

Фенотипска детекција производње бета-лактамаза код ентеробактерија

Ивана Ћирковић¹, Љиљана Павловић², Неда Константиновић¹, Катарина Костић¹,
Снежана Јовановић³, Слободанка Ђукић¹

¹Институт за микробиологију и имунологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду,
Београд, Србија;

²Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“, Београд, Србија;

³Служба за микробиологију, Клинички центар Србије, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Бета-лактамски антибиотици су најчешће коришћени антибактеријски лекови. Међутим, многе бактерије су развиле резистенцију на ове антибиотике, а најчешћи вид резистенције је стварање ензима бета-лактамаза. Бројни чланови породице *Enterobacteriaceae* производе различите типове ових ензима.

Циљ рада Циљ истраживања су биле фенотипска детекција производње и идентификација типа бета-лактамаза код ентеробактерија изолованих из различитих клиничких узорака од болесника хоспитализованих у Клиничком центру Србије.

Методе рада Клинички изолати ентеробактерија сакупљани су у лабораторији Клиничког центра Србије од новембра 2011. до јануара 2012. године. Изолати су идентификовани до нивоа врсте конвенционалним методама бактериолошке дијагностике и на аутоматизованом систему VITEK 2. Осетљивост на антибиотике је испитана диск-дифузионом методом, а фенотипска детекција производње и идентификација бета-лактамаза урађене су у складу с описаним методологијама.

Резултати У овом истраживању изолована су 172 соја ентеробактерија. У даље испитивање укључено је 54/145 (37,2%) сојева ентеробактерија које су показале резистенцију и интермедијарну осетљивост на бета-лактамске антибиотике: 13/85 (15,3%) сојева *Escherichia coli*, 31/46 (67,4%) сојева *Klebsiella pneumoniae* и 10/14 (71,4%) сојева *Proteus mirabilis*. Међу њима 40/145 (27,6%) сојева је производило бета-лактамазе проширеног спектра (енгл. *extended-spectrum beta-lactamases – ESBLs*), 9/145 (6,2%) *AmpC*, 1/145 (0,7%) K1 бета-лактамазу и 4/145 (2,8%) карбапенемазе. Карбапенемазе најчешће је производила врста *K. pneumoniae* (75%).

Закључак Ентеробактерије стварају различите типове бета-лактамаза, а најчешће детектовани тип су *ESBL*. Претећи проблем је и производња карбапенемаза код ентеробактерија.

Кључне речи: бета-лактамазе; ентеробактерије; резистенција

УВОД

Резистенција микроорганизама на анти-микробне лекове је медицински проблем од општег значаја [1]. Бета-лактамски антибиотици су најчешће коришћени анти-бактеријски лекови због њихове релативно високе ефикасности, доступности и ретких нежељених дејстава [2]. Најчешћи вид резистенције на ове антибиотике је производња ензима бета-лактамаза [3].

До данас је описано више од 950 бета-лактамаза [4]. Ови ензими се могу класификовати на два начина. Према првој – молекуларној или Амблеровој (*Ambler*) – класификацији, заснованој на примарној структури ензима, постоје четири класе бета-лактамаза. Класама А, С и D припадају ензими који хидролизују супстрате стварањем ацилензима преко серина из свог активног места, док класу В чине тзв. металоензими, који за хидролизу бета-лактама користе бар један јон цинка из активног места. Према другој – функционалној или Буш–Џејкоби–Медеирсовој (*Bush–Jacoby–*

Medeiros) – класификацији, заснованој на функционалним одликама ензима, постоје четири групе: цефалоспориназе (група 1), серин бета-лактамазе (група 2), метало-бета-лактамазе (група 3) и неклаификовани ензими (група 4) [5].

Бројни чланови породице *Enterobacteriaceae* стварају различите бета-лактамазе. Ове бактерије могу имати плазмидски детерминисане бета-лактамазе (*TEM1*, *TEM2* и *SHV1*), које их чине резистентним на пеницилине, али не и на цефалоспорине проширеног спектра дејства. Осамдесетих година двадесетог века код ентеробактерија је откривена нова група ензима који инактивирају све пеницилине и цефалоспорине, укључујући и цефалоспорине проширеног спектра деловања (цефотаксим, цефтриаксон, цефтазидим) и оксиминомобактам (азтреонам), али не хидролизују цефамицине (цефокситин, цефотетан) и карбапенеме [6, 7]. Ови ензими названи су бета-лактамазе проширеног спектра (енгл. *extended-spectrum beta-lactamases – ESBLs*). Постоји око 500 различитих *ESBLs* [7], а свака од њих је

Correspondence to:

Ivana ĆIRKOVIĆ
Institut za mikrobiologiju i
imunologiju
Medicinski fakultet
Dr Subotića 1, 11000 Beograd
Srbija
cirkoviciv@yahoo.com

настала мутацијама гена за *TEM1*, *TEM2* и *SHV1* [8]. Ове мутације такође повећавају осетљивост ензима на деловање инхибитора бета-лактамаза [9]. Велику групу *ESBL* чине *CTX-M* ензими (класа А), који хидролизују цефотаксим, а не цефтазидим, и показују бољу осетљивост на тазобактам него на клавуланску киселину [10]. *AmpC* тип бета-лактамаза (класа С, група 1) код ентеробактерија, разликује се од *ESBLs* по томе што су резистентне на инхибиторе бета-лактамаза и што хидролизују цефамидине, али не и цефалоспирине четврте генерације. Гени за *AmpC* су најчешће нађени на хромозомима, мада се и плазмидски детерминисани *AmpC* могу наћи код неких ентеробактерија, као што су *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* и *Salmonella spp.* К1 бета-лактамаза је кодирана од стране гена који је нађен на хромозому бактерије *Klebsiella spp.* Овај ензим је, пре свега, пеницилиназа, али може да хидролизује и азтреонам, цефуроксим и цефтриаксон. Има слабу активност према цефотаксиму и цефтазидиму. Недавно су код сојева ентеробактерија описане класе А, В и D карбапенемаза, које хидролизују све бета-лактамске антибиотике, укључујући и карбапенеме [7].

ЦИЉ РАДА

Циљ истраживања су биле фенотипска детекција и идентификација типа произведених бета-лактамаза код ентеробактерија изолованих из различитих клиничких узорака код болесника хоспитализованих у Клиничком центру Србије.

МЕТОДЕ РАДА

Бактеријски сојеви

Клинички сојеви ентеробактерија изоловани из хемокултура, пиокултура и уринокултура сакупљани су у микробиолошкој лабораторији Клиничког центра Србије (КЦС) од новембра 2011. до јануара 2012. године. Сојеви су идентификовани до нивоа врсте конвенционалним методама бактериолошке дијагностике. Потврда идентификације клиничких сојева ентеробактерија извршена је у аутоматизованом систему *VITEK 2* (*bioMérieux*, Француска) коришћењем картица *GN* у складу с препорукама произвођача. Испитивање осетљивости на антибактеријске лекове је извршено диск-дифузионом методом антибиограма у складу с препорукама америчког Института за клиничке и лабораторијске стандарде (енгл. *Clinical and Laboratory Standard Institute – CLSI*) из 2011. године [11]. У даље истраживање били су укључени само сојеви ентеробактерија који су били резистентни и интермедијарно осетљиви на бета-лактамске антибиотике. Сакупљени сојеви су чувани у триптиказа-соја бујону (*TSB; bioMérieux*, Француска) са глицеролом у концентрацији од 12,5% на температури од -80°C.

Испитивање осетљивости на антибиотике диск-дифузионом методом

Сојеви сакупљени у овој студији освежени су пресејавањем на триптиказа-соја агар (*bioMérieux*, Француска). Засејане подлоге су инкубиране 24 часа на 35°C. Потом су прављене бактеријске суспензије у суспензионом медијуму (*bioMérieux*, Француска). Густина суспензија је прецизно подешена на дензитометру (*bioMérieux*, Француска), да би одговарала Макфарландовом (*McFarland*) стандарду од 0,5. Добијене суспензије су инокулисане на површину Милер–Хинтоновог (*Mueller–Hinton – MH*) агра (*bioMérieux*, Француска) у Петријевим шољама пречника 150 mm. Диск-антибиотика су затим поређани по површини засејаног *MH* агара по одређеном распореду (Схема 1). Коришћени су следећи антибиотици: амоксицилин са клавуланском киселином (20/10 µg), азтреонам (30 µg), цефтазидим (30 µg), цефтазидим са клавуланском киселином (30/10 µg), цефотаксим (30 µg), цефотаксим са клавуланском киселином (30/10 µg), цефокситин (30 µg), цефтриаксон (30 µg), цефепим (30 µg), ертапенем (10 µg), имипенем (10 µg) и меропенем (10 µg) (*BioRad*, САД). Инокулисане плоче су потом инкубиране у термостату на 35°C током 24 часа.

Идентификација типа бета-лактамаза

Идентификација типа бета-лактамаза обављена је у складу с описаним методологијама [10-14].

1. Детекција *ESBL* – користе се дискови цефтазидама и цефотаксима са клавуланском киселином и без ње [11]:

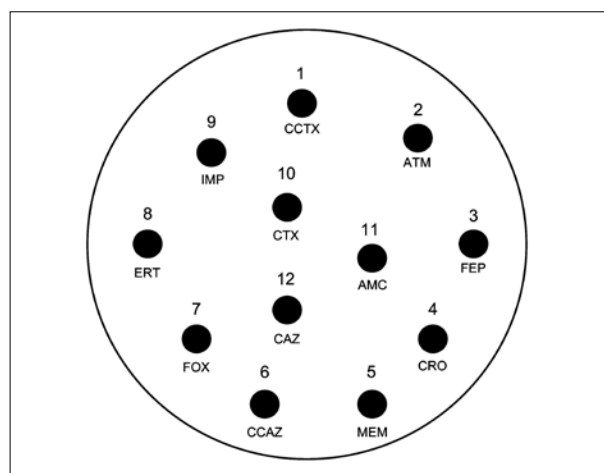


Схема 1. Шаблон за диск-дифузиону методу откривања бета-лактамаза

Schema 1. Template for disk potentiation method for detecting beta-lactamases

1 – цефотаксим + клавуланска киселина; 2 – азтреонам; 3 – цефепим; 4 – цефтриаксон; 5 – меропенем; 6 – цефтазидим + клавуланска киселина; 7 – цефокситин; 8 – ертапенем; 9 – имипенем; 10 – цефотаксим; 11 – амоксицилин + клавуланска киселина; 12 – цефтазидим

1 – cefotaxime + clavulanate; 2 – aztreonam; 3 – ceftazidime; 4 – ceftriaxone; 5 – meropenem; 6 – ceftazidime + clavulanate; 7 – ceftioxitin; 8 – ertapenem; 9 – imipenem; 10 – cefotaxime; 11 – amoxicillin + clavulanate; 12 – ceftazidime

а) ако је зона инхибиције раста око дискова са додатком клавуланске киселине већа за 5 mm или више у поређењу са зоном инхибиције око диска без клавуланске киселине, сој ствара *ESBL*;

б) ако се уочи „деформација“ зоне инхибиције раста између било којег цефалоспоринског диска и диска који садржи клавуланску киселину, производња *ESBL* се може предвидети. Овај феномен се назива „феномен кључаонице“ и указује на стварање *ESBL*.

2. Детекција *CTX-M* бета-лактамазе – користе се дискови цефтазидима и цефотаксима. Сојеви који стварају *CTX-M* су резистентни на цефотаксим и осетљиви на цефтазидим [10].

3. Детекција *AmpC* бета-лактамазе – користе се дискови цефепима и цефокситина. Сојеви који производе *AmpC* резистентни су на цефамицине (нпр. цефокситин), а осетљиви на цефепим. Сојеви који стварају овај ензим у великој количини резистентни су на све цефалоспорине прве, друге и треће генерације, инхибиторе бета-лактамаза и монобактаме [12].

4. Детекција *K1* бета-лактамазе – користе се дискови азтреонама, цефтазидима, цефотаксима, цефтриаксона и цефокситин. Сојеви који производе *K1* бета-лактамазу су осетљиви на цефокситин (*AmpC*-негативни), цефотаксим и цефтазидим, а резистентни на цефтриаксон и азтреонам [13].

5. Детекција карбапенемаза – користе се дискови ертапенема, имипенема и меропенема. Сојеви који производе овај ензим показују смањену осетљивост или резистенцију на ертапенем, имипенем и/или меропенем [14].

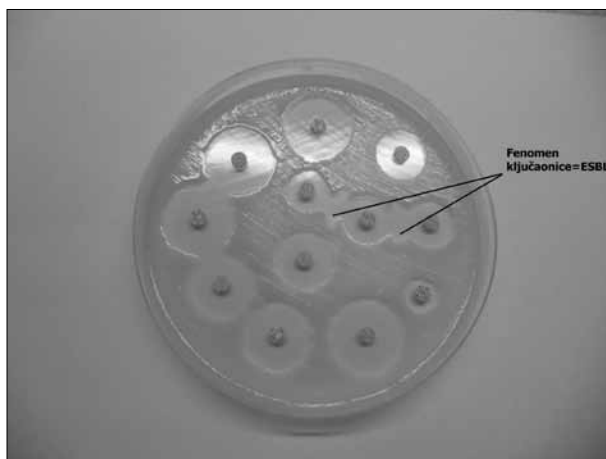
Фенотипска потврда карбапенемаза

Ради фенотипске потврде производње карбапенемаза, изведен је модификован Хоцов (*Hodge*) тест [14].

РЕЗУЛТАТИ

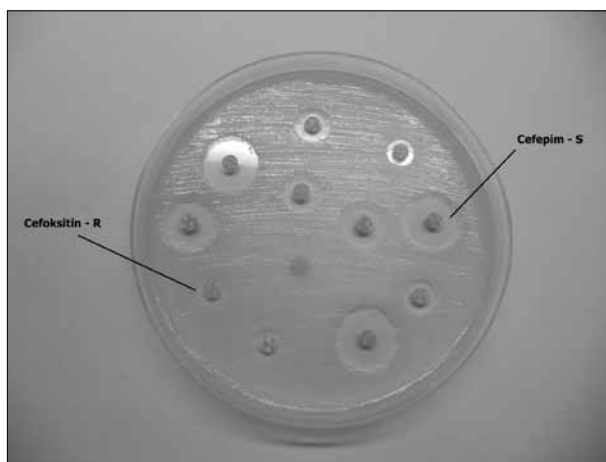
У посматраном периоду изолована су 172 соја ентеробактерија: 85 (49,4%) сојева *Escherichia coli*, 46 (26,7%) сојева *Klebsiella pneumoniae*, 14 (8,1%) сојева *Proteus mirabilis*, 11 (6,4%) сојева *Enterobacter cloacae*, осам (4,7%) сојева *Serratia marcescens*, пет (2,9%) сојева *Morganella morganii* и три (1,8%) соја *Citrobacter freundii*. У даље истраживање била су укључена 54/145 (37,2%) соја ентеробактерија која су показала резистенцију или интермедијарну осетљивост на бета-лактамске антибиотике: 13/85 (15,3%) сојева *E. coli*, 31/46 (67,4%) сојева *K. pneumoniae* и 10/14 (71,4%) сојева *P. mirabilis*.

Производња различитих типова бета-лактамаза детектована је код анализираних сојева ентеробактерија. Међу њима 40/145 (27,6%) сојева је производило *ESBL* (Слика 1), 9/145 (6,2%) *AmpC* (Слика 2), 1/145 (0,7%) *K1* бета-лактамазу и 4/145 (2,8%) карбапенемазе (Слика 3). Код свих карбапенемаза-позитивних сојева модификован Хоцов тест је био позитиван.



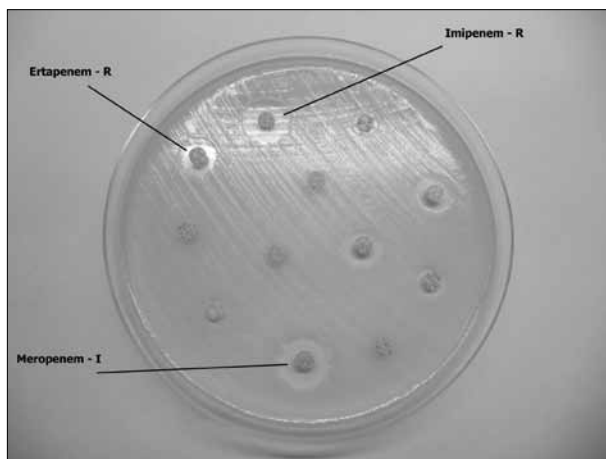
Слика 1. Детекција *ESBL* – феномен кључаонице око диска са клавуланском киселином – *Escherichia coli*

Figure 1. Detection of *ESBL* – keyhole formation around clavulanic containing disk – *Escherichia coli*



Слика 2. Детекција *AmpC* бета-лактамаза – *Proteus mirabilis*

Figure 2. Detection of *AmpC* beta-lactamase – *Proteus mirabilis*



Слика 3. Детекција карбапенемаза – *Klebsiella pneumoniae*

Figure 3. Detection of carbapenemase – *Klebsiella pneumoniae*

Учесталост различитих типова бета-лактамаза код испитиваних сојева ентеробактерија приказана је у табелама 1 и 2.

У нашем истраживању откривени су сојеви ентеробактерија који су истовремено производили два различита типа бета-лактамаза: два соја *P. mirabilis*

Табела 1. Учесталост бета-лактамаза проширеног спектра (*ESBL*) код испитиваних изолата ентеробактерија
Table 1. Frequency of extended-spectrum beta-lactamases (*ESBL*) among tested *Enterobacteriaceae* isolates

Изолати ентеробактерија <i>Enterobacteriaceae</i> isolates		Бактерија Bacterium			
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	
Укупан број изолата (%) Total number of isolates		85	46	14	
<i>ESBL</i> -позитивни изолати <i>ESBL</i> -positive isolates	<i>CTX-M</i> ензим <i>CTX-M</i> enzyme	Број изолата Number of isolates	3	4	1
		% изолата унутар врсте % of isolates among the species	3.5	8.7	7.1
		% изолата унутар произуктора % of isolates among the producers	37.5	50.0	12.5
	Остали <i>ESBL</i> типови ензима Others <i>ESBL</i> enzyme types	Број изолата Number of isolates	10	17	5
		% изолата унутар врсте % of isolates among the species	11.8	36.9	35.7
		% изолата унутар произуктора % of isolates among the producers	31.2	53.1	15.7

Табела 2. Учесталост других типова бета-лактамаза код испитиваних изолата ентеробактерија
Table 2. Frequency of other type of beta-lactamase among tested *Enterobacteriaceae* isolates

Изолати ентеробактерија <i>Enterobacteriaceae</i> isolates		Бактерија Bacterium		
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Укупан број изолата Total number of isolates		85	46	14
<i>AmpC</i> -позитивни изолат <i>AmpC</i> positive isolates	Број изолата Number of isolates	0	6	3
	% изолата унутар врсте % of isolates among the species	0.0	13.0	21.4
	% изолата унутар произуктора % of isolates among the producers	0.0	66.7	33.3
К1 бета-лактамаза позитивни изолати K1 beta-lactamase positive isolates	Број изолата Number of isolates	0	1	0
	% изолата унутар врсте % of isolates among the species	0.0	2.2	0.0
	% изолата унутар произуктора % of isolates among the producers	0.0	100.0	0.0
Карбапенемаза- позитивни изолати Carbapenemase positive isolates	Број изолата Number of isolates	0	3	1
	% изолата унутар врсте % of isolates among the species	0.0	6.5	7.1
	% изолата унутар произуктора % of isolates among the producers	0.0	75.0	25.0

стварала су *ESBL* и *AmpC*, један сој *P. mirabilis* стварало је *AmpC* и карбапенемазе, а један сој *K. pneumoniae* производио је *ESBL* и К1.

ДИСКУСИЈА

Ентеробактерије се данас сматрају главним бактеријским узрочником морбидитета и морталитета у болничким срединама и једним од најзначајнијих патогена у општој популацији широм света [15]. Посебан медицински, али и економски проблем јесте резистенција ових бактерија на бета-лактамске антибактеријске лекове [3]. Савремена сазнања из области клиничке бактериологије нам указују на то да није довољно само *in vitro* испитати осетљивост ентеробактерија на бета-лактамске антибиотике, већ је потребно открити производњу бета-лактамаза од стране анализираних

соја и утврдити тип ензима ради тачног издавања резултата и епидемиолошког надзора.

У складу с препорукама за тумачење антибиограма [16, 17], уведена су нова правила према којима се резултати испитивања осетљивости ентеробактерија на цефалоспорине треће и четврте генерације и карбапенеме извештавају онако како су очитани, јер су граничне вредности за наведене антибиотике промењене. Међутим, у сврху епидемиолошког надзора и давања препорука лекарима, важно је открити да ли испитивани сој ствара *ESBL*, односно карбапенемазу или не [18]. Лечење инфекције изазване *ESBL*-позитивном бактеријом цефалоспоринима треће и четврте генерације може бити неуспешно. Код сојева ентеробактерија који производе *AmpC* бета-лактамазу резултате антибиограма за цефалоспорине треће генерације не треба кориговати, али је неопходно у резултату препоручити да се ови антибиотици не користе као

монотерапија. Такође се препоручује да се након три-четири дана поново покуша с изолацијом и поновним тестирањем изолата због могућности настанка резистенције током лечења цефалоспоринима треће генерације [17, 18]. Из свега наведеног се може закључити да је неопходно детектовати типове бета-лактамаза које производе ентеробактерије. У овом раду приказана је једноставна и лака метода за откривање ових ензима, коју може у свом рутинском раду применити свака микробиолошка лабораторија у нашој земљи.

Резултати нашег истраживања су показали да ентеробактерије изоловане из клиничких узорака код болесника хоспитализованих у КЦС најчешће производе *ESBL*. Укупна преваленција *ESBL*-позитивних ентеробактерија варира између различитих географских региона: највећа је у Индији (77,4%) [19], а најмања у Холандији (2%) [20]. Поред тога, учесталост изоловања *ESBL*-позитивних ентеробактерија повећава се из године у годину широм света [3]. Према резултатима наше студије, међу анализираним сојевима 27,6% производи *ESBL*. Када се упореде добијени резултати с резултатима из 2006. године (28,6%) и 2008. године (26,1%) [21], закључује се да у последњих шест година у КЦС није дошло до смањења броја *ESBL*-позитивних сојева. То нам показује да мере контроле и превенције болничких инфекција које се примењују у КЦС нису довољно ефикасне, јер нису довеле до смањења преваленције ових бактерија.

Резултати наше студије, који су у складу с подацима из бројних претходних истраживања [3, 20, 22], показали су да: 1) *K. pneumoniae*, *E. coli* и *P. mirabilis* производе *ESBL*; 2) најзначајнији продуктор је *K. pneumoniae*, и 3) међу *ESBL* ензимима детектован је и *CTX-M* ензим. Оно што је посебно значајно је управо доказивање присуства овог ензима код наших сојева, који може проћи неоткривен ако се у антибиограму не користе заједно дискови цефтазидима и цефотаксима, што може бити реална могућност у рутинском раду. Учесталост детекције *CTX-M* ензима код *E. coli* и *K. pneumoniae* је све већа у Француској, Великој Британији и Русији [20], а резултати наше студије нам говоре да се овај ензим налази и код ентеробактерија у нашој земљи.

Додатни сегмент нашег истраживања је доказивање присуства и других типова бета-лактамаза, поред *ESBL*. Посебан проблем представљају стечене *AmpC* цефалоспориназе. Иако су у глобалном контексту ови ензими знатно ређи код ентеробактерија од *ESBL*, сматрају се данас другим најзначајнијим типом бета-лактамаза [23]. Нашим истраживањем је показано да је *AmpC* ензим производило 13% сојева *K. pneumoniae* и 21,4% *P. mirabilis*. Слична учесталост показана је и

студијама изведеним у Европи [24] и Индији [25], у којима је учесталост производње *AmpC* била 10–30% код *K. pneumoniae* и 15–22% код *P. mirabilis*. Наша студија је указала и на слабу производњу *K1* ензима, што је у складу с подацима из литературе [7].

Посебан клинички и епидемиолошки проблем свуда у свету јесте појава сојева ентеробактерија који стварају карбапенемазе. Преваленција карбапенемаза код ентеробактерија у Европи варира од земље до земље; највиша учесталост је у земљама на југу Европе – Кипру, Италији и Грчкој (15,7–49%), а најмања у земљама на северу – скандинавским државама, Естонији и Литванији (0%) [26]. Учесталост ентеробактерија које производе карбапенемазе у нашој студији била је мала (2,8%), имајући у виду да је реч о сојевима изолованим у болници терцијарног нивоа заштите, у којој се очекује виша стопа резистенције у поређењу с националним просеком. Једно од могућих објашњења добијеног резултата може бити вишегодишња изолација наше земље током деведесетих година двадесетог века, као и ограничена путовања наших држављана у друге земље из економских разлога.

Међу ентеробактеријама *K. pneumoniae* је најчешћи и, може се рећи, најпознатији продуктор карбапенемаза. Сличне резултате смо добили и у нашем истраживању. У нашој студији производња карбапенемаза је потврђена и модификованим Хоцовим тестом. Међутим, идентификација класе карбапенемаза (*A*, *B* и *D*) није била могућа, јер сви дијагностички који се користе у ову сврху још нису регистровани у нашој земљи и не могу се набавити на тржишту.

ЗАКЉУЧАК

Према сазнањима која су нам била доступна, ово је прва студија у нашој земљи која се бавила фенотипском детекцијом производње различитих типова бета-лактамаза код ентеробактерија и њиховом идентификацијом. Добијени резултати истраживања су утврдили четири различита типа ензима: *ESBL*, *AmpC*, *K1* и карбапенемазе. Најчешће детектовани тип бета-лактамаза биле су *ESBL*. Карбапенемазе је најчешће производила врста *K. pneumoniae*.

НАПОМЕНА

Рад је настао у оквиру пројекта ОН 175039, који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

ЛИТЕРАТУРА

- Levy SB. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49:25-30.
- Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NCJ. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2005; 8:525-33.
- Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill.* 2008; 13:1-11.
- Bush K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr Opin in Microbiol.* 2010; 13:558-64.
- Bush K, Jacoby GA. Minireview updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54:969-76.
- Knothe H, Shah P, Kremery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofexim, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* 1983; 11:315-7.
- Schreckenber P, Rekasius V. Detecting resistance to beta lactams in gram-negative bacilli. *Clin Microbiol Inf Dis.* 2011; 56:251-3.
- Emery CL, Weymouth LA. Detection and clinical significance of extended-spectrum β -lactamases in a tertiary-care medical center. *J Clin Microbiol.* 1997; 35:2061-7.
- Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. *N Engl J Med.* 2005; 352:380-91.
- Pournaras S, Ikonomidis A, Kristo I, Tsakris A, Maniatis AN. CTX-M enzymes are the most common extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* in a tertiary Greek hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54:574-5.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
- Ruppe E, Bidet P, Verdet C, Arlet G, Bingen E. First detection of the Ambler Class C1 AmpC beta-lactamase in *Citrobacter freundii* by a new simple double-disk synergy test. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:4204-7.
- Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48:87-102.
- Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA, Dutch Working Party on the Detection of Highly Resistant Microorganisms. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 36:205-10.
- Denton M. Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents.* 2007; 29:S9-S22.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2013; Version 3.1. Available from: <http://www.eucast.org>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM, Ho PL, Keness Y, Doi Y, et al. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67:1569-77.
- Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Badal RE, Hsueh PR, Paterson DL. Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program, 2007. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:3280-4.
- Luzzaro F, Mezzatesta M, Mugnaioli C, Perilli M, Stefani S, Amicosante G, et al. Trends in production of extended-spectrum beta-lactamases among enterobacteria of medical interest: report of the second Italian nationwide survey. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:1659-64.
- Jovanović S, Ćirković I, Švabić Vlahović M. Učestalost izolacije sojeva enterobakterija koji produkuju beta-laktamaze proširenog spektra (ESBLs) iz kliničkih uzoraka pacijenata sa osam klinika Kliničkog centra Srbije. Proceedings of the VIII kongres mikrobiologa Srbije; 2010 Jun 3-5; Belgrade, Serbia [CD-ROM]. Belgrade: Mikromed; 2010.
- Dhillon RH, Clark J. ESBLs: a clear and present danger? *Crit Care Res Pract.* 2012; 625170.
- Empel J, Baraniak A, Literacka E, Mrówka A, Fiett J, Sadowy E, et al. Molecular survey of beta-lactamases conferring resistance to newer beta-lactams in Enterobacteriaceae isolates from Polish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:2449-54.
- Goossens H, Grabein B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum β -lactamase- and AmpC-producing Enterobacteriaceae from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). *Diagn Microb Inf Dis.* 2005; 53:257-64.
- Sasirekha B, Shivakumar S. Occurrence of plasmid-mediated AmpC β -Lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in a tertiary care hospital in Bangalore. *Indian J Microbiol.* 2012; 52:174-9.
- Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae

Phenotypic Detection of Beta-Lactamases Production in *Enterobacteriaceae*

Ivana Ćirković¹, Ljiljana Pavlović², Neda Konstantinović¹, Katarina Kostić¹, Snežana Jovanović³, Slobodanka Djukić¹

¹Institute of Microbiology and Immunology, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

²Institute of Public Health of Serbia "Dr Milan Jovanović Batut", Belgrade, Serbia;

³Department of Microbiology, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction Beta-lactam antibiotics are the most commonly used antibacterial drugs. However, many bacteria have developed resistance to these antibiotics, and the most common form of resistance is the production of beta-lactamase enzymes. Many members of the *Enterobacteriaceae* family produce different types of these enzymes.

Objective The aim of this study was to perform phenotypic detection of production and identification of beta-lactamase type in *Enterobacteriaceae* isolated from different clinical specimens from patients hospitalized in the Clinical Center of Serbia.

Methods The strains of *Enterobacteriaceae* were collected between November 2011 and January 2012 in the laboratory of the Clinical Center of Serbia. The isolates were identified according to the standard microbiology procedures and confirmed by the Vitek2 automated system. Antimicrobial susceptibility testing was performed by the disk diffusion method, and the

phenotypic detection of production and identification of beta-lactamases was performed according to previously described methodologies.

Results In this study, a total of 172 *Enterobacteriaceae* strains were isolated. Further testing was performed on 54/145 (37.2%) strains showing decreased susceptibility to beta-lactam antibiotics: 13/85 (15.3%) *Escherichia coli*, 31/46 (67.4%) *Klebsiella pneumoniae* and 10/14 (71.4%) *Proteus mirabilis*. Among them, 40/145 (27.6%) strains produced extended spectrum beta-lactamases (ESBLs), 9/145 (6.2%) - AmpC, 1/145 (0.7%) - K1 beta-lactamase and 4/145 (2.8%) - carbapenemases. Carbapenemases were predominantly detected in *K. pneumoniae* (75%).

Conclusion *Enterobacteriaceae* produce different types of beta-lactamases, and the most common type in our study was ESBLs. Production of carbapenemases detected in *Enterobacteriaceae* is also an associated problem.

Keywords: beta-lactamases; enterobacteria; resistance

Примљен • Received: 01/04/2013

Ревизија • Revision: 17/01/2014

Прихваћен • Accepted: 29/04/2014