

# Metallo- $\beta$ -Laktamasen

Rainer Hartl

Nationales Referenzzentrum für antimikrobielle Resistenzen

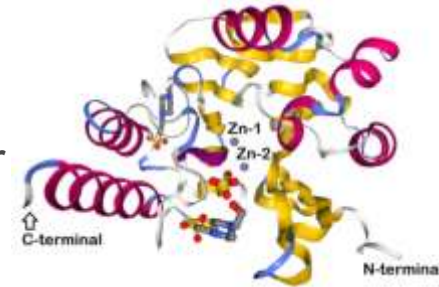
Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Tropenmedizin

Ordensklinikum Linz Elisabethinen

# Metallo- $\beta$ -Laktamasen

## Klassifikation

- Bakterielle Enzyme, die in der Lage sind Carbapeneme zu inaktivieren (=Carbapenemasen)
- Struktur und Wirkmechanismus im Vergleich zu Serin- $\beta$ -Laktamasen unterschiedlich (unterschiedlicher evolutionärer Ursprung?)
- Alle Gruppen enthalten die für Metallohydrolasen typische  $\alpha\beta$  bzw.  $\beta\alpha$  Faltung
- **Zinkionen** aktivieren ein Wassermolekül, welches den  $\beta$ -Laktamring öffnet (= Enzymaktivität ist zinkabhängig)



# Metallo- $\beta$ -Laktamasen

## Klassifikation

- B1/3: weisen eine flache Furche im aktiven Zentrum auf, die 1 oder 2 katalytisch wirksame zweiwertige **Zinkionen** enthält. Diese werden von flexiblen Schleifen flankiert
- Zahlreiche Typen, daher Klassifikation notwendig:
  - Bush-Jacoby Medeiros-Klasse (Substratprofile, Inhibition): **3**
  - Ambler Klassifikation (Aminosäuresequenz): **B**
    - Subklassen **B1**, B2 und **B3**: abhängig von AS-Sequenz der „active site“, des Zink-Liganden, der Zink-Stöchiometrie und der Substratprofile
    - Die meisten klinisch relevanten Enzyme gehören zur Subklasse B1: z.B: IMP, NDM, VIM und inaktivieren mit Ausnahme von Monobactamen alle klinisch verfügbaren  $\beta$ -Laktame

# Metallo- $\beta$ -Laktamasen Klassifikation

**TABLE 1** Examples of chromosomal and plasmid-associated MBLs (11)

MBL type	Species	Enzyme(s)	Subclass
Chromosomal	<i>Bacillus cereus</i>	BcII	B1
	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	IND	B1
	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	BlaB	B1
	<i>Myroides odoratimimus</i>	MUS and MYO	B1
	<i>Bacteroides fragilis</i> <sup>a</sup>	CfiA/CcrA	B1
	<i>Aeromonas</i> spp.	CphA	B2
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	L1	B3
	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	GOB	B3
Plasmid associated	Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase (VIM)		B1
	New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM)		B1
	Imipenemase (IMP)		B1
	Sao Paulo metallo- $\beta$ -lactamase (SPM)		B1
	German imipenemase (GIM)		B1
	KHM		B1
	Dutch imipenemase (DIM)		B1
	<i>Serratia</i> metallo- $\beta$ -lactamase (SMB)		B3
	Adelaide imipenemase (AIM)		B3
	<i>Enterobacterales</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> Komplex		

<sup>a</sup>Unlike most other chromosomal MBLs, the *Bacteroides fragilis* enzyme is rare in the species.

# Beta-Laktamasen

## Hydrolytisches Spektrum

A: ESBL

C: AmpC

A

B 1/3

D

Penicilline

Cephalosporine I-II



Cephalosporine III

Cephalosporine IV

Carbapeneme

Monobactame

Carbapenemase

 Keine (schwache) Hydrolyse  
 Klinisch relevante Hydrolyse

# Epidemiologie

## *Enterobacterales*

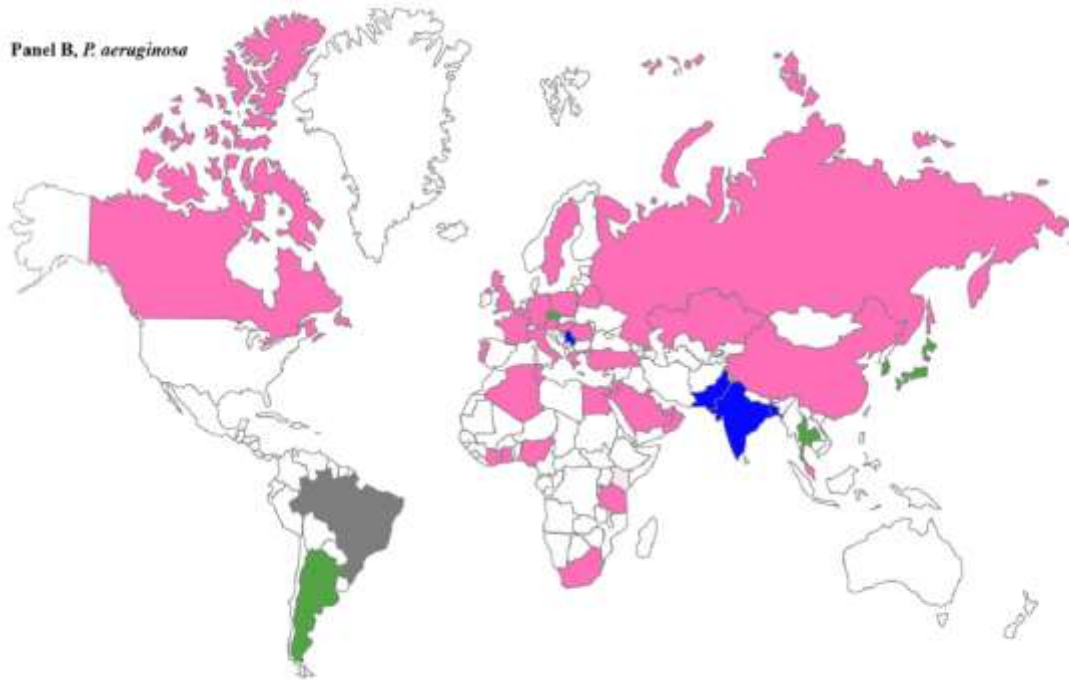
Panel A. Enterobacterales



Full-tone color is used when the indicated MBL is the most prevalent carbapenemase in the country. The lighter tone is used to indicate the most prevalent MBL group in countries where serine carbapenemases (KPC or OXA-48-like) are more prevalent. Panel A, Enterobacterales; Panel B, *P. aeruginosa*

# Epidemiologie

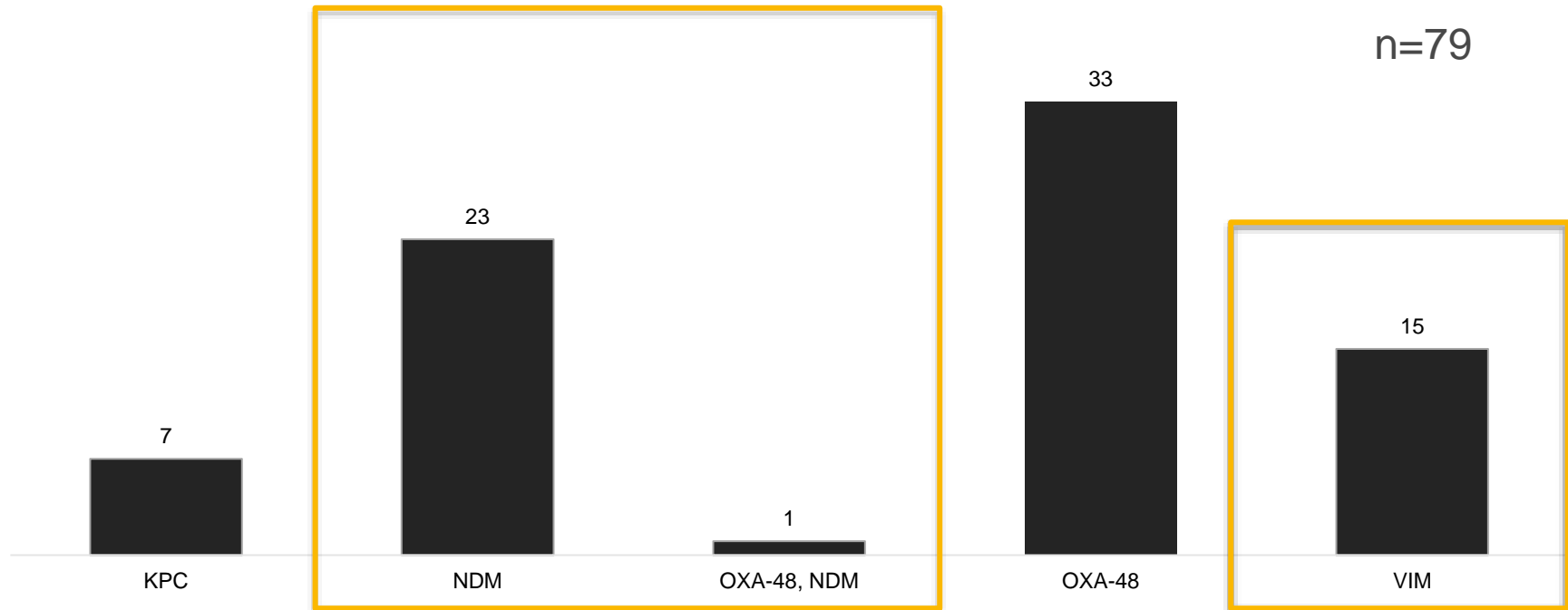
## *Pseudomonas aeruginosa*



\*In the USA there are just a few reports of *P. aeruginosa* with either IMP or VIM MBLs

# CARBA-Net 2020

## *Enterobacterales*

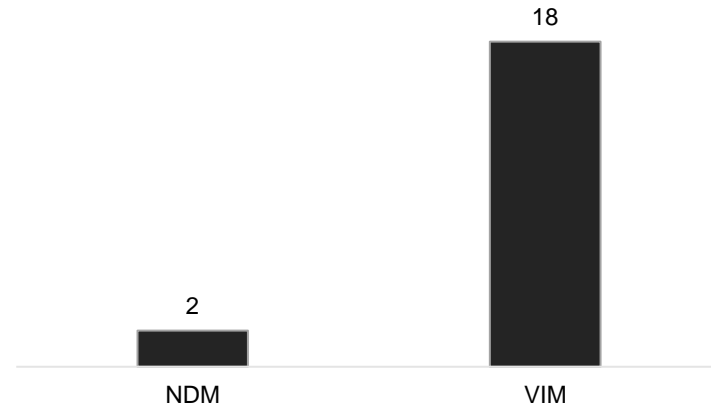




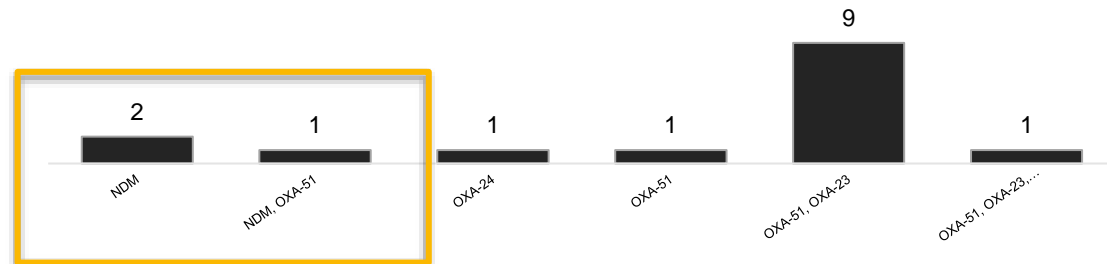
# CARBA-Net 2020

## *Pseudomonas aeruginosa* / *Acinetobacter*

*P. aeruginosa*, n=20



*A. baumannii* Komplex, n=15



# Empfindlichkeitstestung Detektion

## Enterobacterales\*

### Expert Rules and Intrinsic Resistance Tables

EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 11.0, valid from 2021-01-01

Carbapenems <sup>1</sup>	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)		
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU
Doripenem	1	2		10	24	21	
Ertapenem	0.5	0.5		10	25	25	
Imipenem, Enterobacterales except Morganellaceae	2	4		10	22	19	
Imipenem <sup>2</sup> , Morganellaceae	0.001	4		10	50	19	
Imipenem-relebactam, Enterobacterales except Morganellaceae	2 <sup>3</sup>	2 <sup>3</sup>		10-25	22	22	
Meropenem (indications other than meningitis)	2	8		10	22	16	
Meropenem (meningitis)	2	2		10	22	22	
Meropenem-vaborbactam	a <sup>4</sup>	a <sup>4</sup>		IP	IP	IP	

### Notes

Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints.

Lettered notes relate to the disk diffusion method.

1. Some isolates that produce carbapenemase are categorised as susceptible with the current breakpoints and should be reported as tested, i.e. the presence or absence of a carbapenemase does not in itself influence the categorisation of susceptibility. Carbapenemase detection and characterisation are recommended for public health and infection control purposes. For carbapenemase screening a meropenem screening cut-off of >0.125 mg/L (zone diameter <28 mm) is recommended.

2. The intrinsically low activity of imipenem against *Morganella morganii*, *Proteus* spp. and *Providencia* spp. requires the high exposure of imipenem.

3. For susceptibility testing purposes, the concentration of relebactam is fixed at 4 mg/L.

4. For susceptibility testing purposes, the concentration of vaborbactam is fixed at 8 mg/L.

# Empfindlichkeitstestung

## Alles klar bei MBL!

### 1. *Klebsiella pneumoniae*

Modifizierter Hodge-Test positiv für Imipenem, Ertapenem und Meropenem.  
Meropenem-DPA Synergismus nachgewiesen.

Phänotypisch Hinweis auf Vorliegen einer Carbapenemase der Klasse Ambler B (Metallo- $\beta$ -Laktamase).

Mittels Betalaktamase-Assay (CARBA-NP Test 1) hydrolytische Aktivität des Isolats gegenüber Imipenem nachweisbar.  
Carbapenemasebildung molekularbiologisch bestätigt (Nachweis von NDM). Weiters Nachweis von ESBP (CTX-M1) sowie einer SHV und TEM Betalaktamase vom Wildtyp.

4 MRGN: Krankenhaushygiene kontaktieren!

Antibiogramm	1
Ampicillin iv	R
Amoxicillin-Clavulansäure iv	R
Cefuroxim iv	R
Cefotaxim	R
Ceftazidim	R
Cefepim	R
Cefiderocol	S
Ceftazidim-Avibactam	R
Ceftolozan-Tazobactam	R
Meropenem	R
Imipenem-Relebactam	R [4]
Meropenem-Vaborbactam	S [4]
Ciprofloxacin	R
Amikacin	R
Gentamicin	R
Tobramycin	R
Tigecyclin	[1]
Colistin	S [0,5]

# Empfindlichkeitstestung

## Alles klar bei MBL?

- Einige Casereports berichteten von positivem Outcome einer  $\beta$ -Laktamtherapie bei Patienten mit MBL Infektionen (in vitro: Carbapenemresistenz)
- Tiermodell: deutliche Reduktion von MBL produzierenden Erregern nach Exposition gegenüber Carbapenemen
- Bisherige Erklärungsversuche der in vitro – in vivo Diskordanz:
  - „Fitness cost“
  - Geringere Enzymexpression in vivo

Infect Drug Resist 2015; 8: 297–309

Infection 2018; 46: 1–13.

Antimicrob Agents Chemother 2013; 57: 3936–40.

# Empfindlichkeitstestung Rolle von Zink-Ionen

*J Antimicrob Chemother*  
doi:10.1093/jac/dkz532

**Journal of  
Antimicrobial  
Chemotherapy**

---

## **Metallo- $\beta$ -lactamase resistance in Enterobacteriaceae is an artefact of currently utilized antimicrobial susceptibility testing methods**

**Tomefa E. Asempa<sup>1</sup>, Kamilia Abdelraouf<sup>1</sup> and David P. Nicolau<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup>Center for Anti-Infective Research and Development, Hartford Hospital, 80 Seymour Street, Hartford, CT, USA; <sup>2</sup>Division of Infectious Diseases, Hartford Hospital, 80 Seymour Street, Hartford, CT, USA

# Empfindlichkeitstestung

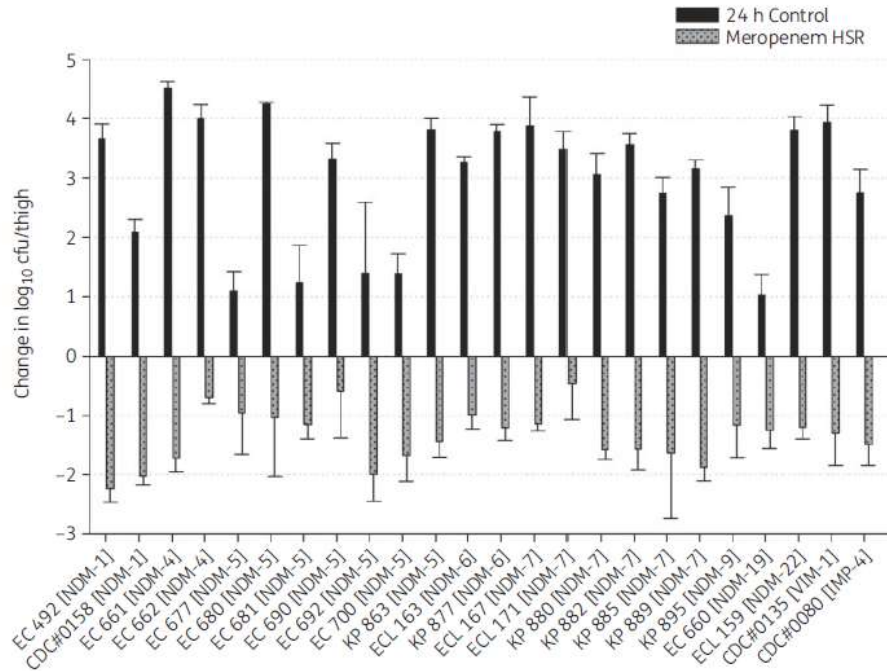
## Rolle von Zink-Ionen

**Table 1.** Genotypic and phenotypic profiles of MBL- and serine-carbapenemase-producing isolates utilized in the murine lung infection model

Bacterial isolate			Meropenem MIC (mg/L) in:			Levofloxacin MIC (mg/L) in:		
ID	species	$\beta$ -lactamases encoded	CAMHB	EDTA-treated broth	Chelex-treated broth	CAMHB	EDTA-treated broth	Chelex-treated broth
MBL-producing isolates:								
EC 492	<i>E. coli</i>	NDM-1, CTX-M-3, TEM	>64	$\leq 0.06$	$\leq 0.06$	64	>64	64
CDC# 0158 <sup>a</sup>	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1, CTX-M-15, OXA-1, TEM-1B	>64	0.5	0.5	16	8	32
KP 593	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1, SHV-11, CTX-M-15, OXA-1	64	$\leq 0.06$	$\leq 0.06$	1	1	1
KP 611	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1, SHV-1, CMY-6, CTX-M-15, TEM-1	>64	$\leq 0.06$	$\leq 0.06$	8	8	16
ECL 101	<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM-1, LAP-2, ACT-17, TEM-1	>64	$\leq 0.06$	0.125	>64	>64	>64
CDC# 0135 <sup>a</sup>	<i>K. pneumoniae</i>	VIM-1, OXA-9, SHV-12, TEM-1A	32	$\leq 0.06$	$\leq 0.06$	64	64	>64
CDC# 0076 <sup>a</sup>	<i>K. pneumoniae</i>	VIM-1, SHV-30	32	$\leq 0.06$	$\leq 0.06$	2	1	1
KP 470	<i>K. pneumoniae</i>	VIM-1	64	$\leq 0.06$	$\leq 0.06$	16	16	16
CDC# 0080 <sup>a</sup>	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-4, OKP-B-2, OXA-1, SFO-1, TEM-1B	16	0.25	0.5	0.125	$\leq 0.06$	0.125
KP 474	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-26	32	$\leq 0.06$	0.125	8	8	8
Serine carbapenemase-producing isolates								
CDC# 0132 <sup>a</sup>	<i>E. cloacae</i>	NMC-A	32	32	32	0.125	$\leq 0.06$	0.125
CDC# 0120 <sup>a</sup>	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2, TEM-1D	64	64	64	64	64	64
CDC# 0125 <sup>a</sup>	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3, OXA-9, TEM-1B	64	32	32	>64	>64	>64
CDC# 0061 <sup>a</sup>	<i>E. coli</i>	KPC-3, OXA-9, TEM-1A	8	8	8	$\leq 0.06$	$\leq 0.06$	$\leq 0.06$

<sup>a</sup>Clinical isolates obtained from FDA-CDC Antimicrobial Resistance Isolate Bank.

# Empfindlichkeitstestung Rolle von Zink-Ionen



**Figure 2.** Mean change in log<sub>10</sub> cfu/thigh ± SD at 24 h relative to 0 h controls with meropenem HSR against MBL-producing clinical Enterobacteriaceae isolates including a variety of NDM variants in the thigh infection model.

# Empfindlichkeitstestung

## Rolle von Zink-Ionen

- Bisher verwendete Testsysteme können tatsächliche in vivo Resistenz im Spannungsfeld „Zink Mangel am Infektionsort vs. Zink Überangebot im verwendeten Testmedium“ nicht korrekt abbilden
- Abschätzung der in vivo Wirksamkeit von Meropenem bei MBL produzierenden *Enterobacterales* benötigt wahrscheinlich MHK Bestimmung mit Zn<sup>2+</sup>-depletierten Medien



# Wie konnte sich NDM-1 so rasch verbreiten?

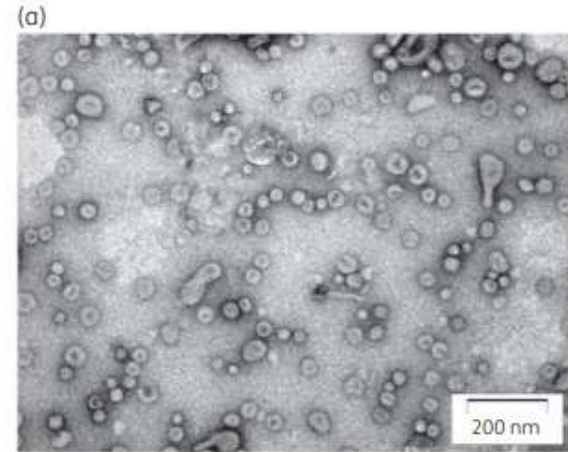
J Antimicrob Chemother 2017; 72: 2201–2207  
doi:10.1093/jac/dkx131 Advance Access publication 12 May 2017

Journal of  
Antimicrobial  
Chemotherapy

## *Acinetobacter baumannii* transfers the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene via outer membrane vesicles

Samdatta Chatterjee<sup>1</sup>, Ayan Mondol<sup>2</sup>, Shravani Mitra<sup>1</sup> and Sulagna Basu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Bacteriology, National Institute of Cholera and Enteric Diseases, P33, CIT Road, Scheme XM, Beliaghata, Kolkata 700010, India; <sup>2</sup>Division of Pathophysiology, National Institute of Cholera and Enteric Diseases, P33, CIT Road, Scheme XM, Beliaghata, Kolkata 700010, India

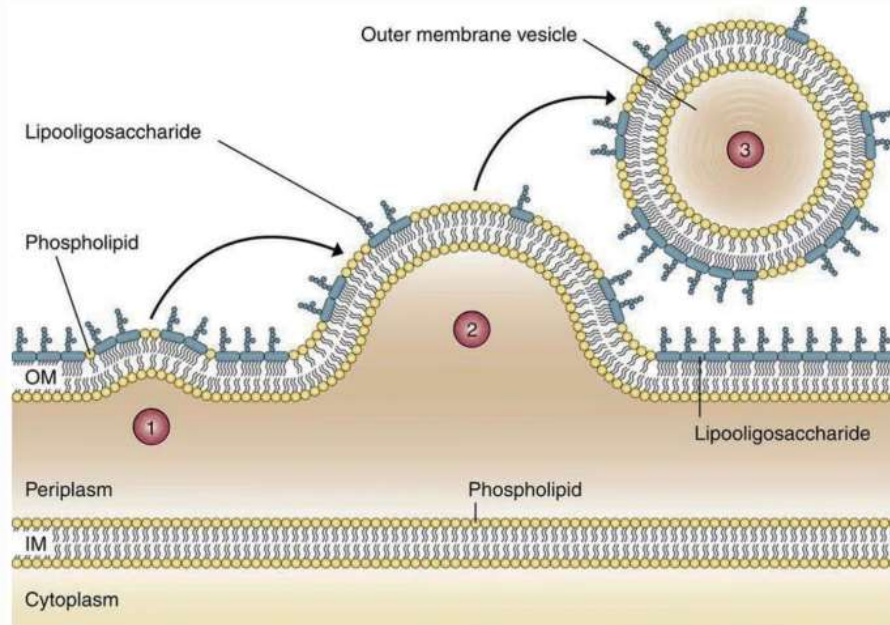


- Erstmaliger Beweis eines intra- und inter-Spezies Transfers eines Plasmids mit *bla*<sub>NDM-1</sub> mittels OMV (outer membrane vesicles) bei *Acinetobacter baumannii*

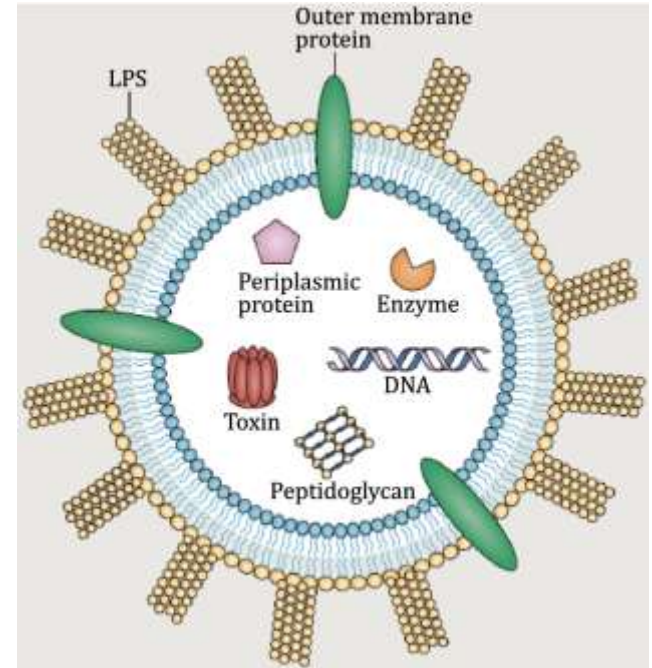
J Antimicrob Chemother 2017; 72: 2201–2207  
Biophysics Reports volume 5, pages184–198 (2019)

# Wie konnten sich MBL so rasch verbreiten?

Fig. 2



A typical biogenesis of OMV of Gram-negative bacteria (Roier *et al.* 2016)



Biophysics Reports volume 5, pages184–198 (2019)






# Übertragung von NDM-1



RESEARCH ARTICLE



## On the Offensive: the Role of Outer Membrane Vesicles in the Successful Dissemination of New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase (NDM-1)

 Melina M. B. Martínez,<sup>a,i</sup>  Robert A. Bonomo,<sup>b,c,d,e,j,k,l,m</sup>  Alejandro J. Vila,<sup>e,f,g</sup>  
 Paulo C. Maffia,<sup>a,h,i</sup>  Lisandro J. González<sup>f,g</sup>

mBio 2021 Oct 26;12(5):e0183621.

# Übertragung von MBL

- NDM-1 ist in der äußeren Membran von gramnegativen Erregern verankert
  - Zahlreiche andere MBL liegen gelöst im periplasmatischen Raum vor
  - Elektrostatische Interaktionen vermitteln NDM-1 Export in OMVs bei *E. coli*
  - Interaktionen wurden auch bereits für andere MBLs gezeigt (z.B. IMP-1)
- OMVs mit NDM-1 schützen Meropenem sensible *E. coli* Isolate vor AB Wirkung im *Galleria mellonella* Infektionsmodell
  - Gleicher Effekt konnte für *P. aeruginosa* gezeigt werden
- OMVs spielen wahrscheinlich große Rolle in der Etablierung von „bacterial communities“ und damit einhergehend der Verbreitung von Resistenzdeterminanten
  - Ergänzender Mechanismus zu den bisher bekannten Formen des horizontalen Gentransfers

# Zusammenfassung

- MBL sind eine bakterielle Erfolgsgeschichte und haben sich innerhalb kürzester Zeit global bei gramnegativen Erregern ausgebreitet
  - Trotzdem sehr heterogene Enzymgruppe
- Eine Ursache des Erfolgs von NDM dürfte in der effizienten Verbreitung über OMVs liegen
  - Ergänzender Mechanismus zu bisher bekannten Formen des horizontalen Gen-Transfers
- Die Empfindlichkeitstestung von Carbapenemen bei (NDM-)MBL Isolaten ist eine Herausforderung
  - $Zn^{2+}$  Konzentration als kritischer Faktor
- Vielversprechende neue Therapiealternativen für MBL sind in nächster Zeit zu erwarten

**Vielen Dank für Ihre  
Aufmerksamkeit!**