

Enterobacteriaceae Kökenlerinde Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üretiminin İki Farklı Yöntemle Araştırılması

M. Tevfik YAVUZ¹, Gürsel ERSAN², Mehmet SÜVARİEREL³

¹Abant İzzet Baysal Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Düzce

²Denizli Devlet Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği, Denizli

³İzzet Baysal Bolu Devlet Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği, Bolu

ÖZET

GSβL üreten suşlarla gelişen sporadik nozokomiyal salgınlar bazı hastanelerde ciddi sorunlara neden olmaktadır. Özellikle çok sık beta-laktam antibiyotik kullanımının olduğu hastane ortamının selektif baskısı altında tedavi gören hastaların solunum ya da sindirim sistemlerinde bu enzimleri üreten bakteri kolonizasyonları görülmektedir. Bu çalışmada toplumdaki kazanılmış ve hastane kaynaklı toplam 239 *Enterobacteriaceae* kökeni Sceptor (BD ABD) panelleriyle izole edildikten sonra tanımlanan bakteriler çift disk sinerji ve E test (AB Biodisk İsveç) yöntemleri ile GSβL yönünden incelenmiştir. Kullanılan her iki yöntem arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Duyarlılık testi için kullandığımız her iki yöntemde de yatan hastalardan elde edilen *Enterobacteriaceae* kökenlerinin % 22'sinin GSβL oluşturduğunu saptadık. Bu oran *Klebsiella spp* de % 26 *Escherichia coli* kökenlerinde ise %25 olarak saptandı. Hastane kaynaklılarla toplum kaynaklı kökenler arasında olgu sayısı az olmasına rağmen anlamlı bir fark (p<0.05) vardı. Toplum kaynaklı kökenlerde de azda olsa GSβL üretimine rastlandı.

Anahtar sözcükler: *Enterobacteriaceae*, Genişlemiş Spektrumlu β Laktamaz

Investigation of Extended Spectrum Beta- Laktamase Activity of *Enterobacteriaceae* Strains by Using Two Different Methods

SUMMARY

Sporadic nosocomial infections caused by certain strains that produce ESBL can be related with serious complications in several institutions. Particularly, in that centers where anti-beta lactam antibiotics are widely utilized, it is usually observed that these bacteria colonize respiratory and/or gastrointestinal tract of the patients. In this study, hospital and community acquired 239 *Enterobacteriaceae* strains were isolated using Sceptor (BD USA) panels. The ESBL producing was studied by double disc synergy and E test (AB Biodisk Sweden) methods. There was no significant difference between the both methods. The both methods revealed 22% positivity of ESBL for *Enterobacteriaceae* isolated from hospital acquired cases. This ratio was detected 26% for *Klebsiella* and 25% for *E. coli* strains. Although, the numbers of cases were rather low, there was significant difference between nosocomial and community acquired strains for ESBL producing. Although low, ESBL producing were also observed among community acquired cases.

Key words: *Enterobacteriaceae*, extended spectrum beta-lactamases

Bu makalenin ön çalışması 3-8 Ekim 1999 tarihinde Antalya'da yapılan Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresinde bildiri olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Tüm beta-laktam antibiyotikler, bakterilerin sitoplazmik membranları üzerindeki penisilin bağlayıcı protein (PBP)'lere bağlanıp peptidoglikan sentezinin inhibisyonuna ve

hücre duvar yapısının bozulmasına yol açarak etkilerini gösterirler. Buna karşın bakteriler, beta-laktamaz enzimleri sentezleyip antibiyotiklerin beta-laktam halkalarını parçalayarak, PBP'lerin

yapısında değişiklik yapıp antibiyotiklerin bağlanmasını engelleyerek ve Gram-negatif bakterilerde bunlara ilave olarak dışmembranlarında bulunan ve antibiyotiklerin geçtiği kanalları (porin) daraltarak veya sayılarını azaltarak direnç geliştirirler. Beta-laktam antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının amid bağlarını parçalayarak bu antibiyotikleri etkisiz hale getiren beta-laktamazlar, bakteriler tarafından kromozomlar, plazmid ya da transpozon adı verilen transfer edilebilir genetik elemanlar aracılığı ile sentez edilirler. TEM ve SHV tipi enzimler yapılarındaki bir veya birkaç amino asit değişikliği ile etki spektrumlarını çok genişletip 3. kuşak sefalosporinleri ve aztreonamı da parçalayabilir. Bu özelliğe sahip enzimlere ESBL adı verilmiştir. Halen 30'a yakın ESBL tanımlanmış olup, yeni enzimlerle bu sayı sürekli olarak artmaktadır. Bu nedenle ESBL üreten suşlarla oluşan infeksiyonların tedavisi için beta-laktam seçiminde çok dikkatli olunmalıdır. Son zamanlarda TEM ve SHV kökenli olmayan yeni plazmid kaynaklı ESBL'ler de tanımlanmıştır. Bu yeni enzimler sefamisinler de dahil bütün sefalosporinlere karşı etkilidirler (1).

ESBL'ler genellikle beta-laktamaz inhibitörleri ile hidrolize edilebilirler ve bu enzimler karbapenemlere (imipenem, meropenem), sefamisinlere (sefoksitin, moksalaktam) ve temosiline etkili değildir. ESBL üreten bakteriler rutin duyarlılık deneylerinde sefotaksim, seftriakson, seftazidim ve/veya aztreonama direnç görülmesi ile belirlenebilir. Ancak bazen ESBL oluşturan kökenlerle yapılan duyarlılık deneylerinde bu antibiyotiklere direnç saptanamaz ve bu durum da klinikte tedavi başarısızlıklarına yol açar (2).

Ticari olarak da GSβL tanısı için üretilmiş iki hazır ürün bulunmaktadır. Bunlar Vitek GSβL test (BioMerieux Fransa) ve GSβL screening Etest (AB Biodisk - İsveç) dir. Her iki test de sabit miktardaki klavulanik asit varlığında ceftazidim minimal inhibitör konsantrasyonundaki azalmayı baz almışlardır. Bu çalışmada hem klasik yöntem, hem de bir hazır ticari yöntem kullanılarak bölgemizde izole ettiğimiz *Enterobacteriaceae* kökenlerinin GSβL oluşturma oranları araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kasım 1998 - Nisan 2002 tarihleri arasında İzzet Baysal Bolu Devlet Hastanesi

polikliniklerinde tedavi gören ya da hospitalize edilen 239 *Enterobacteriaceae* kökeni klasik yöntemlerle izole edildikten sonra Sceptor (Becton Dickinson ABD) panellerinde tanımlanmıştır. Hastaneye yattıktan 72 saat ve daha sonra örnek alınan hastalardan izole edilen kökenler nozokomiyal olarak diğer örneklerden izole edilenler de toplum kaynaklı olarak gruplandırılmıştır. Aynı hastadan değişik zamanlarda alınan kökenler çalışma dışı tutulmuşlardır.

Çift disk sinerji testi için amoksisilin-klavulanik asit (20/10µg) ve seftazidim (30µg) diskleri (Oxoid - Birleşik Krallık), E-test için de GSβL screening E-test (AB Biodisk - İsveç) stripleri kullanılmıştır. Duyarlılık testleri için NCCLS kriterlerine uygun olarak bir gece Brain heart İnfüzyon agara pasajlanan kökenler türbidometrik olarak (Crystalspec - Becton Dickinson ABD) McFarland 0.5'e ayarlanarak Mueller Hinton agarlara ekilmiş, kuruması için 10 dakika beklendikten sonra diskler ve E-testler uygulanmış ve bir gece inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir(3). E-testte seftazidim minimal inhibitör konsantrasyonunda azalma olmayan kökenler ¼'e kadar seyreltilerek değerlendirilmiştir.

Hastane kaynaklı kabul edilen örneklerle toplum kaynaklı örneklerin ve her iki duyarlılık yönteminin birbirleri ile karşılaştırmasında t-test yöntemi kullanılmıştır.

BULGULAR

Duyarlılık testi için kullandığımız her iki yöntemde de yatan hastalardan elde edilen *Enterobacteriaceae* kökenlerinin % 22'sinin GSβL oluşturduğunu saptadık. Bu oran *Klebsiella spp* de % 26.7 *Escherichia coli* kökenlerinde ise %25.7 olarak saptandı.

Poliklinik hastalarının toplamında Çift disk sinerji testi ile GSβL pozitifliği %5.8, E-test yönteminde ise %8.7 olarak saptanmıştır. Bu oranlar *Klebsiella spp* için her iki yöntemde de GSβL pozitifliği %9.1 olarak bulunurken *Escherichia coli* kökenlerinde Çift disk sinerji testinde %5.7, E-test yönteminde ise %11.5 olarak bulunmuştur.

Çalışmaya dahil ettiğimiz *Enterobacter*, *Proteus*, *Citrobacter* ve *Shigella spp.* kökenlerinde poliklinik hastalarında da yatan hastalarda da GSβL yapımına rastlamadık.

Poliklinik ve yatan hastalardan izole edilen kökenlerin GSβL oluşturma sıklığı her iki yöntem için **tablo I**'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Poliklinik ve yatan hastalardan izole edilen kökenlerin her iki yöntem için bakterilere göre GSβL oluşturma sıklığı

	Toplam Köken		Çift Disk Pozitif		E test Pozitif	
	P	Y	P(%)	Y(%)	P(%)	Y(%)
<i>Klebsiella</i> spp	33	45	3(9.1)	12(26.7)	3(9.1)	12(26.7)
<i>Escherichia coli</i>	52	70	3(5.7)	18(25.7)	6(11.5)	18(25.7)
<i>Enterobacter</i> spp	3	6	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>Proteus</i> spp	6	12	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>Citrobacter</i> spp	6	3	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>Shigella</i> spp	3	-	0(0)	-	0(0)	-
TOPLAM	103	136	6(5.8)	30(22)	9(8.7)	30(22)

P: Poliklinik hastası Y: yatan hasta

Kullanılan her iki yöntem arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Hastane kaynaklılarla toplum kaynaklı kökenler arasında olgu sayısı az olmasına rağmen kayda değer bir fark ($p<0.05$) olduğu gözlemlendi. Çalışmaya alınan örneklerin sonuçları daha önceden Sceptor panellerinde alınan antibiyogram sonuçlarıyla karşılaştırıldığında GSβL oluşturmayan kökenlerin daha az dirençli olduğu görüldü.

TARTIŞMA

GSBL üreten suşlarla gelişen sporadik nozokomiyal salgınlar bazı hastanelerde ciddi sorunlara neden olmaktadır. Özellikle çok sık beta-laktam antibiyotik kullanımının olduğu hastane ortamının selektif baskısı altında tedavi gören hastaların solunum ya da sindirim sistemlerinde bu enzimleri üreten bakteri kolonizasyonları görülmektedir. Ülkemizde GSBL üreten suşlar çeşitli merkezlerde incelenmiş *Escherichia coli*'nin ve *Klebsiella* cinslerinin en çok GSBL üreten bakteriler olduğu gözlenmiştir (4).

Cormican ve ark. (5) GSβL tespiti için E-test screening yönteminin en duyarlı yöntemlerden birisi olduğunu bildirmişler, Bradford ve ark. (6) çift disk sinerji testinde enzim spesifikliğinden ötürü en iyi substratın seftazidim olduğunu bildirmişlerdir.

Ülkemizde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda *K.pneumoniae* kökenlerinde %11.4 - 79, *Enterobacter*'lerde %16.6 - 61.4, *E coli* kökenlerinde ise %1.8 - 26.19 oranında GSβL pozitifliği tespit edilmiştir (7-14).

Fincancı ve ark. (7) İstanbul'da yaptıkları çalışmada GSβL oranını *E coli*'de %11, *K. pneumoniae* kökenlerinde %79 olarak tespit etmişlerdir. Ayakta ve yatan hasta izolatlarında GSβL pozitifliği açısından fark olmadığını belirtmişlerdir.

Zer ve ark. (8) Gaziantep'te yaptıkları çalışmada *Klebsiella pneumoniae* için GSβL oranını % 46.34, *Escherichia coli* için %26.19, *Enterobacter aerogenes* için %41.3, *Enterobacter cloacae* için %20 olarak tespit etmişlerdir.

Hazar ve ark. (9) Adana'da idrar yolu infeksiyonundan soyutlanan Gram negatif bakterilerden yaptıkları çalışmada GSβL oranını *Escherichia coli*'de %6.67, *K. pneumoniae* kökenlerinde %18.18 olarak belirtmişlerdir.

Özsoy ve ark. (10) İstanbul'da yaptıkları çalışmada GSβL oranını *Klebsiella* kökenlerinde %29, *Escherichia coli*'de %8.7 olarak bulmuşlardır.

Yıldız ve ark.'larının (12) Eskişehir'de yaptıkları bir çalışmada GSβL pozitifliğini *Klebsiella pneumoniae* için % 39, *Escherichia coli* için %12.5, *Enterobacter spp.* için %16.6, *Klebsiella oxytoca* için % 21.4 olarak bildirmişlerdir. GSβL pozitifliğini hastane içi izolatlarda, poliklinik hastalarından 4 kat daha fazla bulmuşlardır.

Ankara'da Gül ve ark.'larının (13) yaptığı çalışmada ÇDS testi ile GSβL pozitifliğini *Klebsiella* kökenleri için % 11.4, *Escherichia coli* için %1.8 olarak bulmuşlardır. ÇDS testinde pozitif GSβL oluşturduğu saptanan kökenlerin tamamı E-test ile pozitif ve yatan hastalarda GSβL pozitifliği daha yüksek bulunmuştur.

Abacıoğlu ve ark.'larının (14) İzmir'de yaptıkları çalışmada 24 *Klebsiella* kökeninde ÇDS testi ile 15'inde, E-test ile 12'sinde GSβL pozitifliği saptamışlardır. Setazidim, seftaksim ve aztreonam disklerinin birlikte kullanıldığı ÇDS testinin uygulanabileceğini belirtmektedirler.

Dünyada yapılan benzer çalışmaların sonuçları da daha önce değindiğimiz nedenlerden dolayı aynı şekilde büyük farklılıklar göstermektedir.

Uygunsuz antibiyotik kullanımı beraberinde hastane dışı kökenlerde de GSβL oluşumunu getirmekte ve konunun önemini daha ciddi boyutlara taşımaktadır.

Bu durumda sonuçların korelasyonundan çok kullanılan yöntemlerin duyarlılığı ve manipülasyon hatalarının ortadan kaldırılması sağlıklı istatistiksel sonuçlar verebilmek açısından büyük önem arz etmektedir.

Bizim çalışmamızla da uyumlu olarak dünyada yapılan çalışmaların çoğu gerekli prosedürlere uyulduğu sürece Vitek ve E-test

gibi gelişmiş yöntemlerle çift disk sinerji yöntemi arasında büyük korelasyon farklarının olmadığı ve kültür yapılan her hastanenin kendilerine en uygun yöntemi seçerek gerekli vakalarda GSβL tayinini rutin testler arasına almasının doğru olacağını düşünmekteyiz.

Yazışma adresi: Dr. M. Teyfik YAVUZ,
AİBÜ, Düzce Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Konuralp 81620 DÜZCE
e-posta: tyavuz@superonline.com

KAYNAKLAR

1. Akyıldız R, Özsoy MF, Altunay H, Koçak N, Çavuşoğlu Ş, Yenen OŞ: Klebsiella pneumoniae suşlarında genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı ve beta-laktam antibiyotik direncinin araştırılması. KLİMİK Derg. 11(2):53-58, 1998.
2. Hoşgör M, Özkan F, Yapar N, Tünger A, Özinel MA: Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazların belirlenmesinde çift diskli sinerji testi ile üç boyutlu yöntemin karşılaştırılması. KLİMİK Derg. 11(2):59-60, 1998.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A3. Villanova, Pa, 1993.
4. Ersoy Y, Fırat M, Şerfhanoglu K, Özerol İH, Bilişik G, Dinç But A: Hastane kökenli Escherichia coli ve Klebsiella spp. suşlarında iki farklı yöntemle genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin belirlenmesi. ANKEM Derg. 17(4):418-421, 2003.
5. Cormican MG, Marshall SA, Jones RN: Detection of extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. J.Clin.Microbiol. 34(8):1880-1884, 1996.
6. Bradford PA, Sanders CC: Development of test panel of β-lactamases expressed in a common Escherichia coli host background for evaluation of new β-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 39:308-313, 1995.
7. Fincancı M, Ulutürk R, Eren G, Konuksal C, Soysal F, Sander S, Boztaş Z: Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca ve Escherichia coli kökenlerinde genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazların araştırılmasında kullanılan çeşitli yöntemlerin karşılaştırılması. İnfek Derg. 17(1):55-60, 2003.
8. Zer Y, Bayram A, Orhan G, Çeliksöz C, Korkmaz G, Balcı İ: Hastanede yatan hastalardan izole edilen Gram negatif çomaklarda genişletilmiş spektrumlu betalaktamazların ve çeşitli antibiyotiklere duyarlılığın araştırılması. Anadolu Tıp Dergisi. 4(2):71-75, 2002.
9. Hazar S, Yaman A, Akan E: İdrar yolu infeksiyonlarından soyutlanan bakterilerde genişletilmiş spektrumlu beta laktamazların çift disk sinerji yöntemiyle saptanması. Gülhane Tıp Dergisi. 44(2):121-124, 2002.
10. Özsoy MF, Pahsa A, Yıldırım A, Erdemoğlu A, Emekdaş G, Öncül O: Klebsiella ve Escherichia coli suşlarında beta-laktam antibiyotiklere direnç ve "genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz" sıklığı. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 31(1-2):46-53, 2001.
11. Aktaş AE, Altoparlak Şahin Ü, Yiğit N, Doğruman Al F, Tuncel E: Gram-negatif bakterilerde genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazların çift disk sinerji ve E-test yöntemleri ile araştırılması. İnfek Derg. 15(3):325-328, 2001.
12. Yıldız Ü, Durmaz G, Us T, Akgün Y: Geniş spektrumlu beta-laktamaz salgılayan enterik bakterilerin meropenem, imipenem, sefodizim ve sefepim duyarlılıkları. İnfek Derg. 14(3):373-377, 2000.
13. Bahar Ülkar ÜG, Tülek N, Mert A: Gram-olumsuz basillerde genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz saptanmasında çift disk sinerji ve e-test yöntemleri. İnfek Derg 13(3):385-390, 1999.
14. Abacıoğlu YH, Yücesoy M, Gülay Z, Yuluğ N: "Extended spectrum beta-lactamases" saptanmasında E testi ile çift disk sinerji yöntemlerinin karşılaştırılması. İnfek Derg 9(1-2):93-95, 1995.