

Výskyt *Enterobacteriaceae* produkujúcich karbapenemázy v rokoch 2019 – 2023.

Kissová Soňa¹, Sojka Martin², Krenželoková Michaela²

¹ Oddelenie klinickej mikrobiológie, Medirex, a.s., Bratislava

² Národné referenčné centrum pre sledovanie rezistencie mikroorganizmov na antibiotiká, Úrad verejného zdravotníctva SR, Bratislava

Baktérie produkujúce karbapenemázy predstavujú významný klinický problém v medicíne. V rámci multirezistentných baktérií sú jedným z najzávažnejších problémov v súvislosti s nozokomiálnymi nákazami. Sledovanie týchto kmeňov a následné opatrenia predstavujú dôležitý krok pre nastavenie správnej liečby pacienta a zamedzenie šírenia týchto kmeňov v nemocničných zariadeniach. V nasledujúcom článku sa venujeme výskytu baktérií produkujúcich karbapenemázy vykultivovaných v laboratóriu Oddelenia klinickej mikrobiológie, Medirex, a.s., Bratislava, v rokoch 2019 až 2023.

Kľúčové slová: karbapenémy, karbapenemázy, *Enterobacteriaceae*, fenotypová analýza, molekulárna typizácia

Prevalence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in 2019-2023

Summary

Carbapenemase-producing bacteria represent a significant issue in clinical medicine. They present one of the most serious challenges in nosocomial infections amongst multidrug-resistant bacteria. Screening, detecting these strains, and conducting subsequent analyses are critical steps in administering appropriate patient treatment and preventing their spread in hospital settings. This article focuses on the carbapenemase-producing bacteria detected in the Clinical Microbiology Laboratory, Medirex, a.s., Bratislava, during the years 2019 to 2023.

Keywords: carbapenems, carbapenemases, *Enterobacteriaceae*, phenotypic analysis, molecular typing

NewsLab, 2025, roč. 15 (2): 49-53

Úvod

Produkcia karbapenemáz predstavuje jeden z najzávažnejších mechanizmov rezistencie baktérií voči antibiotikám. Karbapenemázy sú enzýmy, ktoré štiepia karbapenémy (meropeném, ertapeném, imipeném), betalaktámové antibiotiká tzv. poslednej voľby. Gény zodpovedné za produkciu týchto enzýmov sú lokalizované na plazmidoch, čo im umožňuje presúvať informáciu nielen v rámci druhu, ale aj horizontálne medzi druhmi (13). V súvislosti s rýchlym šírením baktérií produkujúcich karbapenemázy v prostredí zdravotníckych zariadení je potrebné ich zachytiť čo najskôr a v prípade infekcie u pacienta presne identifikovať a následne správne nastaviť liečbu. Infekcie vyvolané týmito mikroorganizmami majú zväčša ťažký priebeh a zároveň ich multirezistencia a produkcia karbapenemáz obmedzuje použitie účinnej terapie (1,5,6).

Najvýznamnejšími producentmi karbapenemáz z gramnegatívnych baktérií sú druhy z radu *Enterobacterales*, hlavne *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli*. Najčastejšie produkujú enzýmy typov KPC (skr. z angl. *Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase*), NDM (skr. z angl. *New Delhi Metallo-β-lactamase*), VIM (skr. z angl. *Verona Integron-encoded Metallo-β-lactamase*) a OXA (najčastejšie OXA-48-like) (skr. z angl. *Oxacillinase*)

(7). Pre ich detekciu je nevyhnutné používať rýchle, jednoduché a reprodukovateľné metódy. Medzi kolorimetrické fenotypové metódy radíme napr. Carba NP test (8) na stanovenie produkcie karbapenemáz zmenou farby indikátora pri zmene pH roztoku, spôsobenej hydrolyzou imipenému (9). Z molekulárnych metód sa používajú hlavne rôzne varianty *multiplex* a *real-time* PCR (10,11). V súčasnosti sa rozvíjajú metódy celogenómového sekvenovania, vrátane analýz génov zodpovedných za produkciu karbapenemáz (12).

Sledovanie výskytu karbapenemáz je kľúčové pre kontrolu šírenia rezistentných baktérií. Celosvetovo, aj v rámci Európskej únie, existujú štandardizované postupy a odporúčania na monitorovanie šírenia týchto enzýmov. V Európe koordinuje sledovanie antimikrobiálnej rezistencie Európske centrum pre prevenciu a kontrolu chorôb (ECDC) prostredníctvom siete EARS-Net (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*). EARS-Net zhromažďuje údaje o výskyte rezistentných mikroorganizmov vrátane baktérií produkujúcich karbapenemázy (CPE, z angl. *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*) z členských štátov EÚ. Na základe týchto údajov ECDC vydáva pravidelné správy a odporúčania (1). Na Slovensku sa sledovaniu výskytu karbapenemáz venuje Národné referenčné centrum pre sledovanie rezistencie mikroorganizmov na antibiotiká (NRC pre ATB), pôsobiace

pod Úradom verejného zdravotníctva SR a zároveň je zapojené do európskej siete EARS-Net. Toto centrum zhromažďuje a analyzuje údaje o rezistencii mikroorganizmov voči antibiotikám, vrátane karbapenemáz. Laboratóriá klinickej mikrobiológie z celého Slovenska majú povinnosť zasielať izoláty s podozrením na produkciu karbapenemáz do NRC na potvrdenie a ďalšie analýzy, vrátane typizácie karbapenemáz (2,4).

Súbor vzoriek

Počas rokov 2019 až 2023 sme v našom laboratóriu (OKM Bakteriológia, CL Bratislava, Medirex, a.s.) sledovali výskyt bakteriálnych kmeňov *Enterobacterales* produkujúcich karbapenemázy. Kmene pochádzali z klinických vzoriek (vzorky moču, spúta, výtery z rekta, stery z rán, hemokultúry a iné) od pacientov všetkých vekových skupín s rôznymi diagnózami.

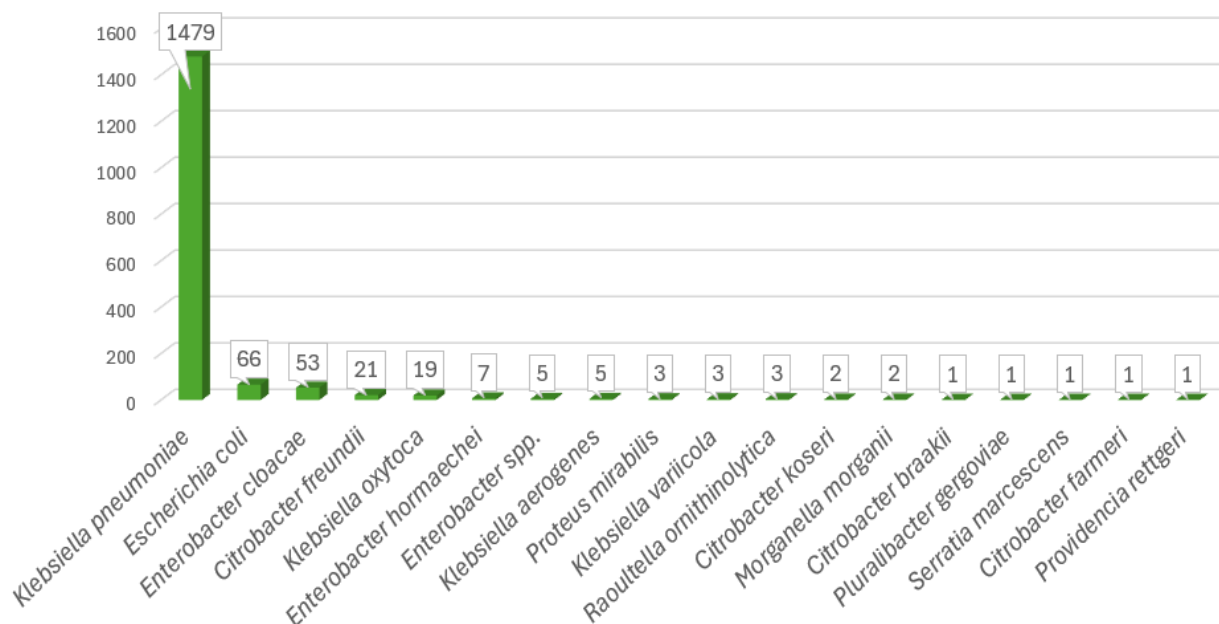
Fenotypová a molekulárna analýza

Kmene so zvýšenou hodnotou minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) na meropeném (> 0,12 mg/l) sme overili opakovaním testu MIC a pomocou diskového difúzneho testu na meropeném (10 µg) na Müller-Hinton agare (MHA). Test sme vyhodnocovali meraním priemeru zóny bez nárastu okolo antibiotického disku podľa štandardov EUCAST (2019-2023). Pokiaľ bola MIC opakovane zvýšená a/alebo inhibičná zóna okolo meropenémového disku mala menej ako 28 mm, kmeň sme podrobili fenotypovému testu CARBA (Diagnostics, Galanta, SR).

Do mikroskúmvky s obsahom imipenému sme pridali 12 až 14 kvapiek roztoku CARBA. Následne sme pomocou inokulačnej kľučky preniesli 10 µl bakteriálnej kultúry a dôkladne zhomogenizovali. Použitá bola čerstvá 24-hodinová bakteriálna kultúra z vhodného kultivačného média (napr. Columbia krvný agar č. 2). Suspenziu sme inkubovali v termostate pri 35 ± 2 °C. Test sa vyhodnocoval maximálne po 2 hodinách. Princípom testu je hydrolyza imipenému produkovanými karbapenemázami. Pozitívny výsledok sa vizualizoval farebnou zmenou suspenzie z červenej na žltú. Každý bakteriálny kmeň s pozitívnym CARBA testom sme odoslali do NRC pre ATB na overenie a detekciu konkrétneho typu karbapenemáz.

Všetky kmene prijaté do NRC pre ATB boli overené na produkciu karbapenemáz, takisto pomocou fenotypového testu podľa vlastného štandardného pracovného postupu. Na extrakciu proteínov bola rozmiešaná plná 10 µl bakteriologická kľučka vykultivovanej kultúry na neselektívnej pevnej pôde v 20 µl extrakčného pufru v mikroskúmvke. Následne sa suspenzia inkubovala pri izbovej teplote maximálne 30 minút.

Na prípravu testovacieho roztoku bolo v kadičke zmiešaných 24 mg imipenému so 16 ml sterilnej destilovanej vody. Bolo pridaných 2 ml 1 mmol/l roztoku ZnSO₄ a 2 ml 0,5% fenolovej červene v destilovanej vode. Hodnota pH bola upravená pridaním 1 mmol/l NaOH na 7,8. Na jeden karbapenemázový test sa z reakčného roztoku odobralo 200 µl do 1,5 ml mikroskúmvky.



Obrázok 1 Bakteriálne kmene s pozitívnou produkciou karbapenemáz

Do mikroskúmvky s reakčnou zmesou roztoku bolo pridaných 20 µl bakteriálneho proteínového extraktu, obsah sa premiešal a inkuboval pri teplote 35 ± 2 °C po dobu maximálne 120 minút. S každou vzorkou sa vykonávala negatívna kontrola tak, že rovnaký bakteriálny proteínový extrakt sa premiešal s kontrolným roztokom rovnakého zloženia ako testovací roztok, avšak bez imipenému. Ako pozitívny bol test odčítaný vtedy, ak v testovacej skúmavke došlo k jednoznačnej zmene farby z červenej na žltú a zároveň v kontrolnej skúmavke ostala farba nezmenená.

Tabuľka 1 PCR cykly na detekciu karbapenemáz (prevzaté z ECDC, 2019)

Cyklus	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	94	5 minút	1
Denaturácia	94	30 sekúnd	30
Annealing	Teplota topenia (52 – 60 °C – podľa génu)	30 sekúnd	
Extenzia	72	1 minúta	
Hold	72	10 minút	1

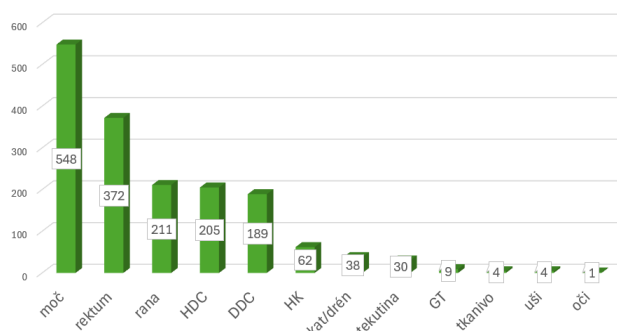
Všetky kmene boli zároveň podrobené analýze pomocou PCR metódy. Postup tejto metódy podlieha technickej správe vydanéj ECDC (3). Na extrakciu DNA sa používa metóda validovaná pre *E. coli* a *K. pneumoniae*. Bakteriálna kultúra sa suspenduje v sterilnom pufrí Tris-EDTA, varí sa pri 100 °C počas 10 minút a centrifuguje sa pri 6000 G počas 5 minút. Supernatant sa rozpustí v pufrí Tris-HCl. Stanovujú sa 4 hlavné enzýmy, ktoré sú kódované na géne *bla*, konkrétne *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* a *bla_{OXA-48}*. Pre každý z týchto génov sú dostupné špecifické primery. Samotný cyklus PCR reakcie s jednotlivými časmi sú uvedené v tabuľke 1.

Výsledky

V rokoch 2019 až 2023 sme v našom laboratóriu zachytili celkovo 1673 bakteriálnych izolátov, ktoré boli pozitívne na produkciu karbapenemáz pomocou CARBA testu. Najviac kmeňov sme zachytili v roku 2021 (503; 30,1%) a najmenej v roku 2019 (185; 11,1%).

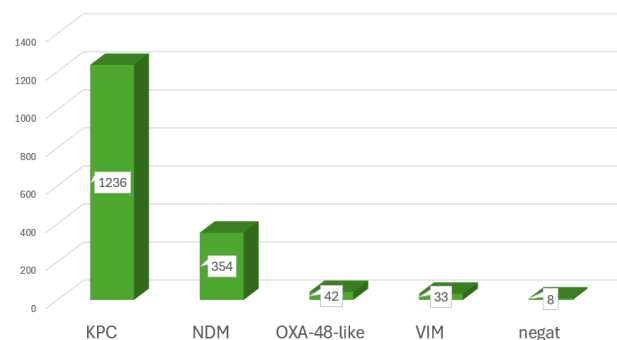
Z celého súboru izolátov boli v najvyššej miere zastúpené kmene *Klebsiella pneumoniae* (1479; 88,4%), nasledovali kmene *Escherichia coli* (66; 3,9%), *Enterobacter cloacae* (53; 3,2%), *Citrobacter freundii* (21; 1,3%) a *Klebsiella oxytoca* (19; 1,1%) (Obrázok 1).

Pozitívne kmene boli najčastejšie izolované zo vzoriek močov (548; 32,8%), nasledovali výtery z rekta (skrining CPE; 372; 22,2%), stery z rán (povrchové rany, ložiská, dekubity, atď.; 211; 12,6%), horné dýchacie cesty (HDC) (205; 12,3%), dolné dýchacie cesty (DDC) (189; 11,3%) (Obrázok 2).

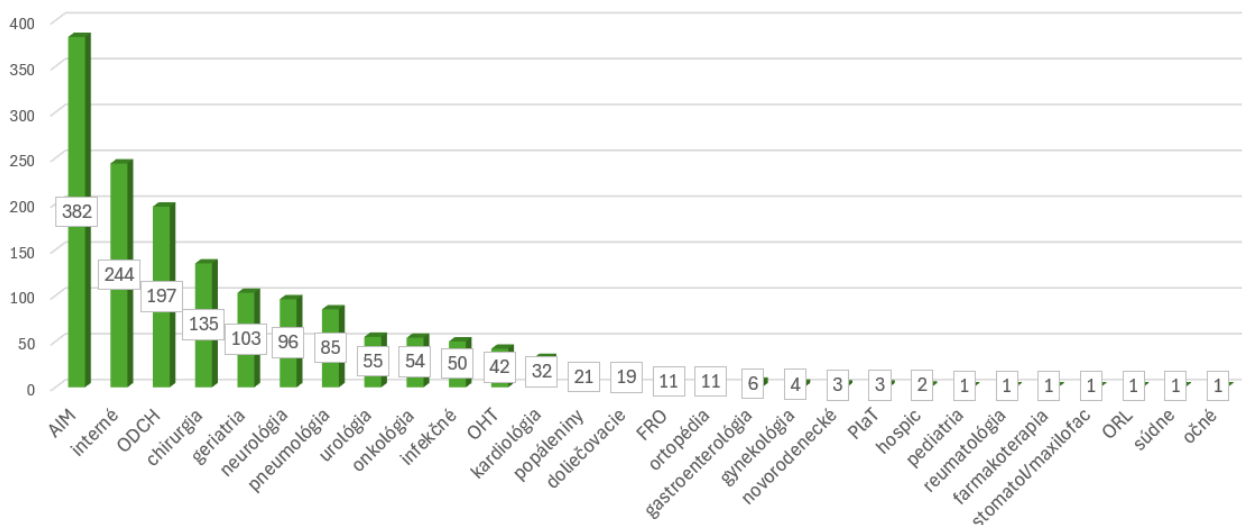


Obrázok 2 Klinické vzorky s izolovanými pozitívnymi bakteriálnymi kmeňmi (Vysvetlivky: HDC – horné dýchacie cesty; DDC – dolné dýchacie cesty; HK – hemokultúra; kat/drén – katéter/drén, GT – genitálny trakt)

Najviac zastúpené oddelenia (1562 vzoriek; 93,4%), z ktorých pochádzali pozitívne vzorky, boli oddelenia anesteziologicko-intenzívnej medicíny (AIM) (382; 24,5%), interné oddelenia (244; 15,6%), oddelenia dlhodobu chorých (ODCH) (197; 12,6%), chirurgické oddelenia (135; 8,6%) a geriatrické oddelenia (103; 6,6%).



Obrázok 3 Detegované typy karbapenemáz (Vysvetlivky: negat – negatívne)



Obrázok 4 Oddelenia, z ktorých pochádzali pozitívne vzorky (Vysvetlivky: AIM – anesteziologicko-intenzívnej medicíny; ODCH – odd. dlhodobo chorých; OHT – odd. hematológie a transfuziológie; FRO – fyziatrisko-rehabilitačné odd.; Plat – pracovné lekárstvo a toxikológia; ORL – otorinolaryngológia)

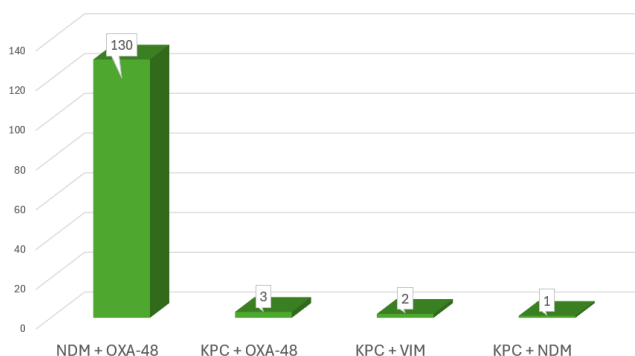
Všetky kmene boli zaslané do NRC pre ATB na overenie produkcie a typizáciu karbapenemáz. Pomocou metód PCR sme detegovali karbapenemázy typu KPC v 1230 (73,5%) prípadoch, typu NDM v 224 (13,4%) prípadoch, typu OXA-48-like v 42 (2,5%) prípadoch a typu

VIM v 33 (2%) prípadoch. Pomocou PCR sa nepodarilo typ karbapenemázy stanoviť v 8 (0,5%) prípadoch, pravdepodobne sa jednalo o iný typ karbapenemáz, aké sú rutinne sledované pomocou PCR (Obrázok 3).

V 136 prípadoch sa nám podarilo zachytiť pri jednom kmeni až dva typy karbapenemáz – v 130 (7,8%) prípadoch sa jednalo o kombináciu NDM a OXA-48-like, v 3 (0,2%) prípadoch sa jednalo o KPC a OXA-48-like, v 2 (0,1%) prípadoch o KPC a VIM a v jednom prípade (0,05%) sme detegovali typy KPC a NDM (Obrázok 5).

Záver

V článku sme prezentovali výsledky prehľadu baktérií produkujúcich karbapenemázy zachytených v laboratóriu OKM Bakteriologie, Medirex, a.s., Bratislava. Celkovo bolo pomocou fenotypového CARBA testu detegovaných 1673 bakteriálnych kmeňov. Najviac zastúpené boli kmene *Klebsiella pneumoniae* (1479; 88,4%), *Escherichia coli* (66; 3,9%) a *Enterobacter cloacae* (53; 3,2%). Najčastejšie pozitívne izoláty pochádzali zo vzoriek močov (548; 32,8%), z výterov z rekta (372; 22,2%) a z ranových infekcií (211; 12,6%). Vzorky pochádzali najmä z oddelení AIM (382; 24,5%), interných oddelení (244; 15,6%) a ODCH (197; 12,6%). Molekulárnou analýzou sme najčastejšie identifikovali karbapenemázy typov KPC (1230; 73,5%), NDM (224; 13,4%) a OXA-48-like (42; 2,5%). Zároveň sa nám podarilo identifikovať kmene produkujúce súčasne dva typy karbapenemáz, najčastejšie to boli kmene produkujúce NDM a OXA-48-like enzýmy (130; 7,8%).



Obrázok 5 Počet kmeňov s dvoma detegovanými typmi karbapenemáz

Baktérie produkujúce karbapenemázy predstavujú závažný globálny problém pri liečbe pacientov. Tieto enzýmy štiepia karbapenémy, antibiotiká tzv. poslednej voľby. Zároveň prinášajú významný problém aj z epidemiologického hľadiska, keďže tieto kmene sa rýchlo šíria v nemocničnom prostredí.

Literatúra:

1. European Centre for Disease Prevention and Control. Last-line antibiotics are failing: options to address this urgent threat to patients and healthcare systems. Stockholm. 2016.
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE). Online: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/directory-guidance-prevention-and-control/prevention-and-control-infections-1>. 2017
3. European Centre for Disease Prevention and Control. Laboratory manual for carbapenem and colistin resistance detection and characterisation for the survey of carbapenem- and colistin-resistant Enterobacteriaceae. Version 2.0. Stockholm. 2019.
4. Štandardný diagnostický a terapeutický postup pre implementáciu antimikrobiálnej politiky v ústavných zdravotníckych zariadeniach. Online: https://www.mzsr.sk/Zdroje?/Sources/dokumenty/SDTP/standarty/1-6-2020/096_KM_Standardny_diagnosticky_a_therapeuticky_postup_pre_implementaciu_antimikrobialnej_politiky.pdf. 2020.
5. Magiorakos AP, Burns K, Rodríguez Baño J. et al. Infection prevention and control measures and tools for the prevention of entry of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae into healthcare settings: guidance from the European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrob Resist Infect Control* 6, Vol. 113. 2017.
6. Hnilicová S. Molekulárno-epidemiologická analýza karpapenemázy-produkujúcich baktérií izolovaných z lôžkových zdravotníckych zariadení v SR. Dizertačná práca. Trnavská univerzita v Trnava. Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce; Katedra Laboratórných a vyšetrovacích metód v zdravotníctve. Trnava: FZaSP, 2018.
7. Escandón-Vargas K, Reyes S, Gutiérrez S, Villegas MV. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 15(3):277-297. 2016.
8. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg. Infect. Dis.* 18:1503–1507. 2012.
9. Suriya R V, Leela KV, Feliciano J H, et al. Diagnostic Test Precision of Modified Carbapenem Inactivation Method and Carbapenemase Nordmann-Poirel Test for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production in Enterobacterales: A Systematic Review. *Cureus* 16. 2024.
10. Gao N, Zhou J, Li G, Liu R, Lu G, Shen J. Methodological Evaluation of Carbapenemase Detection by Different Methods. *Polish Journal of Microbiology. Sciendo*, 73(3): 383-394. 2024.
11. Wei M, Chen X, Liu J, Li T, Wang P, Wang S, Gu L. Development and Validation of a Novel Multiplex Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Carbapenemase Genes in Carbapenem-Resistant Enterobacterales Isolates and Clinical Samples. *Infection and Drug Resistance*, 17, 3451–3462. 2024.
12. Fuchs F, Xanthopoulou K, Burgwinkel T, del Pino RA, et al. Coexistence of seven different carbapenemase producers in a single hospital admission screening confirmed by whole-genome sequencing. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, Volume 39. Pg. 184-188. 2024.
13. Cui X, Zhang H, Du H. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Detection and Antimicrobial Therapy. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 10. 2019.

RNDr. Soňa Kissová, PhD.

Oddelenie klinickej mikrobiológie
Medirex, a.s., Bratislava
sona.kissova@medirexgroup.sk