v rámci respirační studie Pracovní skupiny pro monitorování rezistence prokázalo vzestup BLNAR kmenů z 0,9% v roce 2010 na 1,7% v roce 2014 [9]. V roce 2015 byly v NRL pro antibiotika potvrzeny i kmeny rezistentní k cefotaximu s  $MIC$  1-2mg/l (breakpoint pro rezistenci je  $MIC$  cefotaximu  $>0,125$  mg/l). Z celkem čtyř kmenů rezistentních k cefotaximu pocházely dva od pacientů s asijskými jmény a kromě mutací v genu *ftsI* produkovaly současně i  $\beta$ -laktamázu. Žádný izolát nepocházel z mozkomíšního moku nebo z krve pacientů s invazivní infekcí.

Záchyt kmenů *H. influenzae* rezistentních k cefotaximu (a zároveň k ceftriaxonu) je alarmující a terénní laboratoře by měly být na jejich možný výskyt připraveny. Fenotypová detekce kmenů BLNAR je nesnadná a proto lze předpokládat, že skutečný výskyt tohoto typu rezistence může být vyšší. Další problematickou oblastí je samotná klinická interpretace nálezu kmene BLNAR. Z dosavadních pozorování totiž vyplývá, že nalezená mutace nemusí být vždy nutně fenotypově vyjádřena a rutinní testování citli-

vosti k aminopenicilinům spolehlivě neodliší BLNAR kmeny od citlivé populace. Proto, obdobně jako v případě snížené citlivosti k penicilinu u pneumokoků, je u BLNAR izolátů *H. influenzae* s *in vitro* zachovanou citlivostí k aminopenicilinům vhodné použití vyšších terapeutických dávek příslušných antibiotik [8].

#### LITERATURA

1. Lebedová V, Křížová P, Beneš Č. Závažná onemocnění způsobená *Haemophilus influenzae* v České republice v období 2009–2013. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2014; 23: 170–174.
2. Barbosa AR, Giufre M, Cerquetti M and Bajanca-Lavado MP. Polymorphism in *ftsI* gene and  $\beta$ -lactam susceptibility in Portuguese *Haemophilus influenzae* strains: clonal dissemination of  $\beta$ -lactamase-positive isolates with decreased susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid. *J Antimicrob Chemother* 2010; 66: 788–796.
3. Lam TT, Claus H, Elias J, et al. Ampicillin resistance of invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Germany 2009–2012. *Int J Med Microbiol* 2015; 305: 748–755.
4. Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial Resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 368–389.
5. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016. <http://www.eucast.org>.
6. Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K., et al. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with  $\beta$ -lactam resistance in  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1693–1699.
7. Witherden EA, Kunde D, Tristram G. PCR screening for the N526K substitution in isolates of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus*. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 2255–2258.
8. Skaare D, Lia A, Hannisdal A, Tveten Y, Matuschek E, Kahlmeter G, Kristiansen BE. *Haemophilus influenzae* with non-beta-lactamase-mediated beta-lactam resistance: Easy to find but hard to categorize. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 3589–3595.
9. Žemličková H. Antibiotická rezistence u původců komunitních infekcí. *Pediatr praxi* 2015; 16: 296–298.

**Vladislav Jakubů**

**Pavla Urbášková**

NRL pro antibiotika SZÚ, Praha

**Helena Žemličková**

NRL pro antibiotika SZÚ, Praha

ÚKM LF a FN v Hradci Králové