

“Extended spectrum beta- lactamases” in batteri Gram-negativi di isolamento ospedaliero

C. Appiani, G. De Rose, M. Gelmi, G. Ravizzola, A. Turano

Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Brescia

Riassunto: In questo studio è stata valutata l'attività di alcune beta-lattamine e l'incidenza di extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) in *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* isolate da diversi materiali patologici. Si è osservata una percentuale di positività del 6,3% di ceppi produttori di ESBLs per la *Klebsiella pneumoniae*, mentre per le altre *Enterobacteriaceae* tale percentuale è risultata di circa 0,5-1%. Nel caso di *Pseudomonas aeruginosa*, non si è dimostrata alcuna correlazione tra percentuale di resistenza ai beta-lattamici e produzione di ESBLs. Probabilmente in questi microrganismi altri fattori sono responsabili della resistenza alle beta-lattamine.

Abstract: In the study we tested the activity of some beta-lactam antibiotics and the incidence of extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* isolated from different pathological materials. The rate of bacterial strains, ESBLs producing was 6.3% for *Klebsiella pneumoniae* and 0.5-1% for other *Enterobacteriaceae*. *Pseudomonas aeruginosa* hasn't shown correlation between the rate of resistance to beta-lactam antibiotics and production of ESBLs. Probably in this microorganism other mechanisms are involved in the resistance to beta-lactams.

Introduzione

Uno dei principali meccanismi che determina la resistenza microbica alle cefalosporine è rappresentato dalla produzione di enzimi detti beta-lattamasi in grado di idrolizzare l'anello beta-lattamico. Nell'ambito delle *Enterobacteriaceae* le più comuni beta-lattamasi appartengono al tipo TEM-1, TEM-2, e SHV-1, ed esplicano la loro attività nei confronti di cefalosporine di prima generazione, mentre non sono in grado di idrolizzare le metossimine come cefotaxime e ceftazidime, i monobattamici ed i carbapenemi (15).

A partire dal 1983 sono stati isolati mutanti con plasmidi in cui era codificata la resistenza non solo a cefalosporine di prima generazione, ma anche a cefalosporine di terza generazione (10). Questo tipo di resistenza, dovuta ad enzimi detti extended spectrum beta-lactamases (ESBLs), riscontrata dapprima in Germania (3) ed in Francia (16), e successiva-

mente in altre parti del mondo (7), si sta ora rapidamente diffondendo grazie all'incremento nel numero delle varietà di ESBLs e dei meccanismi che ne regolano la produzione e la diffusione (8, 9). ESBLs sono correlate con TEM-1, TEM-2 ed SHV-1, tuttavia differiscono da queste per delle modificazioni da 1 a 4 aminoacidi localizzati in posizioni diverse come 104, 162, 164, 205, 236, 237, 238, 240, ecc., in base alla classificazione di Ambler (1), che alterano la specificità del substrato (4, 12). Studi sulle extended spectrum beta-lactamases condotti in diverse parti del mondo indicano che gli enzimi derivanti dal tipo TEM sono più di venti, mentre quelli derivanti da SHV sono sei (14, 17). ESBLs derivanti da enzimi del tipo TEM o SHV sono caratterizzati da un diverso grado di resistenza a cefotaxime, ceftazidime e aztreonam (12, 17). In genere gli enzimi di tipo TEM non determinano per cefotaxime elevati valori di CMI, ad eccezione per gli enzimi CTX-1/TEM-3 e TEM-4. Ceftazidime presenta

rispetto a cefotaxime ed aztreonam valori di CMI più elevati. TEM-22 conferisce invece elevati valori di CMI per aztreonam (128 mg/L) e valori più bassi per il ceftazidime (4 mg/L). Gli enzimi del tipo SHV (n. 2, 3, 4, 5) determinano una CMI \geq 32 mg/L per cefotaxime, ceftazidime ed aztreonam, mentre non esercitano una significativa attività idrolitica nei confronti di cefamicine e carbapenemi (8, 12). Sia gli enzimi derivanti dal tipo SHV che quelli derivanti dal tipo TEM sono sensibili all'azione degli inibitori di beta-lattamasi come acido clavulanico, sulbactam e tazobactam (2). Tra questi l'acido clavulanico è il più efficace mentre il sulbactam risulta essere dotato di minor efficacia, specialmente nel caso di microrganismi produttori di enzimi derivanti dal tipo SHV (2, 3). *Klebsiella pneumoniae* rappresenta il microrganismo ove ESBLs sono riscontrate con maggior frequenza (15), mentre in altre specie di *Enterobacteriaceae* questi enzimi sono riscontrati con una frequenza notevolmente più bassa (6, 8). Nel caso di *Pseudomonas aeruginosa* sono state osservate varianti TEM come TEM-42, capace di conferire un elevato grado di resistenza a cefotaxime e ceftazidime (11). La resistenza a numerosi antibiotici che caratterizza questi microrganismi non dipende solo dalla produzione di ESBLs di tipo TEM, ma anche di tipo OXA (OXA2; OXA10), che determinano un elevato grado di resistenza a ceftazidime, aztreonam, ecc. (5). L'acquisizione di un gene che codifica per ESBLs rappresenta per *Pseudomonas aeruginosa* un lieve vantaggio rispetto a quello che rappresenta per *Klebsiella pneumoniae*. Infatti *Pseudomonas aeruginosa* possiede la capacità di dereprimere le proprie cefalosporinasi cromosomiali diventando resistente ad un ampio spettro di cefalosporine, mentre al contrario *Klebsiella pneumoniae* non presenta questa capacità. Tale capacità, presente anche in *Citrobacter* ed in *Enterobacter*, potrebbe spiegare per queste specie la bassa frequenza di ceppi produttori di ESBLs (11).

Nel nostro studio abbiamo valutato l'attività di alcune beta-lattamasi e l'incidenza di extended spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* isolate da materiali patologici diversi.

Materiali e metodi

I microrganismi analizzati provenivano da materiali patologici diversi, come emocolture, urine, altri liquidi biologici, materiali respiratori, tamponi da

ferita, ecc.. *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* dopo l'isolamento su piastre di McConkey erano saggiate per la sensibilità agli antibiotici mediante il sistema automatico Vitek. I ceppi produttori di beta-lattamasi erano esaminati per la loro capacità a produrre ESBLs mediante il sistema dell'agar-diffusione, utilizzando dischetti di ceftazidime (30 μ g) ed aztreonam (30 μ g) (Oxoid), e dischetti contenenti gli stessi antibiotici ai quali era aggiunto sulbactam (20 μ g). Una differenza nel diametro dell'alone di inibizione superiore a 6 mm, per i dischetti di antibiotico ai quali era aggiunto sulbactam rispetto agli altri senza aggiunta di inibitore di beta-lattamasi, era considerata significativa per indicare il microrganismo come produttore di ESBLs.

Risultati e discussione

Dai risultati ottenuti si evidenzia come nel caso di *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* le percentuali di sensibilità ai beta-lattamici presi in considerazione siano piuttosto elevate, ad eccezione di ampicillina, mentre nel caso di *Pseudomonas aeruginosa* le percentuali di sensibilità si riducono significativamente. Infatti mentre nei confronti di *Klebsiella pneumoniae* e di *Escherichia coli* la sensibilità a cefotaxime, ceftazidime, aztreonam ed imipenem varia dal 90% al 100%, nel caso di *Pseudomonas aeruginosa* si osservano percentuali di sensibilità comprese tra il 70% nel caso di ceftazidime ed il 33% nel caso di cefotaxime. L'associazione del tazobactam alla piperacillina determina un significativo aumento nelle percentuali di sensibilità per *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*; mentre per *Pseudomonas aeruginosa* l'incremento della sensibilità è solo del 5%.

Ceppi produttori di ESBLs sono stati osservati nel 6,3% in *Klebsiella pneumoniae*, 5,2% in *Pseudomonas aeruginosa* e 0,3% in *Escherichia coli* (Tab. 1). Per altri microrganismi appartenenti alle *Enterobacteriaceae*, come *Proteus*, *Enterobacter* e *Serratia*, la frequenza di ceppi produttori di ESBLs si è dimostrata piuttosto bassa e compresa tra 0,5 e 1 (Tab. 2). L'elevata percentuale di ceppi di *Klebsiella pneumoniae* produttori di ESBLs è in accordo con altri centri europei dove sono riportate percentuali di *Klebsiella pneumoniae* produttori di ESBLs superiori al 10% (15). L'insorgenza di questi ceppi è imputata al largo uso di antibiotici beta-lattamici e la loro diffusione è piuttosto

Tabella 1: Attività di alcune beta-lattammine e produzione di ESBLs da parte di *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotici	Microrganismi (n) e loro sensibilità %		
	<i>Escherichia coli</i> (805)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (173)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (180)
Ampicillina	63%	28%	76%
Piperacillina	86%	78%	76%
Piperacillina/ Tazobactam	97%	91%	81%
Cefotaxime	100%	96%	33%
Cefazidime	100%	91%	79%
Aztreonam	99%		60%
Imipenem	100%	100%	73%
Produzione di ESBLs	0,3%	6,3%	5,7%

Tabella 2: Produzione di ESBLs da parte di alcune *Enterobacteriaceae* di isolamento ospedaliero.

Microrganismi (n) produttori di ESBLs	frequenza	
	frequenza	%
<i>Morganella morganii</i> (53)	1	1,8
<i>Enterobacter aerogenes</i> (70)	1	1,4
<i>Proteus mirabilis</i> (248)	2	0,8
<i>Serratia marcescens</i> (65)	1	1,5

ampia visto che sono stati isolati da materiali patologici provenienti da diversi reparti quali medicina, rianimazione, dermatologia, traumatologia, malattie infettive, neurochirurgia e cardiologia dove la pressione selettiva è più o meno accentuata. Nelle urine di pazienti ambulatoriali sono stati isolati ceppi produttori di ESBLs, a testimonianza del fatto che questi microrganismi non sono localizzati in nicchie ecologiche specifiche, come può essere un determinato reparto, ma sono ampiamente distribuiti. La valutazione della capacità di *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* a produrre enzimi attivi verso un ampio spettro di beta-lattammine si rende spesso necessaria ai fini di una corretta terapia. Molto semplicemente la presenza di questi enzimi può essere rilevata mediante la tecnica del doppio disco mettendo ad opportuna distanza un dischetto di ceftazidime o aztreonam da uno contenente un inibitore di beta-lattamasi. La deformazione dell'alone di inibizione indica un'azione protettiva da parte dell'inibitore e quindi la presenza di beta-lattamasi ad ampio spettro (14). Nel nostro lavoro abbiamo preferito utilizzare una tecnica che consisteva nel paragonare l'alone di

inibizione di un dischetto di ceftazidime od aztreonam con quello di un altro dischetto contenente sempre gli stessi antibiotici cui era aggiunto un inibitore di beta-lattamasi. Una differenza nel diametro dell'alone di inibizione >6 mm era ritenuta indice della presenza di ESBLs.

Extended spectrum beta-lattamases devono essere prese in considerazione sia dal microbiologo che dal clinico, il primo per correggere adeguatamente i valori di sensibilità in caso di ceppi produttori di questi enzimi, il secondo per impostare una corretta terapia antibiotica che eviti l'insorgere ed il diffondersi di questi microrganismi con più resistenze. Nel caso di *Pseudomonas aeruginosa* si osserva una mancanza di correlazione tra percentuale di resistenza ai beta-lattamici e produzione di ESBLs. Questo è probabilmente dovuto al fatto che *Pseudomonas aeruginosa* possiede altri meccanismi di resistenza molto efficaci, tra tutti l'impermeabilità della parete che consente al microrganismo di essere resistente a più antibiotici, compresi i carbapenemi e le cefamicine, che sono stabili all'azione delle ESBLs, anche se attualmente è stata segnalata la presenza di enzimi in grado di degradare i carbapenemi come risposta di microrganismi, quali *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides*, *Aeromonas*, *Stenotrophomonas maltophilia*, al largo impiego di questi antibiotici (13).

Bibliografia

1. Bauerfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Giamarellon H. Characterization of the plasmidic beta-lactamase CMY-2 which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 37:797-802, 1996.
2. Ben Redjeb S, Ben Yaghlane H, Boujnah A, Philippon A, Labia R. Synergy between clavulanic acid and newer beta-lactams on nine clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* resistant to third-generation cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* 21:263-266, 1988.
3. Bradford PA, Urban C, Jaiswal A, Marino N, Rasmussen BA, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 39:899-905, 1995.
4. Bush K., Jacoby G.A., Medeiros A.A.: A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 39:1211-1233, 1995.
5. Danel F, Hall LMC, Gur D, Livermore DM. OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 39:1881-1884, 1995.
6. Jacoby GA, Carreras I. Activities of beta-lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 34:858-862, 1990.

7. Jacoby GA, Medeiros AM. More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 35:1697-1704, 1991.
8. Jarlier V, Nicholas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10:867-876, 1988.
9. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzlig RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 28:302-307, 1985.
10. Knothe H, Shah P, Kremèry V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftioxin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 11:315-317, 1988.
11. Mugnier P, Dubrous P, Casin I, Arlet G, Collatz E. A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 40:2488-2493, 1996.
12. Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 33:1131-1136, 1989.
13. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 41:223-232, 1997.
14. Sirot J. Detection of extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases by disk diffusion. *Clin. Microbiology and Infection* 2(suppl.1):35-39, 1996.
15. Sirot J, Chanal C, Petit A, Sirot R, Labia R, Gerbaud G. *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae* producing novel plasmid-mediated beta-lactamases markedly active against third-generation cephalosporins: epidemiologic studies. *Rev. Infect. Dis.* 10:850-859, 1988.
16. Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 20:323-333, 1987.
17. Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev. Infect. Dis.* 10:879-884, 1988.