

Záchyt *Pseudomonas tohonis* s produkcí neobvyklé metalo-beta-laktamázy z kožního defektu u dvou pacientů v České republice

Detection of Pseudomonas tohonis with unusual metallo-beta-lactamase production from a skin defect in two patients in the Czech Republic

Vladislav Jakubů, David Šůs, Eva Chmelařová, Lucia Mališová, Barbora Zapletalová, Petra Španělová a Helena Žemličková

Souhrn • Summary

Článek popisuje záchyt nového druhu pseudomonády (*Pseudomonas tohonis*) popsané poprvé v Japonsku v roce 2021. Tento druh je mimo jiné charakteristický rezistencí ke karbapenemům v důsledku produkce druhově specifické metalo-beta-laktamázy. Dva kmeny tohoto druhu byly izolovány z klinického materiálu od pacientů hospitalizovaných v českých nemocnicích.

The article describes the detection of a new species of pseudomonad (*Pseudomonas tohonis*) described for the first time in Japan in 2021. Among other things, this species is characterized by resistance to carbapenems due to the production of a species specific metallo-beta-lactamase. Two strains of this species were isolated from clinical material from patients hospitalized in Czech hospitals.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha). 2024; 33(11-12): 419–421

Klíčová slova: *Pseudomonas*, metalo-beta-laktamáza, blaPAM

Keywords: *Pseudomonas*, metallo-beta-lactamase, blaPAM

Na jaře roku 2024 byl do Národní referenční laboratoře pro antibiotika (NRL ATB) zaslán vzorek *Pseudomonas* sp. z pracoviště klinické mikrobiologie nemocnice v Českých Budějovicích. Vzorek pocházel z výtěru z defektu od 64letého muže s diagnózou „žilní městky dolních končetin se

vředem“. Druhá identifikace izolátu nebyla průkazná, izolát byl referován z důvodu podezření na produkci karbapenamázy.

Čitlivost k antibiotikům byla stanovena bujónovou mikrodiluční metodou (BDM) dle EUCAST. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla vyšetřena u následujících antibiotik: piperacilin/tazobaktam 16 mg/l; ceftazidim 32 mg/l; cefepim 4 mg/l; ceftazidim-avibaktam 32 mg/l; ceftolozan/tazobaktam 32 mg/l; meropenem >16 mg/l; meropenem/vaborbaktam 16 mg/l; imipenem/relebaktam

4 mg/l; ciprofloxacin 0,125 mg/l; levofloxacin 0,25 mg/l; tobramycin 0,25 mg/l; amikacin 1 mg/l; kolistin 0,25 mg/l a cefiderokol $\leq$ 0,125 mg/l [1]. Fenotypový průkaz metalo-beta-laktamázy (MBL) pomocí diskového testu EDTA/meropenem a EDTA/imipenem byl pozitivní [2]. Kolem meropenemu i imipenemu byly vytvořeny inhibiční zóny (s naměřenými hodnotami 16 mm, resp. 13 mm) s rozšířením směrem k disku s EDTA indukující přítomnost MBL. Detekce hydrolytické aktivity karbapenemázy za přítomnosti meropenemu pomocí MALDI-TOF MS byla spíše pozitivní [3]. PCR průkaz karbapenemázy typu VIM, IMP, NDM a beta-laktamázy/karbapenemázy GES byl ovšem negativní.

Druhá identifikace za použití MALDI-TOF-MS (Microflex, Bruker, databáze Revision K - 4274 druhů/záznamů) určila kmen pouze druhově jako *Pseudomonas* sp. s identifikačním skóre 1,83. Možné nabízené druhy měly nízké identifikační skóre *P. mendocina*, *P. resinovorans*, *P. alcaligenes*, *P. flavescens*, *P. anguilliseptica* a *P. oryzae*.

U kmene byla proto provedena celogenomová sekvenace (WGS). Extrakce genomové DNA byla uskutečněna dle návodu výrobce kitu (New England Biolabs, Monarch® Genomic DNA Purification Kit). Koncentrace DNA a její čistota byla měřena na fluorometru Qubit™ 4 (Invitrogen). Na cyklu Biometra Tone (Analytik Jena) proběhla fragmentace a amplifikace dílčích knihoven. Následně byla jejich kvalita ověřena na Agilent TapeStation 4150 (Agilent). Vlastní sekvenace proběhla na platformě Illumina MiSeq. Sekvenovaný genom byl anotován pomocí programu PROKKA v. 1.14.6 [4]. CDS genomu byl blastován pomocí odpovídajících databází. Identifikace byla určena na on-line platformě Ribosomal MLST (PubMLST, <https://pubmlst.org/species-id>). Geny rezistence byly detekovány pomocí nástroje AMR Finder v.3.12.8 (DB v. 2024-07-22; <https://github.com/ncbi/amr>). Vyhodnocení WGS dat ukázalo zachyt raritního druhu pseudomonády. Kmen byl nástrojem Ribosomal MLST identifikován se 100% shodou s databází jako *Pseudomonas tohoni*.

U kmene byly detekovány tyto geny rezistence: *qacEdelta1* pro rezistenci na kvartérní amoniové soli, *sul1* a *dfra33* (rezistence k sulfamethoxazolu resp. k trimetoprimu) - tyto geny jsou pravděpodobně nesené na plazmidu (viralverify - <https://github.com/ablab/viralVerify>). Především byl ale na chromozomu detekován gen *blaPAM-2* – MBL s aktivitou proti beta-laktámům/karbapenemům. Všechny geny byly určeny se 100% identitou k referenčnímu genu z použité detekční databáze.

Druh *P. tohoni* je nedávno popsán kmen pseudomonády z Japonska, kde byl v roce 2018 izolován z kůže pacienta s popáleninami [5]. Tento druh byl identifikován na základě

genetických a fenotypických analýz. Bakterie je kultivovatelná při teplotách 20–42 °C s optimem při 30–35 °C. Fylogenetická a 16S rDNA analýza ukázala, že je blízké příbuzná s druhem *P. alcaligenes* (99,08 %) a *P. otitidis* (98,51 %), ale vykazuje jasné genetické rozdíly. Tento nový druh byl v roce 2021 pojmenován *P. tohoni* na počest Toho University, kde byl poprvé izolován z klinického vzorku a analyzován.

Bakterie je aerobní, gramnegativní, pohyblivá a nespolující s prodlouženým tyčinkovitým tvarem (1,0–2,0 µm dlouhá a 0,5–0,8 µm široká). Kolonie tvořené na Mueller-Hinton agaru jsou drsné, pastelově zelené barvy a mají průměr 2–4 mm po 24 hodinách kultivace při 35 °C. Kolonie emitují modrou fluorescenci pod UV světlem, což je způsobeno produkcí pyoverdinu. Po biochemické stránce *P. tohoni* vykazuje pozitivní reakce na katalázu, oxidázu, redukci dusičnanů (slabě pozitivní) a želatinázu. Negativní reakce byly pozorovány u ureázy a β-galaktosidázy. Utilizace byla pozorována u glukózy, d-xylózy, d-fruktózy, l-argininu, citrátu sodného, fenylacetátu, n-kapronové kyseliny a malonátu sodného. Naopak nezpracovává N-acetyl-d-glukosamin, d-arabitol, laktózu, d-mannitol, d-mannózu, d-sorbitol, d-serobiózu, l-arabinózu, d-galaktózu, maltózu, sacharózu, trehalózu, l-histidin, l-oritin, l-lysin, 5-ketoglukonovou kyselinu, N-acetylglukosamin, glukonát draselný, adipové kyseliny a l-γ-glutamyl-p-nitroanilid.

U kmene byl prokázán gen *bla_{PAM-2}*, který kóduje MBL PAM-2. Zinek dependentní MBL jsou řazeny do tří podskupin: B1, B2 a B3. Zatímco B1 podskupina zahrnuje nejčastější enzymy asociované s transferabilní rezistencí (NDM, IMP a VIM), B2 enzymy jsou typické pro *Aeromonas hydrophila* complex (CphA) a *Pseudomonas fluorescens* complex (PFM). B3 podskupina enzymů je nalézána u glukóza nefermentujících bakterií a patří sem druhově specifické enzymy, např. L1 *Stenotrophomonas maltophilia*, POM1 *Pseudomonas otitidis* nebo PAM-1 *Pseudomonas alcaligenes*. MBL našeho izolátu je jednou ze dvou nových variant PAM (PAM-2 a PAM-3), které byly popsány při analýze MBL tří japonských klinických vzorků *P. tohoni* [6]. Na základě vlastností byly varianty PAM zařazeny do výše popsané podskupiny B3 MBL. Nové varianty PAM (PAM-2 a PAM-3) jsou z B3 podskupiny sekvenčně nejvíce podobné PAM-1 *P. alcaligenes*. Tyto enzymy jsou schopné hydrolyzovat široké spektrum beta-laktamových antibiotik, včetně karbapenemů. Efektivně hydrolyzují beta-laktamy (ampicilin, piperacilin), některé cefalosporiny (ceftazidim, cefotaxim) a karbapenemy (meropenem). Hydrolytická aktivita vůči cefepimu a imipenemu je nižší, enzymy jsou také méně inhibovány EDTA [6].

U izolátu *P. tohoni* se bohužel nepodařilo získat více podrobností o pacientovi. Tento článek proto popisuje jen detekci relativně nového environmentálního druhu

pseudomonády zachycené v klinickém humánním materiálu. V životním prostředí byl tento druh izolován z rhizosféry (půda v bezprostředním okolí kořenů) přesličníku. Aplikace tohoto druhu bakterie účinně chrání některé rostliny (přesličník, podzemnice olejná a rajčata) před infekcí způsobenou *Ralstonia solanacearum* [7]. Popisovaná MBL PAM-2 je druhově specifická, korektní identifikace druhu by tak měla postačovat k určení této inherentně přítomné MBL. Správnou druhovou identifikaci ale v současnosti MALDI-TOF MS neumožňuje. Identifikace je možná pouze pomocí sekvenace (WGS nebo parciální 16S rDNA sekvenace) nebo dle biochemických markerů popsanych výše. MIC meropenemu je popisována v širokém rozmezí, testování citlivosti je tak jednoznačně primárním zdrojem informací o aktivitě enzymu.

Dodatek: V lednu 2025 byl osekvenován další nejasný vzorek *Pseudomonas* sp. pocházející z ostravské laboratoře, který byl do NRL ATB zaslán během léta ze stěru od 77letého muže s diagnózou „vřed dolní končetiny“. Pomocí analýz WGS dat byl kmen identifikován opět jako *P. tohoni* se stejnou výbavou genů rezistence jako byl první vzorek. Vzorky se ale liší citlivostí k meropenemu, u druhého vzorku byla stanovena MIC jen 1 mg/l.

LITERATURA

- [1] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0, 2024. <http://www.eucast.org>
- [2] Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. 2003. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 41: 4623–4629
- [3] Rotova V, Papagiannitsis CC, Skalova A, Chudejova K, Hrabak J. 2017. Comparison of imipenem and meropenem antibiotics for the MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity. *J Microbiol Methods.* 2017; 137: 30–33
- [4] T Seemann. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014; 30 : 2068–2069
- [5] Yamada K, Sasaki M, Aoki K, Nagasawa T, Murakami H, Ishii M, Shibuya K, Morita T, Ishii Y, Tateda K. *Pseudomonas tohoni* sp. nov., isolated from the skin of a patient with burn wounds in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2021; 71(11). doi: 10.1099/ijsem.0.005115. PMID: 34762579.
- [6] Yamada K, Yoshizumi A, Nagasawa T, Aoki K, Sasaki M, Murakami H, Morita T, Ishii Y, Tateda K. Molecular and biochemical characterization of novel PAM-like MBL variants, PAM-2 and PAM-3, from clinical isolates of *Pseudomonas tohoni*. *J Antimicrob Chemother.* 2022; 77(9): 2414–2418. doi: 10.1093/jac/dkac210. PMID: 35786775.
- [7] Wang S, Hu M, Chen H, Li C, Xue Y, Song X, Qi Y, Liu F, Zhou X, Zhang LH, Zhou J. *Pseudomonas forestsoilum* sp. nov. and *P. tohoni* biocontrol bacterial wilt by quenching 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *Front Plant Sci.* 2023 Jun 30;14:1193297. doi: 10.3389/fpls.2023.1193297. PMID: 37457350; PMCID: PMC10349395.

Podpořeno z projektu „Genomická surveillance vybraných infekčních nemocí v České republice“. Grant č. 101113387 - HERA2CZ.

Vladislav Jakubů^{1,2}, David Šūs³, Eva Chmelařová⁴,
Lucia Mališová^{1,2}, Barbora Zapletalová¹,
Petra Španělová⁵ a Helena Žemličková^{1,2}

¹ Národní referenční laboratoř pro antibiotika, Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Státní zdravotní ústav;

² Ústav mikrobiologie 3. LF UK, FNKV a SZÚ;

³ Laboratoř klinické mikrobiologie, nemocnice České Budějovice;

⁴ Laboratoř klinické mikrobiologie, AGEL, Ostrava-Vítkovice;

⁵ Česká národní sbírka typových kultur (CNCTC), Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Státní zdravotní ústav.