

Joanna Kwiecińska-Piróg, Tomasz Bogiel, Eugenia Gospodarek

WYSTĘPOWANIE BETA-LAKTAMAZ O ROZSZERZONYM ZAKRESIE SUBSTRATOWYM WŚRÓD SZCZEPÓW *PROTEUS MIRABILIS* IZOLOWANYCH W LATACH 2007-2009

THE INCIDENCE OF EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASES IN *PROTEUS MIRABILIS* STRAINS ISOLATED IN 2007-2009

Katedra i Zakład Mikrobiologii
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

STRESZCZENIE

Pałeczki rodzaju *Proteus* są oportunistycznymi patogenami człowieka, izolowanymi najczęściej z zakażeń dróg moczowych. Są naturalnie wrażliwe na większość stosowanych leków przeciwdrobnoustrojowych, jednak w wyniku horyzontalnego nabywania genów kodujących beta-laktamazy o rozszerzonym zakresie substratowym oraz nieracjonalnej antybiotykoterapii dochodzi do zwiększenia częstości występowania i selekcji wśród nich szczepów wielolekoopornych.

W pracy oceniono częstość występowania beta-laktamaz typu ESBL testem dwóch krążków oraz lekowrażliwość szczepów *P. mirabilis* metodą krążkowo-dyfuzyjną. Wykorzystano szczepy izolowane w latach 2007-2009 z materiału od chorych leczonych w Szpitalu Uniwersyteckim nr 1 im. dr. A. Jurasza w Bydgoszczy. Szczepy *P. mirabilis* wyosobniano najczęściej z moczu. Stwierdzono występowanie enzymów typu ESBL w latach 2007, 2008 i 2009, odpowiednio u: 10,4%, 18,7% i 14,4% szczepów. Szczepy *P. mirabilis* ESBL(+) były odporne na większość badanych leków przeciwbakteryjnych.

Słowa kluczowe: *Proteus mirabilis*, ESBL, lekooporność

ABSTRACT

Proteus sp. rods are opportunistic human pathogens, isolated mainly from urinary tract infections. They are naturally susceptible to most antimicrobials. However, acquisition of genes for extended spectrum beta-lactamases on plasmids and irrational antimicrobial treatment increase amount of multidrug resistant strains and lead to their selection.

The aim of this study was to evaluate production of ESBLs by double disc synergy test and antimicrobial susceptibility of *P. mirabilis* strains by disc diffusion method. Strains included into the study were isolated from patients of dr A. Jurasz University Hospital No 1 in Bydgoszcz between 2007 and 2009. *P. mirabilis* strains were isolated mainly from urine. In this study 10,4%, 18,7% and 14,4% ESBL(+) *P. mirabilis* strains were isolated in 2007, 2008, 2009, respectively. Resistance to majority of the investigated antimicrobials was observed in ESBL(+) *P. mirabilis* strains.

Key words: *Proteus mirabilis*, ESBL, multidrug resistance

WSTĘP

Pałeczki *Proteus* sp. są naturalnie wrażliwe na większość antybiotyków i chemioterapeutyków (1). Nieracjonalne ich stosowanie w praktyce klinicznej doprowadziło do wykształcenia i szerzenia się wśród tych bakterii mechanizmów oporności. Często jest nim wytwarzanie beta-laktamaz o rozszerzonym zakresie substratowym (*Extended Spectrum Beta-Lactamases*, ESBL) (1). Do ESBL należą enzymy typu: TEM, SHV,

CTX-M, VEB, PER, GES, CME, OXA, które są wytwarzane przez pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* (2). U pałeczek rodzaju *Proteus* zidentyfikowano beta-laktamazy typu ESBL, które należą przede wszystkim do klasy drugiej według klasyfikacji Bush i klasy A według Ambler (1, 3, 4). Są to głównie enzymy typu TEM, CTX-M oraz, rzadziej, typu VEB i PER (1).

Celem pracy była ocena częstości występowania beta-laktamaz typu ESBL i lekooporności wśród pałeczek *P. mirabilis*.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiło 729 szczepów *P. mirabilis* izolowanych z materiału od chorych leczonych w Szpitalu Uniwersyteckim nr 1 im. dr. A. Jurasza w Bydgoszczy w latach 2007-2009. Badane szczepy identyfikowano do gatunku na podstawie morfologii kolonii na podłożu MacConkey Agar (MCA, Becton Dickinson) oraz wyników reakcji biochemicznych ujętych w testach API 20 E (bioMérieux, ATB Expression V2.8.8, bioMérieux).

Z badań lekowrażliwości wykluczono kolejne izolaty pochodzące od tych samych chorych. Lekowrażliwość określano metodą krążkowo-dyfuzyjną według Kirby-Bauer, zachowując zalecenia Krajowego Ośrodka Referencyjnego do Spraw Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD) oraz warunki interpretacji podane przez Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) dla pałeczek rodziny *Enterobacteriaceae* (5, 6, 7). W celu oceny występowania u badanych szczepów mechanizmu oporności typu ESBL stosowano metodę dwóch krążków (Double Disc Synergy Test, DDST) (5). Kontrolę oznaczania lekowrażliwości wykonano stosując szczepy wzorcowe z kolekcji ATCC: *Pseudomonas aeruginosa* 27853 i *Escherichia coli* 25922.

Analizę statystyczną wykonano testem Fischera-Snedecora z użyciem programu Statistica 8. Za poziom istotności przyjęto $\alpha \leq 0,05$.

WYNIKI

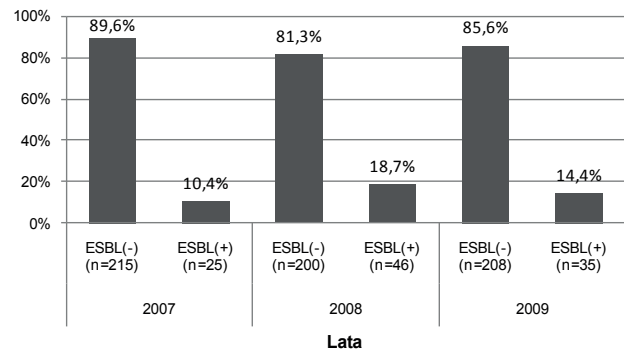
W latach 2007-2009 wyosobniono 1249 szczepów *Proteus* sp. z materiału pochodzącego od 863 chorych leczonych w Szpitalu Uniwersyteckim nr 1 im. dr. A. Jurasza w Bydgoszczy. Pałeczki *Proteus* sp. stanowią trzeci pod względem częstości izolacji (11,1%) rodzaj bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* wyosobniony z materiału klinicznego, po *Escherichia* sp. (53,8%) i *Klebsiella* sp. (12,5%). Najczęściej (84,5%) izolowanym gatunkiem wśród pałeczek rodzaju *Proteus* sp. jest *P. mirabilis*.

W tabeli I przedstawiono pochodzenie badanych szczepów. Odsetek szczepów *P. mirabilis*, u których stwierdzono obecność beta-laktamaz o rozszerzonym zakresie substratowym - ESBL(+) zawarto na rycinie 1, natomiast w tabeli II zestawiono występującą wśród szczepów ESBL(+) i ESBL(-) *P. mirabilis* lekooporność na badane leki przeciwdrobnoustrojowe. Analiza statystyczna wykazała istotną zależność ($p < 0,001$) pomiędzy wytwarzaniem ESBL przez pałeczki *P. mirabilis*, a opornością na badane antybiotyki/chemioterapeutyki.

Tabela I. Pochodzenie badanych w latach 2007-2009 szczepów *P. mirabilis* (n=729)

Table I. The origin of *P. mirabilis* (n=729) strains investigated in 2007-2009

Materiał kliniczny	2007	2008	2009	Ogółem
	n (%)			
Wysięk z ucha środkowego	7 (2,9)	9 (3,7)	11 (4,5)	27 (3,7)
Wydzielina dróg oddechowych	4 (1,7)	5 (2,0)	3 (1,2)	12 (1,6)
Popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelikowe	9 (3,8)	3 (1,2)	4 (1,6)	16 (2,2)
Krew	7 (2,9)	5 (2,0)	5 (2,1)	17 (2,3)
Mocz	86 (35,8)	96 (39,0)	81 (33,3)	263 (36,1)
Mocz z cewnika	31 (12,9)	34 (13,8)	34 (14,0)	99 (13,6)
Wymaz z owrzodzenia	12 (5,0)	9 (3,7)	8 (3,3)	29 (4,0)
Ropa	14 (5,8)	12 (4,9)	8 (3,3)	34 (4,7)
Wymaz z odleżyny	15 (6,3)	21 (8,5)	17 (7,0)	53 (7,3)
Wymaz z rany	33 (13,8)	41 (16,7)	44 (18,1)	118 (16,2)
Inne	22 (9,2)	11 (4,5)	28 (11,5)	61 (8,4)
Ogółem	240	246	243	729



Ryc. 1. Występowanie ESBL wśród badanych w latach 2007-2009 szczepów *P. mirabilis* (n=729)

Fig. 1. The incidence of ESBLs among *P. mirabilis* strains (n=729) investigated in 2007-2009

DYSKUSJA

Z piśmiennictwa wynika, że pałeczki *Proteus* sp. są najczęściej izolowane z materiału pobieranego w zakażeniach dróg moczowych (8). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają te doniesienia. Najwyższy odsetek (36,1%) szczepów *P. mirabilis* wyosobniono z moczu oddanego fizjologicznie oraz pobranego z użyciem cewnika do pęcherza moczowego (14,8%).

Oporność na beta-laktamy wynikająca z wytwarzania ESBL jest rozpowszechniona wśród pałeczek *Enterobacteriaceae*, w tym również wśród *Proteus* sp. (9, 10, 11). Dane na temat częstości występowania badanego mechanizmu oporności na beta-laktamy w piśmiennictwie są zróżnicowane. W prowadzonych w latach 1997-1998 badaniach odnotowano 5,3% szczepów *P. mirabilis* ESBL(+) (12). W 2008 roku wśród 66

Tabela II. Lekooporność badanych w latach 2007-2009 szczepów ESBL(-) i ESBL(+) *P. mirabilis*

Table II. Resistance to antimicrobials of ESBL(-) and ESBL(+) *P. mirabilis* strains investigated in 2007-2009

Antybiotyki/chemioterapeutyki	Lekooporne szczepy <i>P. mirabilis</i>					
	ESBL(-)			ESBL(+)		
	n	%	Ogółem ESBL(-)	n	%	Ogółem ESBL(+)
Ampicylina	242	44,2	547	105	100,0	105
Piperacylina	88	21,6	408	96	97,0	99
Amoksylicyna/kwas klawulanowy	37	6,4	576	72	67,9	106
Ampicylina/sulbaktam	54	14,6	369	54	77,1	70
Piperacylina/tazobaktam	4	0,9	423	40	38,8	103
Cefazolina	66	21,0	315	42	100,0	42
Cefprozil	65	15,4	421	84	100,0	84
Cefuroksym	51	8,7	585	105	99,1	106
Cefotetan	24	4,3	558	50	50,5	99
Cefotaksym	9	1,5	587	102	96,2	106
Ceftazydym	9	1,5	586	102	96,2	106
Cefoperazon	119	21,0	566	104	54,7	190
Cefepim	9	1,5	586	101	96,2	105
Cefoperazon/sulbaktam	4	1,6	248	3	7,3	41
Aztreonam	15	2,6	579	96	96,0	100
Imipenem	1	0,2	586	1	0,9	106
Ertapenem ¹	1	0,8	118	0	0,0	13
Meropenem ²	0	0,0	97	0	0,0	12
Doripenem ²	0	0,0	96	0	0,0	12
Gentamicyna	113	25,1	450	90	88,2	102
Tobramycyna	49	10,7	456	51	75,0	68
Amikacyna	21	3,8	548	58	58,0	100
Netilmycyna	53	10,1	523	71	78,0	91
Norfloksacyna	35	15,6	225	60	89,6	67
Ciprofloksacyna	61	14,7	414	79	84,9	93
Tetracyklina	415	90,8	457	70	100,0	70
Doksycyklina	248	92,9	267	33	100,0	33
Tigecyklina ¹	1	2,4	42	0	0,0	3
Chloramfenikol	107	42,1	254	31	79,5	39
Nitrofurantoina	248	88,0	282	59	98,4	60
Trimetoprim/sulfametoksazol	240	44,4	540	89	93,7	95

1 - oznaczano od 2008 roku

1 - investigated since 2008

2 - oznaczano od 2009 roku

2 - investigated since 2009

szczepów *P. mirabilis*, ESBL wykazano u 4,5% (13). Wśród 689 szczepów klinicznych *P. mirabilis* badanych przez Galas i wsp. (8), obecność ESBL stwierdzono u 1,3% szczepów. Muratani i wsp. (14) wykazali, że wśród 201 niepowtarzających się szczepów *P. mirabilis* izolowanych w Japonii w 2008 roku, 29,9% stanowiły szczepy ESBL(+). W badaniach własnych wykazano w 2007 roku 10,4%, w 2008 roku – 18,7%, a w 2009 roku – 14,4% szczepów *P. mirabilis* ESBL(+).

Badania własne potwierdzają wyniki uzyskane przez Nijssen i wsp. (12), w których wykazano, że spośród penicylin skojarzonych z inhibitorami beta-laktamaz najwyższy odsetek (98,3%) szczepów *P. mirabilis* jest wrażliwy na połączenie piperacyliny z tazobaktamem. Na uwagę zasługuje, wykazany w niniejszym opracowaniu, niski odsetek szczepów opornych na cefoperazon w skojarzeniu z sulbaktamem, zarówno wśród szczepów ESBL(-), jak i ESBL(+).

Wśród szczepów *P. mirabilis*, izolowanych w okresie objętym badaniem, oporność na karbapenemy stwierdzono u dwóch szczepów w 2007 roku i jednego w 2008 roku. Oporność na karbapenemy może być wynikiem wytwarzania przez szczepy rodzaju *Proteus* karbapenemazy typu OXA-23 (15). Otrzymane wyniki są zgodne z otrzymanymi przez innych badaczy (8, 12, 16). Wśród 1895 szczepów *P. mirabilis* badanych przez Mendes i wsp. (16) oporność na karbapenemy dotyczyła 1% szczepów. Autorzy wykazali jednocześnie, że oporność na karbapenemy występuje nieznacznie częściej wśród szczepów ESBL(+) niż ESBL(-) (16), czego nie stwierdzono w niniejszej pracy. Podobne wyniki otrzymali Nijssen i wsp. (12), którzy badali 5000 szczepów rodziny *Enterobacteriaceae* izolowanych z materiału pobranego od chorych leczonych w szpitalach krajów europejskich. Ponad 99% spośród badanych 400 szczepów *P. mirabilis* było wrażliwych na imipenem i meropenem.

W badaniach własnych stwierdzono wysoki odsetek (88,2%) szczepów *P. mirabilis* ESBL(+) opornych na gentamicynę, czego nie odnotowano u szczepów ESBL(-). Wysoki odsetek szczepów opornych na ten aminoglikozyd potwierdzają wyniki otrzymane przez Okesola i Mankanjuola (17), którzy stwierdzili 33,3% szczepów *Proteus* sp. wrażliwych na gentamicynę. Z badań Ruiz i wsp. (18) wynika, że trzy spośród 5 szczepów *P. mirabilis* były wrażliwe na ciprofloksacynę. Wśród badanych szczepów ESBL(-) wykazano statystycznie istotnie wyższy odsetek szczepów wrażliwych na ten chemioterapeutyk niż w grupie szczepów ESBL(+). Oporność na fluorochinolony wśród pałeczek *Proteus* sp. może wynikać z mutacji w genach kodujących topoizomerazę IV i aktywnego usuwania chemioterapeutyków za pośrednictwem pompy AcrAB (19). Występowanie mikrosomalnej pompy AcrAB jest odpowiedzialne również za zmniejszony poziom wrażliwości na tigecyklinę (20).

WNIOSKI

1. Oporność uwarunkowana wytwarzaniem ESBL występuje częściej u pałeczek *P. mirabilis* niż podaje większość autorów.
2. Odnotowano wzrost częstości szczepów ESBL(+) w latach 2008 i 2009 w porównaniu z rokiem 2007.
3. Występowaniu wśród pałeczek *P. mirabilis* beta-laktamaz o rozszerzonym zakresie substratowym towarzyszy oporność na większość badanych antybiotyków/chemioterapeutyków.
4. Niski odsetek szczepów ESBL(+) *P. mirabilis* opornych na karbapenemy, piperacylinę z tazobaktamem, cefoperazon z sulbaktamem oraz tigecyklinę wskazuje, że leki te mogą być stosowane w leczeniu zakażeń o tej etiologii.

Ze względu na stwierdzony w niniejszym opracowaniu retrospektywnym związek występowania ESBL z lekoopornością szczepów *P. mirabilis* konieczne jest stałe monitorowanie obecności enzymów tego typu wśród szczepów klinicznych i podejmowanie racjonalnej antybiotykoterapii opartej wyłącznie na wynikach oceny lekowrażliwości.

PIŚMIENNICTWO

1. Aragón LM, Mirelis B, Miró E, i in.: Increase in β -lactam-resistant *Proteus mirabilis* strains due to CTX-M- and CMY-type as well as new VEB and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:1029-32.
2. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933-5.
3. Bonnet R, Marchandin H, Chanal C, i in. Chromosome-encoded class D β -lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2004-6.
4. Nukaga M, Mayama K, Crichlow GV, i in. Structure of an extended-spectrum class A β -lactamase from *Proteus vulgaris* K1. *JMB* 2002;317:109-17.
5. Gniadkowski M, Żabicka D, Hryniewicz W. Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2009. Oznaczenie wrażliwości pałeczek Gram-ujemnych. KORLD 2009.
6. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard-tenth edition. CLSI M02-A10 2009;29.
7. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; nineteenth information supplement. CLSI M100-S19 2009;29.
8. Galas M, Decousser J-W, Breton N, i in. Nationwide study of the prevalence, characteristics and molecular epidemiology of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in France. *Antimicrobial Agents Chemother* 2008;52:786-9.
9. Kola A, Holst M, Chaberny IF, i in. Surveillance of extended-spectrum- β -lactamase-producing bacteria and routine use of contact isolation: experience from a three-year period. *J Hosp Infect* 2007;66:46-51.
10. Cantón R, Novais A, Valverde A, i in. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol. Infect* 2008;14:144-53.
11. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Eurosurveillance* 2008;13:1-11.
12. Nijssen S, Florijn A, Bonten MJM, i in. Beta-lactam susceptibilities and prevalence of ESBL-producing isolates among more than 5000 European *Enterobacteriaceae* isolates. *Int J Antimicrobial Agents* 2004;24:585-91.
13. Soo Ko K, Lee MY, Song J-H, i in. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated in Korean hospitals. *Diag Microbiol Infect Dis* 2008;6:453-9.
14. Muratani T, Kobayashi T, Doi K, i in. Prevalence of quinolone high-resistant and ESBL producing *Proteus mirabilis* in Japan. *Inter J Antimicrobial Agents* 2009;34:S46.
15. Luzzaro F, Perilli M, Amicosante G, i in. Properties of multidrug-resistant, ESBL-producing *Proteus mirabilis* isolates and possible role of β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations. *Int J Antimicrob Agents* 2001;17:131-5.
16. Mendes RE, Rhomberg PR, Bell JM, i in. Doripenem activity tested against a global collection of *Enterobacteriaceae*, including isolates resistant to other extended-spectrum agents. *Diag Microbiol Infect Dis* 2009;63:415-25.
17. Okesola AO, Makanjuola O. Resistance to third-generation cephalosporins and other antibiotics by *Enterobacteriaceae* in Western Nigeria. *Amer J Infect Dis* 2009;5:17-20.
18. Ruiz J, Gómez J, Navia MM, i in. High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae*. *Diag Microbiol Infect Dis* 2002;42:257-61.
19. Saito R, Sato K, Kumita W, i in. Role of type II topoisomerase mutations and AcrAB efflux pump in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Proteus mirabilis*. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:673-7.
20. Visalli MA, Murphy E, Projan SJ, i in. AcrAB multidrug efflux pump is associated with reduced levels of susceptibility to tigecycline (GAR-936) in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:665-9.

Otrzymano: 10.05.2010 r.

Zaakceptowano do druku: 8.06.2010 r.

Adres do korespondencji:

Mgr Joanna Kwiecińska-Piróg
Katedra i Zakład Mikrobiologii
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9
85-094 Bydgoszcz
tel. 52 585 40 47
e-mail: kizmikrob@cm.umk.pl
j.kwiecinska@cm.umk.pl