

KAN KÜLTÜRÜ ÖRNEKLERİNDE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ ÜRETEK ENTERİK BASİLLERİN PREVALANSI VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF THE PREVALENCE AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE PRODUCING ENTERIC BACILLI IN BLOOD CULTURE SPECIMENS

Ahmet KIZIRGİL

Yusuf YAKUPOĞULLARI

Feray Ferda ŞENOL

Zülal AŞÇI TORAMAN

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

Anahtar Sözcükler: Enterik basil, GSBL, *in vitro* antibiyotik duyarlılığı, kan kültürü, çift disk sinerji yöntemi, E test

Keywords: Enteric bacilli, ESBL, *in vitro* antibiotic susceptibility, blood culture, double disk synergy test, E test

Geliş: 12 Ocak 2004

Kabul: 21 Ekim 2004

ÖZET

Bu çalışmada, kan kültürlerinden soyutlanan enterik basillerin genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretme sıklığı ve GSBL üreten mikro-organizmaların antibiyotik duyarlılıklarının saptanması amaçlandı. Enterik basillerin GSBL üretimi çift disk sinerji ve E-test yöntemi, antibiyotik duyarlılıkları ise E-test yöntemi ile araştırıldı. İncelenen 7856 kan kültürü örneğinden 166 enterik basil soyutlandı ve bunların %35'inin GSBL ürettiği belirlendi. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları; meropenem %100, isepamisin %91, amikasin %89, siprofloksasin %64, piperasilin-tazobaktam %50, trimetoprim-sulfametoksazol %36 ve amoksisilin-klavulanik asit %19 olarak saptandı. Kan kültürü örneklerinden soyutlanan enterik basillerin GSBL üretim sıklığının yüksek olduğu ve bu suşlara karşı en etkili antibiyotiğin meropenem olduğu gözlemlendi.

SUMMARY

The purpose of this study was to determine the prevalence of ESBL production in enteric bacilli isolated from blood culture specimens and to determine antibiotic susceptibilities of ESBL producing microorganisms. The production of ESBL was determined with double disk synergy test and E-test method and the antibiotic susceptibilities of ESBL producing organisms were investigated with E-test. The study included 166 enteric bacilli isolated from 7856 blood culture samples. Of the enteric bacilli 35 % were ESBL producers. The antibiotic susceptibilities of the ESBL producing organisms were found as 100% for meropenem, 91% for isepamicin, 89% for amikacin, 64% for ciprofloxacin, 50% for piperacillin-tazobactam, 36% for trimetoprim-sulfomethoxazole and 19% for amoxycillin-clavulanic acid. The results indicate that the ESBL production of enteric bacilli isolated from blood samples is markedly high and meropenem is the most active agent against ESBL producing organisms.

GİRİŞ

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL), enterik basillerde önemli bir direnç mekanizması olarak 1980'li yılların başında ortaya çıkmıştır. Enzimin kaynağı *Klebsiella pneumoniae* olmakla beraber, *Escherichia coli*

ve *Enterobacteriaceae* ailesinin diğer üyeleri değişen oranlarda enzim üretmektedir (1). Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimleri klasik TEM ve SHV tipi beta-laktamazların mutant formları olmakla birlikte, orijinal enzimlerin aksine, sefamisinler dışındaki tüm sefalo-

sporinleri, aztreonamı ve diğer tüm penisilinleri hidrolize ederler (2). Bu nedenle, GSBL üreten bakterilerin etken olduğu hayatı tehdit eden infeksiyonların tedavisinde, duyarlılık deneylerinde etkili bulunsalar dahi, adı geçen antibiyotiklerin kullanılması önerilmemektedir (3).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten suşlar, sıklıkla yapılarında beta-laktam halkası içermeyen antibiyotiklere de dirençlidirler (4). Antimikrobiyal ilaçlara karşı geniş bir direnç spektrumuna neden olan GSBL üretimi, hem tedavide kullanılabilecek antibiyotiklerin sayısını sınırlamakta hem de bu ilaçların etkilerinin azalmasına neden olmaktadır (4, 5). Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten bakterilerin etken olduğu infeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek en etkili antibiyotik karbapenemlerdir (5). Bu durum, aşırı ve uygunsuz karbapenem kullanımına neden olarak tedavi maliyetlerini yükseltmekte ve karbapeneme dirençli bakterilerin ortaya çıkışını hızlandırmaktadır (6). Dolayısıyla, karbapenemlere alternatif olabilecek daha ucuz ve kolay kullanımlı antibiyotiklere gereksinim duyulmaktadır. Bu amaçla kullanılabilecek antibiyotikler arasında aminoglikozitler, kinolonlar ve folat yolu inhibitörleri yer almaktadır (7).

Bu çalışmada, Fırat Üniversitesi Fırat Tıp Merkezi'nde, kan kültürlerinden soyutlanan enterik basillerin GSBL sıklığının ve GSBL üreten bakterilere karşı bazı antibiyotiklerin *in vitro* etkilerinin saptanması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakteriler: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda, 1 Ocak 2001-31 Aralık 2002 tarihleri arasında, kan kültürlerinden soyutlanan Gram-negatif çomaklar çalışmaya alındı. Kan örnekleri BACTEC 9120 (Becton-Dickinson) ve Bact-Alert (Organon Teknika) otomatize kan kültürü sistemi şişelerine alınarak sistem içerisinde inkübe edildi. Üreme saptanan şişelerden pasajlar yapıldı. Üreyen bakteriler, standart bakteriyolojik yöntemler ve API ID32E (bio-Mérieux) kitleri kullanılarak tanımlandı. Bir hastadan birden çok kez soyutlanan suşlardan sadece bir tanesi çalışmaya alındı.

Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz saptanması: Kan kültürlerinden soyutlanan enterik basillerin GSBL üretimi NCCLS (3) önerileri doğrultusunda çift disk sinerji yöntemi ile araştırıldı. Steril serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonu, Mueller-Hinton Agar yüzeyine yayıldı. Ortada amoksisilin/klavulanik asit (AMC) diski ve çevresinde,

merkezler arası uzaklık 25 mm olacak şekilde seftazidim, sefotaksim ve aztreonam diskleri (Oxoid) yerleştirildi. 35° C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra, çevredeki üç antibiyotik diskinin en az birinden ortadaki AMC diski-ne doğru açılan sinerjistik alanın varlığı, GSBL pozitifliği olarak kabul edildi. Çift disk sinerji yöntemi ile tipik GSBL bulgusu saptanmayan ancak, geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli bulunan suşların GSBL üretimi, E-test (AB Bio-Disk) yöntemi ile araştırıldı.

Antibiyotik duyarlılık testi: Kan kültürlerinden soyutlanan ve GSBL ürettiği saptanan suşların antibiyotik duyarlılıkları E-test (AB Bio-Disk) yöntemi ile araştırıldı. Steril serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton agar yüzeyine yayıldıktan sonra meropenem, isepamisin, amikasin, siprofloksasin, piperasilin-tazobaktam, trimetoprim-sulfametoksazol ve amoksisilin-klavulanik asit E-test şeritleri yerleştirildi. 35° C'de 18-24 saatlik inkübasyonu takiben E-test şeritleri etrafında oluşan inhibisyon elipsinin E-test şeridi ile kesiştiği noktalar antibiyotikğin minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak değerlendirildi. Duyarlılık deneyinde kalite kontrol suşu olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanıldı. Duyarlılık kriterleri olarak üretici firma önerileri ve NCCLS (3) kriterleri kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma boyunca incelenen 7856 kan örneğinden, 166 enterik basil soyutlandı ve bu suşların 58'inde (%35) GSBL üretimi saptandı. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten suşların dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir.

Kan kültürlerinden en sık soyutlanan enterik bakterinin %47.5 oranı ile *E. coli* olduğu gözlenirken, en sık GSBL üretimi *Klebsiella* türlerinde gözlemlendi. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretim sıklığı *K. pneumoniae* suşlarında %61, *K. oxytoca* suşlarında %42 olarak belirlendi. *Citrobacter* ve *Proteus* türlerinde GSBL üretimi saptanmadı.

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten enterik bakterilerin test edilen antibiyotikler için saptanan MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ile duyarlılık oranları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten enterik basillerin tümü meropeneme duyarlı bulunmasına karşın bu suşların %19'unda (11/58) meropenem MİK değerlerinin duyarlılık için bildirilen üst sınıra yakın olduğu gözlemlendi.

Tablo 1. Kan kültürlerinden izole edilen enterik basillerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimi

Bakteri Adı	Suş sayısı	GSBL üretimi	
		Sayı	%
<i>E. coli</i>	79	20	25
<i>K. pneumoniae</i>	46	28	61
<i>Enterobacter spp</i>	16	4	25
<i>K. oxytoca</i>	12	5	42
<i>Citrobacter spp</i>	8	-	-
<i>Proteus spp</i>	4	-	-
<i>Serratia spp</i>	1	1	100
Toplam	166	58	35

Tablo 2. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten bakterilerin çeşitli antibiyotikler için MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ve duyarlılık oranları

Antibiyotik	MİK (µg/ml)			Duyarlılık (%)
	MİK aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	
Meropenem	0.125 - 4	0.75	2	100
İsepamisin	0.125 - 64	2	16	91
Amikasin	0.125 - 128	3	16	89
Siprofloksasin	0.125 - 32	1	24	64
Piperasilin-tazobaktam	0.125 - 256	16	256	50
Ko-trimoksazol	0.125 - 32	12	32	36
Amoksisilin-klavulanat	2 - 256	64	256	19

TARTIŞMA

İlk bulunuşundan günümüze kadar birçok GSBL enzimi tanımlanmıştır. Bu süreçte, enzimlerin türleri ve sıklığındaki artış dikkat çekicidir. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten bakteriler, hastane ortamının seçici baskısı ile yatan hastaların solunum ve gastro-intestinal sistemlerinde kolonize olmaktadır (8). Özellikle üçüncü kuşak sefalosporinler başta olmak üzere, yoğun ve uygunsuz antibiyotik kullanımı, GSBL üreten bakteriler ile oluşan infeksiyonların sıklığını artırmaktadır (9). Antibiyotik tedavisinin başarısını olumsuz etkileyen GSBL üretimi, mortalite, morbidite, hastanede yatış süresi ve tedavi maliyetlerinde artışa neden olmaktadır (5, 9).

Türkiye’de, hastane izolatlarında GSBL sıklığı merkezler arasında farklılıklar göstermekte ve çeşitli çalışmalardan %45-80 arasında değişen oranlar bildirilmektedir (10-12). Batı Avrupa ülkelerinde yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Klebsiella* suşlarında GSBL üretim sıklığının %25 dolaylarında olduğu bildirilmektedir (13). Avrupa kökenli çok merkezli bir çalışmada, yoğun bakım kökenli *K. pneumoniae*

suşlarında GSBL üretim sıklığının Portekiz’de %49, Belçika’da %31, Fransa’da %24, İtalya’da %17, Almanya’da %9 ve Türkiye’de %59 olduğu bildirilmiştir (14). Bu çalışmada, kan kültürlerinden soyutlanan *K. pneumoniae* suşlarının GSBL üretme sıklığı %61 olarak saptanmıştır.

Karbapenemler, GSBL üreten bakterilere karşı kullanılacak en etkili antibiyotik olma özelliklerini halen devam ettirmektedirler. Sunulan çalışmada kan kültürlerinden izole edilen enterik bakterilerde meropenem duyarlılığı %100 olarak saptanmıştır. Ancak hayatı tehdit edici infeksiyonlar dışında, GSBL üreten suşların etken olduğu tüm infeksiyonlarda karbapenem kullanımı önerilmekte; üriner sistem infeksiyonlarında *in vitro* olarak duyarlı bulunan sefalosporinler, kinolonlar ve ko-trimoksazolün kullanılabileceği bildirilmektedir (15). Ayrıca, piperasilin-tazobaktam kombinasyonu, GSBL üreten bakterilerin etken olduğu endokardit ve meninjit gibi ciddi infeksiyonların sağaltımında başarılı bulunmuştur (16). Babini ve Livermore (13), beş yıllık süreçte GSBL üreten kökenlerin antibiyotik duyarlılıklarının değişimini izlemiş ve piperasilin-tazobaktam direncinin iki kat, kinolon direncinin ise yaklaşık üç-dört kat arttığını; meropenem’e karşı direnç gelişmediğini, ancak %1 oranında yüksek MİK değerli meropenem (2-4 µg/ml) duyarlılığının ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada, yüksek MİK değerli meropenem duyarlılığı %19 (11/58) olarak saptanmıştır. Meropeneme karşı yüksek MİK duyarlılığı olan suşların, diğer antibiyotiklere de genellikle dirençli veya yüksek MİK düzeylerinde duyarlılık gösterdiği izlenmiştir. Bu çalışmada, GSBL üreten suşların %31’i (18/58) test edilen tüm antibiyotiklere duyarlı bulunmuş, sadece meropeneme duyarlı suş oranı ise %5 (3/58) olarak saptanmıştır.

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten bakterilerle oluşan infeksiyonların tedavisinde aminoglikozit ve kinolon grubu antibiyotiklerin kullanılabileceği bildirilmektedir (7). Ancak diğer suşlarla karşılaştırıldığında, GSBL üreten bakterilerde aminoglikozit ve kinolon direncinin 10 ila 20 kat fazla olduğu ve bu suşlarda siprofloksasin direncinin %15-80 arasında değiştiği bildirilmiştir (17-19). Sunulan çalışmada, GSBL üreten bakterilerde amikasin ve isepamisin için %89 ve %91 duyarlılık oranları bulunmuş; siprofloksasin duyarlılığının ise %64 olduğu saptanmıştır. Siprofloksasine dirençli suşlarda çoklu direnç gözlenmiş; siprofloksasine dirençli suşların %29’unun (6/21) en az bir aminoglikozit antibiyotiğe, %76’sının (16/21) piperasilin-tazobaktam’a ve tümünün amoksisilin-klavulanat ve ko-trimoksazole karşı dirençli olduğu saptanmıştır.

Yazarların çalıştığı merkezde, kan kültürlerinden soyutlanan enterik basillerin GSBL üretim sıklığı yüksek bulunmuş ve GSBL üreten suşlara karşı en etkili antibiyotiğin meropenem olduğu saptanmıştır. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığının azaltabilmesi ve bu suşlarla olu-

şan infeksiyonların başarı ile tedavi edilebilmesi için; infeksiyon kontrol önlemlerinin artırılması, antibiyotik kullanımının düzenlenmesi ve laboratuvar yöntemlerinin direnç eğilimlerini izleyebilecek şekilde güncellenmesi gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Mayer KH, Opal SM, Medeiros AA. Mechanisms of antibiotic resistance. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone, 1995: 212-25.
2. Livermore DM. Detection of beta-lactamase mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48 (Suppl 1): 59-64.
3. NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Tenth Informational Supplement. NCCLS document M100-s10. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2000.
4. Özsoy MF, Öncül O, Yıldırım A, Pahsa A. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar: klinik önemi ve getirdiği sorunlar. *Flora* 2001; 6 (Ek 1): 3-23.
5. Patterson JE. Antibiotic utilization. Is there an effect on antimicrobial resistance. *Chest* 2001; 2 (Suppl): 426-30.
6. Rahal JJ. Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial klebsiella. *JAMA* 1998; 280: 1233-7.
7. Gültekin M, Ögünç D, Günseren F, Çolak D, Kırbaş İ, Mamikoğlu L. Hastane infeksiyonu etkeni *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* suşlarının genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve antibiyotik duyarlılık özelliklerinin araştırılması. *İnfek Derg* 1999; 13: 515-20.
8. Quinn JP. Clinical significance of extended spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13 (Suppl 1): 39-42.
9. Kim NB, Woo JH, Kim MN, Ryu J, Kim YS. Clinical implications of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. *J Hosp Infect* 2002; 52: 99-106.
10. Demirdağ K, Kizirgil A, Özden M, Kalkan A, Felek S, Toraman ZA. Hastane ve toplum kökenli *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığının araştırılması. *ANKEM Derg* 2001; 15: 748-52.
11. Gulay Z, Thomson CJ, Yuluğ N, Amyes SG. High prevalence of ESBL among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at an university hospital in Turkey. *J Chemother* 2000; 12: 145-52.
12. Durmaz R, Durmaz B, Koroglu M, Tekerekoglu MS. Detection and typing of extended-spectrum beta-lactamases in a clinical isolates of family *Enterobacteriaceae* in a medical center in Turkey. *Microb Drug Resist* 2001; 7: 171-5.
13. Babini GS, Livermore DM. Antimicrobial resistance among *Klebsiella* spp collected from intensive care unites in Southern and Western Europe in 1997-98. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 183-9.
14. Livermore DM, Yuan M. Antibiotic resistance and production of ESBL among *Klebsiella* spp. from intensive care units in Europe. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38: 409.
15. Peterson DL, Ko WC, Gottberg AV, et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2001; 6: 2206-12.
16. Leleu G, Kitzis MD, Vallois JM, Gutman L, Decazes JM. Different ratios of the piperacillin-tazobactam combination for the treatment of experimental meningitis due to *Klebsiella pneumoniae* producing the TEM-3 extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 195-9.
17. Sekowska A, Janicka J, Klyszejko C, Wojda M, Wroblewski M, Szymankiewicz M. Resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains producing and not producing ESBL type enzymes to selected non-beta-lactam antibiotics. *Med Sci Monit* 2002; 3: 100-4.
18. Spanu T, Luzzaro F, Perilli M, et al. Occurrence of ESBLs in members of the family *Enterobacteriaceae* in Italy: implications for resistance to beta-lactams and other antimicrobial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 196-202.
19. Jan IS, Hsueh PR, Teng LJ, HO SW, Luh KT. Antimicrobial susceptibility testing for *Klebsiella pneumoniae* isolates resistant to extended spectrum beta-lactam antibiotics. *J Formos Med Assoc* 1998; 97: 661-6.

İLETİŞİM

Yrd. Doç. Dr. Ahmet KIZIRGIL
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
23119 ELAZIĞ
e-posta: akizirgil@firat.edu.tr
ahmetkizirgil@hotmail.com