

CTX-M-3 Tipi Beta-Laktamaz Üreten C3 Grubu *Salmonella* Suşu

C3 Group *Salmonella* Strain Producing CTX-M-3 Type Beta-Lactamase: Case Report

Hasan NAZİK,^a
İlgin KAYA,^a
Mehmet İLKTAÇ,^a
Betigül ÖNGEN^a

^aMikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul

Geliş Tarihi/Received: 15.06.2011
Kabul Tarihi/Accepted: 01.03.2012

Bu çalışma 23. ANKEM Antibiyotik ve
Kemoterapi Kongresi (28 Mayıs-1 Haziran
2008, İzmir)'nde sunulmuştur. Poster No: 51

Yazışma Adresi/Correspondence:

Hasan NAZİK
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,
İstanbul,
TÜRKİYE/TURKEY
hasannazik01@gmail.com

ÖZET *Salmonella* enfeksiyonları dünya genelinde önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. Enfeksiyöz ishaller özellikle gelişmekte olan ülkelerde beş yaşın altındaki çocuklarda yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Bu çalışmada kanlı ishale gelen bir hastanın dışkı örneğinden izole edilen ve CTX-M-3 tipi beta-laktamaz üreten C3 grubu *Salmonella* suşu araştırılmıştır. Suşun antibiyotik duyarlılık testi disk difüzyon yöntemi ile yapılmış, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimi çift disk sinerji testi ile saptanmıştır. CTX-M tipi beta-laktamazın varlığı spesifik primerler kullanılarak araştırılmıştır. CTX-3 pozitif olarak belirlenen suş ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, sefotaksim, seftriakson, sefepim ve ko-trimoksazole dirençli, imipenem, meropenem, kloramfenikol ve siprofloksasine duyarlı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: İlaç direnci, bakteriyel; beta-laktamaz CTX-M-3

ABSTRACT *Salmonella* infections constitute a significant public health problem worldwide. Infectious diarrheas cause high morbidity and mortality in children under 5 years of age especially in the developing countries. In this study, a C3 group *Salmonella* strain producing CTX-M-3 type beta-lactamase isolated from the stool sample of a patient presented with hemorrhagic diarrhea was investigated. Antibiotic susceptibility test was performed using disc diffusion method and extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production was determined using a double-disc synergy test. The presence of CTX-M type beta-lactamase gene was investigated through amplification using specific primers. The CTX-M-3 type beta-lactamase-positive strain was resistant to ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefotaxime, ceftriaxone, cefepime, co-trimoxazole, and susceptible to imipenem, meropenem, chloramphenicol and ciprofloxacin.

Key Words: Drug resistance, bacterial; beta-lactamase CTX-M-3

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2013;33(2):560-3

Salmonella enfeksiyonları tüm dünyada salgınlara neden olabilmektedir. Enfeksiyöz ishaller özellikle gelişmekte olan ülkelerde beş yaşın altındaki çocuklarda yüksek morbidite ve mortaliteyle seyretmektedir. İki yaşın altında olanlarda bu oranın beş kat daha fazla olduğu bildirilmektedir. Ülkemizde de % 2-11 izolasyon oranı ile önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır.¹ Bilindiği gibi *Salmonella* enfeksiyonlarının tedavisinde önceki yıllarda ampisilin, ko-trimoksazol ve kloramfenikol sıklıkla kullanılmıştır. Ancak son yıllarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreterek çoklu antibiyotik direnci gösteren *Salmonella* suşları da bildirilmekte, özellikle sık kullanılan antibiyotiklere karşı gelişen direnç nedeni ile tedavide güçlükler yaşanabilmektedir.²

doi: 10.5336/medsci.2011-25296

Copyright © 2013 by Türkiye Klinikleri

Çalışmamızda kanlı ishalle gelen bir hastanın dışkı örneğinden izole edilen, CTX-M-3 tipi beta-laktamaz üreten *Salmonella* suşu bildirilmiştir. Ülkemizde daha önce yapılmış çalışmalarda bazı *Salmonella* serovarlarının CTX-M-3 tipi beta-laktamaz ürettiği gösterilmiş olmakla birlikte, C3 grubu, *Salmonella* suşunda ilk kez bildirilmiştir.

OLGU SUNUMU

Suşun izolasyonu: On dört aylık hasta 23 Mart 2008 tarihinde kanlı ishalle İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları Acil Polikliniğine başvurmuştur. Hastanın genel fizik muayene ve laboratuvar incelemelerinde patolojik bulgulara rastlanmamış ve altta yatan bir hastalığı saptanmamıştır. Dışkı örneği metilen mavisi boyaması ile incelenen ve polimorf nüveli lökosit görülen hastaya 15 mg/kg/gün metronidazol başlanmıştır, tedaviye bir hafta devam edilmek üzere taburcu edilmiştir. Antibiyotik tedavisi öncesi alınan dışkı örneğinin 23-28 Mart 2008 tarihlerinde laboratuvarımızda kültürü yapılmış, C3 grubu *Salmonella* ve *Campylobacter jejuni* izole edilmiştir.

Suşun identifikasyonu: Dışkı örneği selenit F, Gram negatif buyyonu, kanlı agar, McConkey agar, Hektoen enterik agar ve *Campylobacter* selektif (Butzler) besiyerlerine ekilmiş, uygun ortam koşullarında 35-37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ekilen besiyerlerinde üreyen ve biyokimyasal olarak *Salmonella* cinsinin özelliklerini gösteren bakterinin spesifik polivalan ve monovalan bağışık serumlar (BioRad) kullanılarak lam aglutinasyonu ile serogrupu O: 8 (C3) olarak belirlenmiştir.

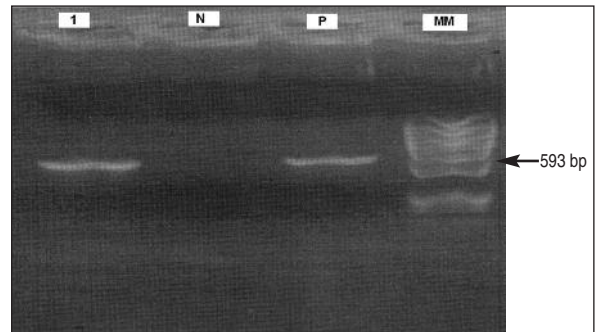
Antibiyotik duyarlılık testi: İzole edilen *Salmonella* suşunun üçüncü ve dördüncü kuşak sefoposporinlere dirençli olduğu görülmüş; bunun üzerine suş, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimi açısından incelemeye alınmıştır. Suşun ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, sefuroksim, seftriakson, sefepim, ko-trimoksazol, imipenem, meropenem, kloramfenikol ve siprofloksasin için antibiyotik duyarlılığı Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)'nin önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi kullanılarak araştırılmış, fenotipik olarak GSBL üretimi çift disk sinerji testi ile araştırılmıştır.³

Genomik DNA'nın ekstraksiyonu: Bakteri kolonisi 1,5 mL santrifüj tüplerinde süspansiyon edilirdikten sonra, 12 000 g'de çevrilerek bakteri peleti elde edilmiştir. Pelet 750 mL TE tamponu (10 mM Tris HCl, pH 8, 0,1 mM EDTA) ile yıkanmış, ardından 500 ml TE tamponu içinde 20 dakika kaynatılmış, sonrasında santrifüj edilmiş ve üst kısımda kalan sıvı DNA amplifikasyonunda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

DNA amplifikasyonu: TEM (5'-ATA-AAATTCTTGAAGACGAA-3', 5'-ATATGAG-TAAGCTTGGTCTGACAG-3'), SHV (5'-CCTC-ACTCAAGGATGTATTGTG-3', 5'-TTAGCGTT-GCCAGTGYTCG-3') ve CTX-M (5'-ATGTGCAG-YACCAGTAARGT-3', 5'-TGGGTRAARTARG-TSACCAGA-3') tipi beta-laktamazlara ait genlerin varlığı, bu bölgelere özgül primerler kullanılarak araştırılmıştır. Amplifikasyon programı, 1 döngü 95°C ve 10 dakikalık denatürasyonunun ardından 35 döngü 95°C'de 1 dakika denatürasyonu, 55°C'de 1 dakika primer bağlanması, 72°C'de 1 dakika primer uzaması, son olarak da 1 döngü 72°C'de 10 dakika primer uzaması olarak planlanmıştır.⁴

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ürününün görüntülenmesi: 10 mL amplifikasyon ürünü yaklaşık 2 mL yükleme tamponu ile karıştırılmış, 1xTAE tamponu içinde etidyum bromür ile boyanmış %1,5'lik agaroz jelde, 90 V'da 45 dakika yürütülmüştür. Elektroforez işlemi sonrasında jel, transilluminatör üzerine alınarak UV ışığı (304 nm) altında görüntülenmiştir (Resim 1).

Sekanslama: Elde edilen amplifikasyon ürünü sekanslanmıştır (İontek, ABI PRISM 310 Genetik



RESİM 1: CTX-M gen bölgesi için yapılan polimeraz zincir reaksiyonunun jel elektroforez görüntüsü.

1: İzole edilen suş, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol, MM: Moleküler marker (Φ174).

Analizör), gen dizisi internet üzerinde bulunan yazılım (www.ncbi.nlm.nih.gov) aracılığı ile incelenmiştir.

TARTIŞMA

Ülkemizde sık izole edilen *Salmonella* serovarları *S. serovar Enteritidis*, *S. serovar Typhimurium*, *S. serovar Paratyphi B*, *S. serovar Typhi* olarak bilinmektedir. Bugüne kadar yapılmış ve genellikle C1 ve C2 gruplarının ön plana çıktığı çalışmalarda, C grubu *Salmonella* izolasyon oranının %1-8,5 arasında değiştiği görülmektedir. C3 grubu *Salmonella*'lar ise daha nadir olarak bildirilmektedir. Dünyada C grubu *Salmonella*'lar arasında en sık *S. serovar Choleraesuis* izole edilmekte, bu *Salmonella* serovarı ölüme kadar gidebilen ciddi komplikasyonlara neden olabilmektedir.⁵⁻⁷ 1997-2002, 2003-2005, 2006-2007 yılları arasında hastanemizde yapılmış üç ayrı çalışmada C grubu *Salmonella* sırasıyla %6,6 (n: 45), %8 (n: 88) ve %11 (n: 65) oranlarında izole edilmiş, yıllar içinde izolasyon oranının arttığı görülmüştür.^{8,9}

CTX-M tipi beta-laktamazlar Bush-Jacoby-Medeiros fonksiyonel sınıflamasının 2be grubunda yer almaktadır. Bu tip beta-laktamazlar, sefotaksim seftazidime göre daha iyi hidrolize edebilen, bu nedenle "sefotaksimaz" olarak da isimlendirilen enzimlerdir. İlk olarak 1989 yılında Almanya'da bir *Escherichia coli* suşunda bildirilmiştir. Ayrıca 1990 yılında benzer özellikleri gösteren bir enzim Fransa'da *E. coli* ve Arjantin'de *Salmonella* Typhimurium suşunda saptanmıştır.¹⁰ Günümüzde CTX-M tipi GSBL'lerin sayısı olarak 60'ın üzerine çıktığı bilinmektedir.^{11,12} Son yıllarda yapılan araştırmalara bakıldığında dünyanın farklı bölgelerinde izole edilen *Salmonella* cinsi bakterilerde farklı tipte ve değişen oranlarda GSBL'lerin identifiye edildiği görülmektedir (Avrupa: CTX-M-3, CTX-M-5, CTX-M-9, SHV-5, SHV-12; Kuzey Amerika: SHV-2a; Afrika: TEM-3, TEM-63, TEM-131; Asya-Pasifik ülkeleri: SHV-9, TEM-52).¹³

Salmonella suşlarındaki GSBL oranının ülkemizde %1 civarında olduğu ve en sık *S. serovar Typhimurium*'da rastlandığı bildirilmektedir.⁷ Önceki yıllarda yapılmış bazı çalışmalarda *Salmonella*

cinsi bakterilerde TEM, PER-1, SHV-2, SHV-2a, SHV-9 ve SHV-12 tipi GSBL'lerin varlığı gösterilmiştir.^{5,14-16} Bahar ve ark. CTX-M-3 beta-laktamazını 2002 yılında izole edilen çoklu dirençli bir *S. serovar Virchow* suşunda ilk kez saptamışlardır.¹⁵ Avşaroğlu ve ark. kinolon ve ampisilin direnç mekanizmalarını araştırdıkları besin kaynaklı dokuz *S. serovar Virchow* suşunun dördünün CTX-M-3 tipi beta-laktamaz ürettiğini belirlemişlerdir.¹⁴ Yine çok yakın zamanda (Ocak 2008) hastanemizde yatan, büllöz pemfigoid tanısı ile takip edilen 75 yaşındaki immünyüprese bir kadın hastanın idrar örneğinden izole edilen ve CTX-M-1 grubu beta-laktamaz üreten *S. Virchow* suşu bildirilmiştir.¹⁷ Çalışmamızda ise kanlı ishale gelen bir hastanın dışkı örneğinden C3 grubu *Salmonella* suşu izole edilmiştir. *Salmonella* suşunun özellikle üçüncü kuşak sefolosporinlere dirençli olması GSBL üretimini düşündürmüş, çift-disk sinerji testi ile GSBL varlığı fenotipik olarak gösterilmiştir. PCR yöntemiyle hangi tip GSBL olduğu araştırılmış, suşun gen dizi analizi sonucu CTX-M-3 tipi beta-laktamaz oluşturduğu belirlenmiştir. Araştırabildiğimiz kadarıyla CTX-M-3 tipi beta-laktamaz üreten C3 grubu *Salmonella* suşu ülkemizden ilk kez bildirilmiştir.

1980'lerde tifo-dışı *Salmonella* suşları antibiyotiklere oldukça duyarlı mikroorganizmalar olmasına rağmen, son yıllarda ampisilin, kloramfenikol ve ko-trimoksazol gibi geçmişte daha sık kullanılan antibiyotiklere artan oranda direnç geliştiği görülmektedir.² Ülkemizde *Salmonella* cinsi bakterilerde ampisiline %14-53, ko-trimoksazole %3-31,3, sefotaksime %0-4 ve nalidiksik asite %0-16 oranında direnç bildirilmektedir.^{5,7-9} *Salmonella* suşlarının sık rastlanmayan gruplarının antibiyotik duyarlılıkları ile ilgili yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bununla birlikte C grubu *Salmonella* suşlarının antibiyotik direnç profillerini irdeleyen çalışmalarda, klinikte sıklıkla kullanılan antibiyotiklere karşı oldukça yüksek ve çoklu antibiyotik direnç oranları dikkat çekmektedir. Dolayısıyla bu gruplara ait antibiyotik direnç oranlarının saptanması özellikle ciddi infeksiyonların tedavisinde hayat kurtarıcı olabilmektedir. Erdem ve ark.nın yaptıkları bir çalışmada, 53 C grubu *Salmonella* suşu incelenmiş, grup C1 ve C2 olmak üzere bu suşların sırasıyla am-

pisiline %26 ve %60, amoksisilin-klavulanik asite %11 ve %40, kloramfenikole %16 ve %27, tetrasikline %3 ve %40 oranında dirençli, siprofloksasine %61 ve %20 oranında azalmış duyarlılık gösterdikleri belirlenmiştir.⁶ Çoklu antibiyotik direnci grup C1 izolatlarında gözlenmezken, grup C2 izolatlarında %13 oranında saptanmıştır. Çalışmamızda incelenen C3 grubu *Salmonella* suşunun ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, sefuroksim, seftriakson, sefepim ve ko-trimoksazole dirençli; imipenem, meropenem, kloramfenikol ve siprofloksasine ise duyarlı olduğu saptanmıştır.

Enfeksiyöz ishallerin önemli bir kısmı antimikrobiyal tedaviye gerek kalmadan iyileşebilmekle birlikte dizanterik formdaki ishallerde, immün sistem baskılanması ya da altta yatan bir

hastalığın bulunduğu durumlarda antibiyotik tedavisi gerekebilmektedir. Günümüze *Salmonella* infeksiyonlarının ampirik tedavisinde seftriakson kullanılabilirken, son yıllarda plazmid kaynaklı GSBL üreten *Salmonella* suşlarının bildirilmesi, ileriki yıllarda karbapenem dışındaki beta-laktam antibiyotiklerin kullanımının sınırlanacağını göstermektedir. Ayrıca taşınan bu plazmidler üzerinde birçok antibiyotik direnç geninin birlikte taşınması, siprofloksasin gibi farklı gruptan antibiyotikleri de etkileyebilmekte, çoklu antibiyotik direncinin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir.^{18,19} Bu sebeple ülkemizde de bakteriyel barsak patojenleri içinde önemli bir yeri olan *Salmonella* suşlarının GSBL üretimi ve antibiyotik duyarlılıklarının takip edilmesi önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Öngen B. [Causative agent of diarrhea in Turkey]. ANKEM Derg 2006;20(Ek 2):122-34.
- Hohmann EL. Nontyphoidal salmonellosis. Clin Infect Dis 2001;32(2):263-9.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteen Informational Supplement. CLSI document M100-S15. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute WVR. 2005. p.1-172.
- Nazik H, İliktaç M, Öngen B. Prevalence of qnrA, qnrB, qnrS and aac(6)-Ib-cr (in qnr-positive isolates) among the ESBL-positive and/or ciprofloxacin-resistant isolates in Turkey. J Chemother 2009;21(2):219-21.
- Budak F, Gür D, Dündar V, Gülay Z. [The prevalence of antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamase in *Salmonella* isolates]. İnfeksiyon Derg 2003;17(2):189-95.
- Erdem B, Ercis S, Hascelik G, Gur D, Aysev AD. Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* group C strains isolated from humans in Turkey, 2000-2002. Int J Antimicrob Agents 2005;26(1):33-7.
- Gülay Z. [Antibiotic resistance in gram negative bacilli in Turkey: 2003-2004 profile]. ANKEM Derg 2005;19(Ek 2):66-77.
- Kaya I, İliktaç M, Öngen B. [Salmonella and Shigella strains isolated from stool samples in 2006-2007 and their antibiotic susceptibilities (Summary)]. ANKEM Derg 2008;22(Ek 1):38.
- Öngen B, Nazik H, Kaya I, Özkan E. [Salmonella and Shigella strains isolated from stool samples in 2003-2005: and their antibiotic susceptibilities: 3-year evaluation of the results (Summary)]. ANKEM Derg 2006;20(Ek 1):15.
- Walther-Rasmussen J, Høiby N. Cefotaximes (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum beta-lactamases. Can J Microbiol 2004;50(3):137-65.
- Gonullu N, Aktas Z, Kayacan CB, Salcioglu M, Carattoli A, Yong DE, et al. Dissemination of CTX-M-15 beta-lactamase genes carried on Inc FI and FII plasmids among clinical isolates of *Escherichia coli* in a university hospital in Istanbul, Turkey. J Clin Microbiol 2008;46(3):1110-2.
- Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. The continuing challenge of ESBLs. Curr Opin Pharmacol 2007;7(5):459-69.
- Biedenbach DJ, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). Diagn Microbiol Infect Dis 2006;54(1):13-21.
- Avsaroglu MD, Helmuth R, Junker E, Hertwig S, Schroeter A, Akcelik M, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance conferred by qnrS1 in *Salmonella enterica* serovar Virchow isolated from Turkish food of avian origin. J Antimicrob Chemother 2007;60(5):1146-50.
- Bahar G, Mert A, Catania MR, Koncan R, Benvenuti C, Mazzariol A. A strain of *Salmonella enterica* serovar Virchow isolated in Turkey and carrying a CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase. J Chemother 2006;18(3):307-10.
- Vahaboglu H, Dodanlı S, Eroglu C, Ozturk R, Soyletir G, Yildirim I, et al. Characterization of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* stains: molecular epidemiology of PER-1-producing isolates and evidence for nosocomial plasmid exchange by a clone. J Clin Microbiol 1996;34(12):2942-6.
- Aktaş Z, Öztürk S, Kaya I, Ekinci AP, Öngen B, Kayacan ÇB, et al. [CTX-M type beta lactamase producing *Salmonella* Virchow stain isolated from urine sample (Summary)]. P25. 8. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Özet Kitabı. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No: 57; 2008. p.241.
- Levinson W. [Gram negative rods related with digestive system]. Özgüven T, çeviri editörü. Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji. 9. Baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2008. p.133-51.
- Velge P, Cloeckert A, Barrow P. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella enterica* serotype enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. Vet Res 2005;36(3):267-88.