

Hastane İnfeksiyonu Etkeni Çeşitli Gram-Negatif Bakterilerde Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Yapımının İki Yöntemle Araştırılması

Füsun Zeynep Akçam, İbak Gönen, Onur Kaya, Güler Yaylı

Özet: Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve hastane infeksiyonu etkeni olarak tanımlanan 135 Gram-negatif bakteride (83 *Escherichia coli*, 40 *Klebsiella* spp., 12 *Proteus* spp.) genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) yapımı, çift disk sinerji testi (ÇDST) ve E-test® yöntemleriyle araştırılmıştır. ÇDST ile *E.coli* kökenlerinin 6 (%7.2)'sında, *Klebsiella* kökenlerinin 14 (%35)'ünde; E-test® ile *E.coli* kökenlerinin 7 (%8.4)'sinde, *Klebsiella* kökenlerinin 15 (%37,5)'inde GSBL üretimi saptanmıştır. *Proteus* kökenlerinde ise ne ÇDST ile ne de E-test® yöntemi ile GSBL pozitifliği saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Hastane infeksiyonu, Enterobacteriaceae, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz.

Summary: The determination of extended-spectrum beta-lactamase production in various Gram-negative agents responsible for nosocomial infections with two methods. In this study, the production of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) was determined in 135 Gram-negative bacteria (83 *Escherichia coli*, 40 *Klebsiella* spp., 12 *Proteus* spp.) isolated from various patients with nosocomial infections. The determinations were made with double disk synergy test (DDST) and E-test®. The ESBL production was positive in 6 (7.2%) of *E.coli* and in 14 (35%) of *Klebsiella* spp. with DDST; in 7 (8.4%) of *E.coli* and in 15 (37.5%) of *Klebsiella* spp. with E-test®. The ESBL production was not positive in any *Proteus* spp. with both tests.

Key Words: Nosocomial infection, Enterobacteriaceae, extended-spectrum beta-lactamase.

Giriş

Son yıllarda antibiyotiklere karşı giderek artan direnç sorunu tüm dünyayı tehdit eder hale gelmiştir. Beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hale getiren beta-laktamaz enzimi üretimi, başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından birisidir. Bugüne kadar 350'ye yakın beta-laktamaz enzimi tanımlanmıştır. Bunların yaklaşık 150 tanesi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) olup plazmidik özellikleri nedeniyle bakteriler arasında transfer edilebilirler (1,2). GSBL'ler, Gram-negatif çomaklarda bulunan, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama karşı dirençten sorumlu olan enzimlerdir (3). Özellikle *Klebsiella* türleri ve *Escherichia coli* başta olmak üzere, GSBL üretimi ve patojen bakteriler arasında hızla yayılması son yıllarda ciddi sorunlar oluşturmaktadır (4). GSBL üreten kökenlerle infeksiyon riski; uzun süre hastanede yatış, yoğun bakım ünitesinde bulunma, idrar, venöz vb. kateter uygulamaları gibi çeşitli girişimler ve geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotik kullanımı gibi bazı faktörlerle artmaktadır (5). Hastane infeksiyonu etkeni olarak sıklıkları artmakta ve genellikle çoklu ilaç direncine sahip olduklarından tedavide güçlüklerle karşılaşmaktadır (6,7).

GSBL üreten kökenlerin saptanmasında değişik yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler çift disk sinerji testi (ÇDST), E-test ve üç boyutlu testtir (8,9). Gerek E-test gerekse ÇDST,

GSBL üretimini saptamada kolay ve uygulanabilir yöntemlerdir. En sık kullanılan yöntem ise, günlük uygulamaya yatkın ve üzerinde en fazla araştırmalar yapılmış olan ÇDST olup bu yöntemde beta-laktam ve beta-laktamaz inhibitörleri arasında sinerji varlığı araştırılır (10,11).

GSBL üreten kökenlerin penisilinler, sefalosporinler ve aztreonama dirençli oldukları halde rutin antibiyogramda duyarlı bulunabilmeleri ve bu antibiyotiklerin kullanıldığı tedavilerde sorunlarla karşılaşılması nedeniyle, bu enzim üretiminin gösterilmesinin gerekli olduğu bildirilmektedir (12).

Bu çalışmada, hastanemizdeki, hastane infeksiyonu etkeni olarak saptanan *Enterobacteriaceae* üyesi Gram-negatif çomaklarda GSBL sıklığı, ÇDST ve E-test® yöntemleriyle gösterilmeye çalışılmıştır.

Yöntemler

Bakteriler: Klinik Bakteriyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Laboratuvarında, 2001 yılı içerisinde çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve hastane infeksiyonu etkeni olarak tanımlanmış *Enterobacteriaceae* üyeleri arasından, 83 *E.coli*, 40 *Klebsiella* spp. ve 12 *Proteus* spp. çalışmaya alınmıştır. Grup sayısı 10'un altında olan bakteriler çalışılmamıştır. Çalışmada, ilk izolasyonlarında klasik mikrobiyolojik yöntemlerle isimlendirilip saklanan bakterilerin 24-48 saatlik pasajları kullanılmıştır.

ÇDST: Bu yöntemde 0.5 McFarland standardı bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonları, 9 cm çapındaki Petri kutularında 4 mm kalınlıkta olacak şekilde hazırlanmış Mueller-Hinton besiyerlerine eküvyonla ekildi. Plağın merkezine

Tablo 1. Hastane İnfeksiyonu Etkeni Gram-Negatif Çomaklarda GSBL Varlığı

Bakteri	ÇDST				E-Test®			
	GSBL(+)		GSBL(-)		GSBL(+)		GSBL(-)	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)
<i>E. coli</i>	6	(7.2)	77	(92.8)	7	(8.4)	76	(91.6)
<i>Klebsiella</i> spp.	14	(35)	26	(65)	15	(37.5)	25	(62.5)
<i>Proteus</i> spp.	0	(0)	12	(100)	0	(0)	12	(100)
Toplam	20	(14.8)	115	(85.2)	22	(16.3)	113	(83.7)

amoksisilin-klavulanik asid (AMC) 20/10 g (Oxoid) diski, her iki yanına da AMC diskiye 25 mm uzaklıklarda olacak şekilde 30 g'lık seftazidim (CAZ) (Oxoid) ve aztreonam (ATM) (Oxoid) diskleri yerleştirildi. 36 C°'de 24 saatlik inkübasyondan sonra Petri kutuları incelendi. ATM ve CAZ disklerinin AMC diskiye bakan yönünde belirgin genişleme olması veya diskler arasındaki bölgede bir inhibisyon alanının gözlenmesi GSBL pozitifliği olarak kabul edildi (11,13).

E-test® yöntemi: Ticari olarak hazırlanmış bir ucunda seftazidim ve diğer ucunda seftazidim-klavulanik asit bulunan E-test® şeritleri (AB Biodisk, Solna, İsveç) kullanıldı. 0.5 McFarland standardı bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonları, 9 cm çaplı Petri kutularında 4 mm kalınlıkta hazırlanmış Mueller-Hinton besiyerine eküvyonla ekildi. 36 C°'de 24 saatlik inkübasyondan sonra inhibisyon zonu ile E-test® şeritinin keşiştiği noktadaki değer okunarak bakterilerin minimum inhibitör konsantrasyon (MIC)'ları saptandı. Seftazidim MIC değerinin, seftazidim-klavulanik asid MIC değerinden en az 8 kat fazla olması GSBL pozitifliği olarak kabul edildi (13).

İstatistik değerlendirme: E-test® ve ÇDST arasındaki farklılığın belirlenmesinde ² testi kullanıldı.

Sonuçlar

Hastanemizde 2001 yılı içerisinde çeşitli klinik örneklerden hastane infeksiyonu etkeni olarak soyutlanan toplam 135 *Enterobacteriaceae* üyesi Gram-negatif çomakta GSBL varlığı ÇDST ve E-test® yöntemleriyle araştırıldı. Çalışmaya alınan *E.coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında GSBL varlığı ÇDST sonuçlarına göre sırasıyla; %7.2 ile %35.0, E-test® sonuçlarına göre ise %8.4 ile %37.5 olarak saptandı. *Proteus* spp.'de ise her iki yöntem ile de GSBL varlığı gösterilemedi (Tablo 1). GSBL-pozitif kökenlerin 20 (%77.0) tanesi idrardan izole edildi. Diğer klinik örneklerden (kan, cerrahi yara, beyin-omurilik sıvısı, trakeal aspirat, periton sıvısı) ise birer tane GSBL-pozitif köken soyutlandı. İki yöntem arasında GSBL saptama oranı açısından anlamlı bir fark görülmedi (p>0.5).

İrdeleme

Hastanemiz sürveyans sonuçlarına göre, *Enterobacteriaceae* üyelerinden *E.coli* ve *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*'dan sonra en sık Gram-negatif hastane infeksiyonu etkenleri arasında yer almaktadır (14,15). Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de özellikle GSBL salgılayan *Enterobacteriaceae* üyelerinin etken olduğu infeksiyonlar artış göstermektedir.

GSBL'ler *E. coli*, *Proteus*, *Salmonella*, *Enterobacter* ve hemen diğer tüm enterik bakterilerde tanımlanmış olmasına rağmen sıklıkla *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinde bulunmaktadır (16,17). Türkiye'de yapılan iki ayrı çalışmada hastane kaynaklı *K. pneumoniae* ve *E. coli* kökenlerinde GSBL pozitifliği sırasıyla %55.5 ve %15.5 (18) ile %45.0 ve %32.0 (19) olarak

saptanmıştır. E-test® ve ÇDST yöntemlerinin karşılaştırıldığı bazı çalışmalarda ise Abacıoğlu ve arkadaşları (20) *K. pneumoniae*'de E-test® ile %50.0, ÇDST ile %62.0; Aktaş ve arkadaşları (21), *Klebsiella* spp. kökenlerinde E-test® ile %58.3, ÇDST ile %41.6 ve *E. coli* kökenlerinde E-test® ile %15.3, ÇDST ile %19.2 oranlarında GSBL pozitifliği saptamışlardır. Bu çalışmada da diğer çalışmalarla benzer şekilde *Klebsiella* kökenlerinde GSBL yapımının daha fazla olduğu görülmüştür. Aktaş ve arkadaşları (21) bu çalışmada olduğu gibi *Proteus* spp. suşlarında GSBL pozitifliği saptamazken, Şahin ve arkadaşları (22) 22 *Proteus* suşunun 3'ünde (%13.6) GSBL pozitifliği saptamışlardır. Yurt dışında yapılan çeşitli çalışmalarda da GSBL sıklığı, *Klebsiella* kökenlerinde %13.0 ile %86.6, *E. coli* kökenlerinde %11.0 ile %63.6 oranları arasında rapor edilmiştir (23-25). Gerek ülkemizde gerekse yurtdışındaki oranlarda görülen farklılıklar, bakterilerdeki GSBL üretim sıklığının belli şartlarla değişiyor olması ile ilgilidir. Toplam olarak değerlendirildiğinde hastanemizde, GSBL sıklığı ÇDST ile %14.8, E-test® ile %16.3 olarak bulunmuştur. Sonuçlarımızda, hastanemiz Yoğun Bakım Ünitesi'nin İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalımız ile uyumlu çalışmasının olumlu etkisi olduğu görüşüdeyiz.

GSBL saptama yöntemleri arasında en sık kullanılan yöntemler, ÇDST ve E-test® yöntemleridir. Üç boyutlu test ise gerek uygulama zorluğu gerekse duyarlılık ve özgüllüğünün klasik yöntemlere göre üstünlüğünün olmaması nedeniyle rutin uygulamada pek tercih edilen bir yöntem değildir. Yapılan değişik çalışmalarda GSBL üretimini saptamada E-test® ve ÇDST yöntemleri karşılaştırılmış ve anlamlı bir fark bulunmamıştır (20,21). Bu çalışmada da iki yöntem arasında GSBL saptama oranı açısından anlamlı bir fark bulunamadı.

Değişik ülkelerde ve merkezlerde yapılan çalışmalar beta-laktam antibiyotiklere direncin artmakta olduğunu ve bunun dünya çapında bir sorun olduğunu göstermektedir. Son on yılda plazmidle kodlanan GSBL'ler çok hızlı bir şekilde artmıştır. Bu artışın geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotik kullanımıyla yakın ilişkili olduğu bilinmektedir (26). Halen bu suşların çoğu beta-laktamaz inhibitörlü kombinasyonlarla tedavi edilebilmektedir. Ancak bu kombinasyonlarla tedavi edilemeyen suşların sayısı da giderek artmaktadır (1). Ayrıca GSBL üreten suşlar değişik mekanizmalarla diğer antibiyotik sınıflarına da gittikçe artan oranda direnç geliştirmekte olup, eğer önlem alınmazsa gelecekteki antibiyotik seçeneklerimizin son derece kısıtlanacağı öngörülmektedir (8).

Sonuç olarak, her zaman yeterli derecede uygulanamayan rasyonel antibiyotik tedavisi için ısrarcı olunması gerektiğini bir kez daha hatırlatmak istiyoruz.

Kaynaklar

- Bradford PA. Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century. Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:933-51
- Bush K. New beta-lactamases in gram negative bacteria. Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1085-9
- Steward CD, Rasheed JK, Hubert SK, et al. Characterization of clinical isolates of Klebsiella pneumoniae from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum -lactamase detection methods. *J Clin Microbiol* 2001; 39(8):2864-72
- Sanders CC, Sanders WE Jr. Beta-lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 824-39
- Gür D. Beta-laktamazlar. *Flora* 1997; 3(Suppl 1): 1-16
- Bermudes H, Arpin C, Jude F, El-Harrif Z, Bebear C, Quantin C. Molecular epidemiology of an outbreak due to extended spectrum beta-lactamase producing enterobacteria in a French hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 523-9
- Procop GW, Tuohy MJ, Wilson DA, Williams D, Hadziyannis E, Hall GS. Cross-class resistance to non beta-lactam antimicrobials in extended spectrum beta-lactamase producing Klebsiella pneumoniae. *Am J Clin Pathol* 2003; 120(2): 265-7
- Bal Ç. Beta-laktamazlar: güncel durum. *Flora* 2003; 8(2):111-23
- Sanders CC, Thomson KS, Bradford PA. Problems with detection of beta-lactam resistance among nonfastidious gram-negative bacilli. *Infect Dis Clin North Am* 1993; 7:411-23
- Gill VJ, Fedorko DP, Witebsky FG. The clinician and microbiology laboratory. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000: 184-221
- Livermore DM, Brown DF. Detection of beta-lactamase mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48(Suppl 1):59-64
- Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:557-84
- Gür D, Bal Ç, Söyletir G (çevirenler). *Antibiyotik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları*. Onikinci Bilgi Eki. NCCLS Dokümanı M100-S12. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2002
- Akçam Z, Tan G, Duran A. SDÜ Tıp Fakültesi hastane infeksiyonları 2001 yılı sürveyans sonuçları [Özet]. In: *Hastane İnfeksiyonları Kongresi 2002* (11-14 Nisan 2002, Ankara) *Kongre Kitabı*. Ankara: Hastane İnfeksiyonları Derneği, 2002: 82
- Yaylı G, Gürdal H, Duran A, Tan G. SDÜ Tıp Fakültesi Hastanesinde 1998-2000 yılları arasında görülen hastane infeksiyonları [Özet]. In: *Hastane İnfeksiyonları Kongresi 2002* (11-14 Nisan 2002, Ankara) *Kongre Kitabı*. Ankara: Hastane İnfeksiyonları Derneği, 2002: 81-2
- Bush K. Is it important to identify extended spectrum beta-lactamase producing isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 361-4
- Coudron PE, Moland S, Sander CC. Occurrence and detection of extended-spectrum -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae at a Veterans Medical Center: seek and you may find. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2593-6
- Leblebicioğlu H, Nas Y, Eroglu C, Sunbul M, Esen S, Gunaydin M. Detection of extended spectrum beta-lactamases in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. *J Chemother* 1999; 11:103-6
- Geyik MF, Kökoğlu ÖF, Uçmak H, Çelen MK, Hoşoğlu S, Ayaz C. Hastane kaynaklı gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar. *İnfeks Derg* 2002; 16(2): 175-8
- Abacıoğlu YH, Yücesoy M, Gülay Z, Yuluğ N. 'Extended spectrum beta-lactamases' saptanmasında E-test ile çift disk sinerji yöntemlerinin karşılaştırılması. *İnfeks Derg* 1995; 9: 93-7
- Aktaş H, Şahin Ü, Yiğit N, Al F, Tuncel E. Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların çift disk sinerji ve E-test yöntemleri ile araştırılması. *İnfeks Derg* 2001; 15(3): 325-8
- Şahin İ, Kaya D, Öksüz Ç, Okay A, Şencan İ, Öztürk E. Klinik örneklerden izole edilen gram negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı ve antibiyotik duyarlılığı. *İnfeks Derg* 2003; 17(1): 45-8
- Jain A, Roy I, Gupta MK, Kumar M, Agarwal SK. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase producing gram-negative bacteria in septicemic neonates in tertiary care hospital. *J Med Microbiol* 2003; 52(5): 421-5
- Tzelepi E, Magana CH, Platsouka E, Safianou D, Paniara O, Legakis NJ, Vatopoukos AC, Tzouveleki LS. Extended-spectrum beta-lactamase types in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in two Greek hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21(3): 285-8
- Ho PL, Tsang DN, Que TL, Ho M, Yuen KY. Comparison of screening methods for detection extended spectrum beta-lactamases and their prevalence among Escherichia coli and Klebsiella species in Hong Kong. *APMIS* 2000; 108:237-40
- Rice L. Extended spectrum -lactamase: evolution and clinical importance. *Chest* 2001; 119: 391-6