

Antimikrobiyal dirençli *Escherichia coli*'de geniş spektrumlu β -laktamaz direncinin araştırılması

● Murat Cengiz^{*1}, ● Ulvi İbrahimli¹

1 Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı,
Moleküler Farmakoloji Laboratuvarı, 16059, Bursa

Received 2019-12-17 Accepted 2020-04-09

Özet

Escherichia coli (E. coli) insan ve hayvanlarda birçok enfeksiyona neden olan önemli mikroorganizmalardan biridir. E. coli'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde β -laktamların sık kullanılması β -laktam direncinin gelişmesi bakımından önemli bir nedendir. β -laktamazlar, β -laktam direncinin bilinen mekanizmalarından biridir ve geniş spektrumlu β -laktamazlar (GSBL) yüksek morbidite ve mortaliteden sorumludur. Bu çalışmanın konuları, GSBL varlığının araştırılması ve GSBL ile diğer birçok antimikrobiyal bileşiğe karşı direnç ilişkisinin değerlendirilmesidir. β -laktam direncini belirlemek için disk difüzyon ile broth mikrodilüsyon testleri kullanıldı ve direncin genotiplendirmesi için blaSHV geninin varlığını araştırıldı. Buna göre 112 E. coli izolatının sadece bir tanesi GSBL pozitif olarak tanımlandı. Ayrıca, broth mikrodilüsyon test sonuçlarına göre 18 izolatın seftazidime ve 32 izolatın ise sefotaksime karşı dirençli olduğu belirlendi. E. coli izolatlarının hiçbirinde blaSHV geni tespit edilemedi. Sonuç olarak E. coli izolatlarının β -laktamlara karşı dirençli olabileceği, ancak GSBL pozitif izolatların ve GSBL ile diğer antimikrobiyal bileşiklere karşı direncin birlikte görülme sıklığının çok düşük olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: *Escherichia coli*, β -laktamaz, antimikrobiyal direnç

Abstract

Investigation of extended-spectrum β -lactamase resistance in antimicrobial resistant *Escherichia coli*

Escherichia coli (E. coli) is one of the most important microorganisms causing various infections in animals as well as in humans. The overuse of β -lactams for treatment of infectious diseases caused by E. coli is an important reason of emergence of β -lactam resistance. β -lactamases are well known mechanism of β -lactam resistance and extended spectrum β -lactamases (GSBL) are responsible for the high morbidity and mortality. The objectives of this study are to investigate of existence of GSBL in E. coli and to evaluate the correlation between GSBL and resistance to many other antimicrobials. Disc diffusion and broth microdilution test were used to determine β -lactam resistance and existence blaSHV gene was investigated for its genotyping. Based on the results of disc diffusion test, only one of 112 E. coli isolates was defined as GSBL positive. However, the results of broth microdilution test showed that the numbers of ceftazidime and cefotaxime resistance positive E. coli isolates were 18 and 32, respectively. blaSHV gene could not be detected in any of the E. coli isolates. The results of this study showed that E. coli isolates could be resistant against β -lactams, but the frequency of GSBL positive isolates and the co-existence of GSBL with resistance to other antimicrobials was very low.

Key words: *Escherichia coli*, β -lactamase, antimicrobial resistance

Giriş

İnsan ve hayvanlarda sıklıkla gastroenteritislere, idrar yolu

enfeksiyonlarına ve septisemilere neden olan Enterobacteriaceae ailesinin en önemli üyesi *Escherichia coli*'dir (E. coli). E. coli kökenli enfeksiyonların tedavisinde β -lak-

* Corresponding author: Murat Cengiz, cengizm@uludag.edu.tr, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Bursa.



tam grubu ilaçların sık kullanılması β -laktam direncinin gelişmesine ve yaygınlaşmasına neden olabilir. β -laktam direncinin primer etmeni β -laktamaz enzimleridir ve bu enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak üretilen yeni enzimler geniş spektrumlu β -laktamaz enzimleri (GSBL) olarak tanımlanır.¹⁻³ GSBL üreten bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda morbidite, mortalite ve tedavi maliyeti yüksektir.⁴

β -laktam grubu antimikrobialler, yapılarında bir β -laktam halkası taşıyan ve hücre duvarı sentezini engelleyerek antibakteriyel etki gösteren ajanlardır.⁵ Bakteriler (1) hücre duvarı geçirgenliğinin azaltılması, (2) atım pompası aktivasyonu, (3) penisilin bağlayıcı proteinlerdeki modifikasyonlar ve (4) β -laktamaz üretimine bağlı olarak β -laktamlara karşı direnç geliştirir.⁶ E. coli'de β -laktamaz direncinin en önemli genetik nedeni SHV-1 ve TEM-1 gibi plazmid aracılı dar spektrumlu enzimleri kodlayan genlerdir. SHV grubu enzimler, geniş spektrumlu penisilinlere karşı dirençten sorumludur ve 60'tan fazla varyantı tespit edilmiştir. β -laktamaz enzimlerini kodlayan genlerin plazmidlerin üzerinde yerleşik olması direncin yayılabilmesi için önemli bir etmendir.⁷ Yapılan epidemiyolojik araştırmaların sonuçlarına göre bir çok ülkede birbirinden farklı GSBL kodlayan gen ve mutantlarına rastlanmıştır. Türkiye GSBL varlığı bakımından önemli ülkelerden biridir.⁸ Genel olarak GSBL üreten mikroorganizmalar florokinolon ve aminoglikozid grupları ile sülfonamid-trimetoprim gibi kombinasyonlara karşı da dirençlidir.^{9,10} Bu nedenle, bu çalışmanın amacı antimikrobiyal dirençli E. coli'de GSBL'in karakterizasyonu ve GSBL ile diğer direnç tipleri arasındaki korelasyonun değerlendirilmesidir. Ayrıca, β -laktamaz enzimlerini kodlayan önemli genlerden biri olan SHV-1 geninin E. coli'deki varlığının moleküler yöntemle araştırılmasıdır.

Materyal ve Metot

Bu çalışma, sığır, keçi, koyun, köpek ve kedilerden izole edilerek oluşturulan koleksiyondan 112 adet E. coli izolatu seçilerek gerçekleştirildi.

Disk difüzyon testi

Disk difüzyon yöntemi Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'in önerdiği kriterlere göre yapıldı.¹¹ Mueller-Hinton Broth'da üretilen E. coli izolatlarının süspansiyonu 0.5 McFarland standardına göre hazırlandı. Standart süspansiyon Mueller-Hinton Agar'a (MHA) ekildi ve üzerlerine seftazidim (CAZ) (30 μ g), sefotaksim (CTX) (30 μ g), CAZ/klavulanik asit (CLA) (30/10 μ g) ve CTX/CLA (30/10 μ g) diskleri yerleştirildi. İnkübasyon sonrası oluşan zon çapları CLSI kriterlerine göre duyarlı (suscepti-

ble: S), orta duyarlı (intermediate: I) ve dirençli (resistant: R) olarak değerlendirildi. Kombinasyon zon çapları klavulanik asit içermeyen zon çaplarına göre 5 mm veya daha büyük olanlar GSBL pozitif olarak kabul edildi.

Broth mikrodilüsyon testi

Broth mikrodilüsyon testi CLSI'in önerdiği kriterlere göre yapıldı.¹¹ CAZ ve CTX stok solüsyonları analitik standart kullanılarak 10:90 metanol/fosfat tamponlu suda (Phosphate Buffered Saline: PBS) hazırlandı ve 0.20 μ m şırınga filtreden (Corning®) geçirilerek sterilize edildi. Steril stok solüsyon kullanılarak 0.016-512 μ g/ml'lik seri dilüsyonlar hazırlandı. Son konsantrasyonu 0.008-256 μ g/ml olacak şekilde her bir mikropilaya kuyucuğuna 50 μ l antimikrobiyal ilaç dilüsyonu ve 50 μ l standart bakteri süspansiyonu konuldu. İnkübasyon sonrası bakterilerin optik dansiteleri mikropilaya okuyucuda (BioRad iMark) 595 nm'de ölçüldü ve üremenin olmadığı en düşük ilaç konsantrasyonu minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak belirlendi.

DNA izolasyonu

Bakteri DNA'sı kaynatma yöntemine göre izole edildi. MHA'da üretilen bakteri kolonileri toplanarak 0.2 ml steril suda çözdürüldü. Elde edilen homojenat 99 °C'de 5 dk kaynatıldıktan sonra 1 dk buzda bekletildi. Santrifüj uygulandıktan (5 dk 13000 rpm) sonra üstte kalan bakteri DNA'sı moleküler testler için kullanılmak üzere -20 °C'de tutuldu.

blaSHV geninin PCR amplifikasyonu ve görüntülenmesi

blaSHV geni amplifikasyonu için 5'-GGTTATGCGT-TATATTCGCC-3' (forward) ve 5'-TTAGCGTTGCCAGT-GCTC-3' (reverse) primerleri kullanıldı. PCR karışımı, 1'er μ l primerler, 12.5 μ l 2xPCR Master Mix (OneTag), 2 μ l DNA ve 21 μ l moleküler su kullanılarak 50 μ l olacak şekilde hazırlandı. PCR işlemi sonrası elde edilen ürünler % 1'lik etidyum bromidli agaroz jelde yürütülerek jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

Sonuçlar

Disk difüzyon testi sonuçlarına göre E. coli izolatlarının sadece 1/112'si (E. coli E87) CAZ ve CTX'e karşı dirençli bulundu. E. coli E87 CAZ/CLA ve CTX/CLA'ya karşı da dirençli olduğundan GSBL pozitif olarak tanımlandı.

Broth mikrodilüsyon test sonuçlarına göre CAZ ve CTX için en düşük MİK sırasıyla 0.016 μ g/ml ve 0.064 μ g/ml olarak tespit edildi. Hem CAZ hem de CTX için en yüksek MİK 256 μ g/ml olarak belirlendi. MİK dağılımlarına göre en yüksek frekans 29 izolatta CAZ için ve 35 izolatta CTX

için 2 µg/ml olarak bulundu. Klinik duyarlılık eşik değerlerine göre E. coli izolatlarının 18'i CAZ'a ve 32'si ise CTX'e karşı dirençli olarak nitelendirildi.

E. coli'de GSBL direncinden sorumlu genlerden biri olan blaSHV geni moleküler yöntemlerle araştırıldı ve bu gen hiç bir izolatta tespit edilemedi.

Tartışma ve Sonuç

β-laktamaz direnci enfeksiyonların tedavisinde seçeneklerin azalmasına ve ekonomik kayıplara neden olabilir. Direnç zaman ve bölgesel farklılıklar gösterdiği için değişkenlikler düzenli olarak izlenmelidir.^{12,13} Örneğin Türkiye'de GSBL pozitif izolat sayısı 2004-2007 yıllarında her yıl düzenli olarak izlenmiş ve pozitif izolat sayılarının oranları %3.8'den %17.2'ye yükselmiştir.¹⁴ Yine poliklinik ve yatan hastalardan 2013-2015 yılları arasında izole edilen E. coli suşlarının yaklaşık %39'u GSBL pozitif bulunmuştur.¹⁵ Bu çalışmanın sonuçlarına göre CAZ ve CTX'e karşı dirençli izolatların oranı sırasıyla %16.1 ve %28.6 olarak bulunmuştur. CAZ ve CTX dirençli izolatların oranları daha önce Türkiye'de yapılan diğer araştırmaların sonuçlarına göre daha düşüktür. Önceki araştırmalarda her iki antimikrobiyale karşı %32-37 oranında direnç tespit edilmiştir.^{16,17} GSBL varlığının araştırılması için kullanılan testler ve elde edilen sonuçlar arasında tutarsızlıklar gözlenebilir. Genotipik olarak GSBL pozitif bulunan izolatlar duyarlılık testlerine göre negatif olarak nitelenebilir.¹⁸ Örneğin AmpC pozitif olup duyarlılık testi sonuçlarına göre GSBL negatif olarak tanımlanmıştır.¹⁹ Dolayısıyla tek başına CAZ ve CTX'e karşı dirençli olan E. coli izolat oranı yüksek olmasına rağmen izolatların negatif GSBL fenotipi göstermesi GSBL direncinden sorumlu olan diğer genlerin araştırılması gerektiğini göstermektedir.

GSBL direncin sorumlu olan genler plazmid ve transpozonlar üzerinde konumlanmıştır. Bu nedenle mobil karakterdeki bu genetik fragmanlar bakteriler arasında GSBL direncin aktarımını kolaylaştırır. Eş zamanlı GSBL ve diğer bileşiklere karşı dirençli izolatların oranı %50'lere ulaşabilir.⁹ Şahintürk ve ark.²⁰ yapılan araştırmada kullanılan ve çoklu ilaç direnç (Multidrug Resistance: MDR) fenotipi gösteren E. coli izolatları ile aynı klonlarda yer alan ve bu araştırmada kullanılan E. coli izolatlarında GSBL varlığının çok düşük olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre MDR fenotipi gösteren E. coli izolatlarında GSBL direnç fenotipinin bulunma olasılığı çok düşüktür. Dolayısıyla MDR fenotipi, GSBL fenotipi ile her zaman ilişkili olmayabilir.

Sonuç olarak hayvanlardan izole edilen E. coli izolatlarında β-laktam grubu bileşiklere karşı direnç gözlenirse de GSBL

pozitif izolat sayısı çok düşük olabilir. Bu araştırmanın sonuçlarına göre MDR pozitif izolatların GSBL fenotipine sahip olma olasılığı her zaman yüksek olmayabilir.

Teşekkür

Bu araştırma Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu (KUAP(V)-2015/10) tarafından finanse edilmiştir.

Kaynaklar

- 1) Livermore DM. Beta-lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. Clin Microbiol Rev. 1995;8: 557-584.
- 2) Lee K, Lee WG, Uh Y. VIM- ve IMP- type metallo-beta-lactamase producing Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. in Korean Hospitals. Emerg Infect Dis. 2003;9: 868-71.
- 3) Su Y, Yu CY, Tsai Y, Wang SH, Lee CH, Chu C. Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli from the milk of cows with clinical mastitis in Southern Taiwan. J Microbiol Immunol Infect. 2016; 49(6): 892-901.
- 4) Akova M. Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D. Genişletilmiş spektrumlu Beta-laktamazlar ve klinik önemi. Önemli ve sorunlu gram-negatif bakteri enfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004; 85-95.
- 5) Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54: 969-76.
- 6) Kizirgil A, Yakupoğulları Y, Keçebaş AA, Seyrek A, Aşçı Toraman Z. GSBL üreten bakterilere karşı beta-laktamaz inhibitörü içeren kombinasyonların etkinliği. 11. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi (30 Mart-3 Nisan 2003 İstanbul), Program ve Özet Kitabı'nda. İstanbul: Klimik Derneği, 2004:35.
- 7) Heritage J, Zali FH, Gascoyne-Birizi D, Hawkoy PM. Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria, J Antimicrob. Chemother. 1999;44: 309-18.
- 8) Aydemir Ö, Terzi HA, Özözen EŞ, Köroğlu M, Altındış M. Genişlemiş spektrumlu Beta-laktamaz üreten Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae suşlarında piperasilin/tazobaktam invitro etkinliği. Turkish J

Healt Sci. 2019;4(2): 118-127

isolates. J Clin Microbiol. 2009;47: 358-361.

- 9) Kuzucu Ç, Yetkin F, Görgeç S, Ersoy Y. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella Spp.* suşlarının ertapenem ve diğer karbapenemlere karşı duyarlılıklarının araştırılması”, 3. Türkiye EKMUD Kongresi. 2010.
- 10) Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -Lactamase-producing pathogens. Clin Microbiol Rev. 2020;26: 33(2).
- 11) CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Ninth Edition. Approved Standard M7-A9 2012.
- 12) Szmolka A, Nagy B. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. Front Microbiol. 2013;4: 258.
- 13) Marques C, Gama LT, Belas A, et al. European multicenter study on antimicrobial resistance in bacteria isolated from companion animal urinary tract infections. BMC Vet Res. 2016;12 (1): 213.
- 14) Akyar I, Kocagöz S, Kocagöz T, ve ark. Beş yılda izole edilen 15434 *Escherichia coli* ve 3178 *Klebsiella spp.* suşunda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin yıllara, kliniklere ve örnek türlerine dağılımı. ANKEM Derg, 2010;24: 34-41.
- 15) Şen P, Yula E, Demirkal T, Kaya S, Nemli SA, Demirci M. Solunum yollarından izole edilen genişlemiş spektrumlu ve indüklenebilir beta-laktamaz üreten bakterilerin direnç oranları. Ortadoğu Tıp Derg. 2017;170: 170-176.
- 16) Aydemir H, Yalçın A, Pişkin N, Gürbüz Y, Türkyılmaz R. *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretme ve antibiyotik direnç oranları. Klimik Derg, 2006;19: 63- 8.
- 17) Duman Y, Güçlüer N, Serinda AM, Tekerekoğlu MS. *Escherichia coli* suşlarında antimikrobiyal duyarlılık ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) varlığı. Fırat Tıp Dergisi 2010;15: 197-200.
- 18) Robberts FJL, Kohner PC, Patel R. Unreliable extended-spectrum β -lactamase detection in the presence of plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli* clinical isolates. J Clin Microbiol. 2009;47: 358-361.
- 19) Coşkun S, Altanlar N. Sefoksitine dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatlarında plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz tespiti. Mikrobiyoloji Bülteni. 2012;46: 375-385.
- 20) Şahintürk P, Arslan E, Büyükcangaz E, et al. High level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from animals in Turkey is due to multiple mechanisms. Turk J Vet Anim Sci. 2016;40: 214–218.