

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN GRAM-NEGATİF ÇOMAKLARDA GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ SIKLIĞI VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞI

THE FREQUENCY OF EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY IN CLINICAL ISOLATES OF GRAM-NEGATIVE BACILLI

İdris ŞAHİN¹ Demet KAYA¹ Şükrü ÖKSÜZ¹ Aynur OKAY¹
İrfan ŞENCAN² Elif ÖZTÜRK¹

Abant İzzet Baysal Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesi , Düzce

¹ Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

² Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı

Anahtar Sözcükler: Gram-negatif basiller, genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar, çift disk sinerji testi, *in vitro* antibiyotik duyarlılığı, disk difüzyon yöntemi

Key Words: Gram-negative bacilli, extended spectrum beta lactamases, double disk synergy test, *in vitro* antibiotic susceptibility, disk diffusion method

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, Gram-negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) varlığını araştırmak ve GSBL içeren çomaklarda antibiyotik duyarlılığını saptamak idi. Klinik örneklerden izole edilen toplam 222 Gram-negatif çomakta GSBL varlığı çift disk sinerji testi ile araştırılmıştır. Çalışmaya alınan *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında GSBL varlığı sırası ile %19.4, %15.9, %13.7, %26.7, %16.7 olarak saptanmıştır. GSBL pozitif saptanan suşların 16 (%38)'sı poliklinik, 26 (%62)'sı servis kökeni olarak belirlenmiştir. GSBL varlığı açısından servis ve poliklinik hastalarından izole edilen suşlar arasında anlamlı fark gözlenmiştir ($p=0.012$). GSBL pozitifliği saptanan kökenlerde imipenem, gentamisin, amikasin, siprofloksasin, ve sefepim duyarlılığı sırasıyla %95.3, %78.5, %97.6, %80.9, %92.8 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak; nozokomiya infeksiyonlardan izole edilen Gram-negatif bakterilerde GSBL varlığının rutin olarak değerlendirilmesi gerekir. GSBL pozitif kökenlerde karbapenem, amikasin ve sefepiminin en etkili antibiyotikler olarak görülmüştür.

SUMMARY

The purpose of the present study was to determine the presence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) in clinical isolates of Gram-negative bacilli and also the *in vitro* antibiotic susceptibility of the strains found to carry ESBL. Totally 222 clinical isolates were screened with double disk synergy test. ESBL production was positive in *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* isolates as 19.4%, 15.9%, 13.7%, 26.7%, 16.7%, respectively. Of the ESBL producing isolates 16 (38%) were isolated from outpatients and 26 (62%) from hospitalised patients. The difference between these groups was significant ($p=0.012$). The susceptibility to imipenem, gentamycin, amikacin, ciprofloxacin and cefepime were 95.3%, 78.5%, 97.6%, 80.9% and 92.8%, respectively, among the ESBL producing isolates. It is suggested that ESBL must be evaluated routinely in Gram-negative bacilli isolated from nosocomial infections. Carbapenem, amikacin and cefepim were found as the most effective antibiotics against ESBL producing isolates.

GİRİŞ

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL)'lar çoğunlukla Bush sınıf A'da bulunan plazmit aracılı beta-laktamazlardır. Günümüze kadar sadece Gram-negatif basillerde tanımlanmıştır. Bu enzimler penisilinleri, dar spektrumlu sefalosporinleri ve pek çok genişletilmiş spektrumlu sefalosporinleri, sefotaksim ve seftazidim gibi oksimino grubu içeren sefalosporinleri ve monobaktam (aztreonam)'ları etkili şekilde hidrolize edebilmektedir. Beta-laktamaz inhibitörleri (klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam) genellikle GSBL üreten suşları inhibe etmektedir. Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazların çoğu TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 mutantlarıdır. Halen sefamisin veya karbapenem (imipenem, meropenem)'leri hidrolize edebilen türleri tanımlanmamıştır. Günümüzde TEM 3-69, SHV 2-24 olmak üzere 90 kadar GSBL bulunmaktadır. En çok GSBL üreten mikro-organizmalar *Enterobacteriaceae* familyasındadır ve hemen hemen tüm üyelerinde tanımlanmaktadır (1, 2).

Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazların varlığını belirlemede çeşitli yöntemler önerilmiştir. Bunlardan başlıcaları; çift disk sinerji testi, üç boyutlu test, E test ve otomatize Vitek sistemidir. Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazların saptanmasında çift disk sinerji testi tüm laboratuvarlarda uygulanabilen kolay bir test olarak öne çıkmaktadır. Antibiyogramda disk dizilimi gözetilerek amoksisilin+klavulanik asit (AMC) diskinin etrafına merkezden merkeze uzaklık 2 cm olacak şekilde aztreonam (ATM) veya üçüncü jenerasyon sefalosporinlerden biri (özellikle seftazidim) yerleştirildiğinde, bu antibiyotik disklerine ait inhibisyon zonlarının amoksisilin+klavulanik asit yönünde genişleme göstermesi veya diskler arasındaki bölgede bir inhibisyon alanının gözlenmesi GSBL varlığına işarettir. Uygulama kolaylığına karşın bu testin duyarlılığı yüzde yüz değildir ve diskler arası uzaklığın standardizasyonu bulunmadığı için yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir (3, 4).

Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen çeşitli Gram-negatif çomakların *in vitro* antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi, GSBL varlığı ve suşların hastane ve poli-

linik kaynaklı olup olmasının GSBL pozitifliğine etkisinin saptanması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Abant İzzet Baysal Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 1 Ocak- 1 Haziran 2001 döneminde gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 222 Gram-negatif çomak çalışma kapsamına alınmıştır.

Gram-negatif çomaklarda GSBL varlığı çift disk sinerji testi ile araştırılmıştır. Çalışmada amoksisilin+klavulanik asit (AMC), seftazidim, sefotaksim, aztreonam, sefoksitin, seftriakson diskleri kullanılmıştır.

Mc Farland 0.5 eşeline göre ayarlanmış bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton agar yüzeyine yayılarak AMC disk besiyerinin merkezine yerleştirilmiştir. AMC diskinin etrafına 25 mm uzaklıkta olacak şekilde yerleştirilen seftriakson, seftazidim ve sefotaksim disklerindeki inhibisyon zon çapının AMC yönünde genişlemesi izolatların GSBL oluşturabileceği yönünde değerlendirilmiştir (5, 6).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz pozitif ve negatif suşların imipenem, gentamisin, amikasin, siprofloksasin duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile NCCLS kriterlerine uygun olarak saptanmıştır.

BULGULAR

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 222 Gram-negatif çomakta GSBL varlığı çift disk sinerji testi ile araştırıldı. Çalışmaya alınan *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa* suşlarında GSBL varlığı sırası ile %19.4, %15.9, %13.7, %26.7, %16.7 olarak saptandı (Tablo 1). Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz pozitif saptanan suşların 16 (%38)'sı poliklinik, 26 (%62)'sı ise klinikte yatan hasta kökenleri idi. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığı açısından klinik ve poliklinik suşları arasında istatistiksel açıdan fark gözlemlendi ($p=0.012$). Sonuçlar, Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Çeşitli Gram-negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığının dağılımı

Bakteri	Poliklinik		Servis		Toplam	
	Sayı	GSBL (%)	Sayı	GSBL (%)	Sayı	GSBL (%)
<i>E. coli</i>	64	8 (12.5)	44	13 (29.5)	108	21 (19.4)
<i>Klebsiella</i> spp.	26	3 (11.5)	18	4 (22.2)	44	7 (15.9)
<i>Enterobacter</i> spp.	10	2 (20.0)	20	6 (30.0)	30	8 (26.7)
<i>Proteus</i> spp.	17	2 (11.7)	5	1 (20.0)	22	3 (13.6)
<i>P. aeruginosa</i>	11	1 (9.1)	7	2 (28.5)	18	3 (16.7)

Tablo 2. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) pozitif ve negatif saptanan kökenlerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları

		İPM Sayı (%)	GN Sayı (%)	AN Sayı (%)	CİP Sayı (%)	FEP Sayı (%)
GSBL - pozitif	Duyarlı	40 (95.3)	33 (78.5)	41 (97.6)	34 (80.9)	39 (92.8)
	Dirençli	2 (4.7)	9 (21.5)	1 (2.4)	8 (19.1)	3 (7.2)
GSBL - negatif	Duyarlı	176 (97.7)	154 (85.5)	169 (93.8)	165 (91.6)	176 (97.8)
	Dirençli	4 (2.3)	26 (14.5)	11 (6.2)	15 (8.4)	4 (2.2)

İPM: İmipenem, GN: Gentamisin, AN: Amikasin, CİP: Siprofloksasin, FEP: Sefepim

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz negatif kökenlerin imipenem, gentamisin, amikasin, siprofloksasin ve sefepim duyarlılıkları sırasıyla %97.7, %85.5, %93.8, %91.6, %97.8 olarak saptanmıştır. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz pozitif kökenlerin duyarlılıkları ise sırasıyla %95.3, %78.5, %97.6, %80.9 ve %92.8 olarak bulunmuştur. Sonuçlar, Tablo 2'de özetlenmiştir.

TARTIŞMA

Tüm dünyada olduğu gibi, Türkiye'de de son yıllarda GSBL salgılayan *Enterobacteriaceae* üyelerinin etken olduğu infeksiyonlar artış göstermektedir. Özellikle tedavisi güç hastane infeksiyonlarına neden olan *K. pneumoniae* suşlarında GSBL salgılaması ile ilişkili olarak birçok antibiyotiğe çoğul direnç saptanmaktadır. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten bakteriler geniş spektrumlu sefalosporinlere ve aztreonama dirençli oldukları halde rutin duyarlılık testlerinde duyarlı olarak bulunabilmektedir (2).

Bölgeye, ülkeye, hastaneye göre *Enterobacteriaceae* içinde GSBL üreten bakteri topluluklarının oranı <%1-%74 arasında değişmektedir (7). Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz başta *K. pneumoniae* olmak üzere *E. coli* ve diğer *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerde de bulunmaktadır (1). Amerika Birleşik Devletleri'nde 1990-1993 yılları arasında Quinn (8)'nin 400 hastanenin yoğun bakım ünitelerinde yaptığı bir çalışmada, GSBL üreten *Klebsiella* türlerinin oranında %3.6'dan %14.4'e bir artış gözlenmiştir. 1995'te Avrupa'da yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Klebsiella* türlerinin %20-25'inde GSBL varlığı saptanırken Fransa'da bu oran %30-40 olarak bulunmuştur (2). Ho ve ark. (9) *E. coli* kökenlerinin %11'inde, *Klebsiella* kökenlerinin ise %13'ünde GSBL saptamışlardır. Pai (10) Kore'de *E. coli* kökenlerinin %4.8-7.5'inde ve *K. pneumoniae* kökenlerinin ise %22.5-22.8'inde GSBL pozitifliği bildirmiştir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda; Esen ve ark. (11) hastane kaynaklı *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında GSBL pozitifliğini sırasıyla %12.9 ve %32.5 oranlarında bulmuşlardır. Gürdoğan ve ark. (12) poliklinik izolatu *E. coli*'lerde GSBL'yi %7.8, servis kökenlerinde ise %9 olarak bulmuşlardır. Eroğlu ve ark. (13) toplumsal kaynaklı *E. coli*'lerde GSBL'yi %9.3, hastane kaynaklı

E. coli'lerde ise %21.3 olarak saptamışlardır. Çalışmada poliklinik kaynaklı *E. coli*'lerde GSBL pozitifliği %12.5, hastane kaynaklı olanlarda ise %29.5 olarak belirlendi. Poliklinik ve hastane kaynaklı *Klebsiella* türlerinde GSBL pozitifliği oranları ise sırasıyla %11.5 ve %22.2 olarak saptandı. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz pozitifliği açısından servis ve poliklinik izolatları arasındaki fark anlamlı bulundu ($p=0.012$).

Escherichia coli ve *Klebsiella* türleri dışında diğer *Enterobacteriaceae* ailesinde GSBL varlığı ile ilgili yapılan çalışmalarda Durmaz ve ark. (14) *Enterobacter* türlerinde GSBL pozitifliğini %4.9, Kaleli ve ark. (15) ise %22.2 olarak belirlemişlerdir. Aktaş ve ark. (16) *P. aeruginosa*'da GSBL pozitifliğini %9 olarak saptamışlardır. De Champs ve ark. (17) *Proteus mirabilis* izolatlarının %6.9'unda GSBL pozitifliği belirlemişlerdir. Bu çalışmada poliklinik ve servis kaynaklı *Enterobacter* türlerinde GSBL pozitifliği sırasıyla %20 ve %30 olarak bulunurken, *Proteus* türlerinde aynı oranlar sırasıyla %11.7 ve %20, *P. aeruginosa*'da ise %9.1 ve %28.5 olarak bulunmuştur. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz pozitifliğinin *E. coli* ve *Klebsiella* türleri dışında diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde yüksek bulunması nedeniyle; bu familyanın özellikle de hastane kökenlerinin GSBL yönünden rutin olarak değerlendirilmesinin uygun olacağını düşündürmektedir.

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz salgılayan kökenlerin sefotaksim, seftriakson, seftazidim, aztreonam ve geniş spektrumlu penisilinlere dirençli olabilmesi nedeniyle tedavide alternatif seçeneklerin önemi artmaktadır. Çalışmada; GSBL pozitif ve negatif kökenlerde sefepim, imipenem, siprofloksasin, gentamisin, amikasin duyarlılığı disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz pozitif kökenlerin duyarlılığı sırası ile %92.8, %95.3, %80.9, %78.5, %97.6 olarak bulunmuştur. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz negatif kökenlerin duyarlılığı ise sırası ile %97.8, %97.7, %91.6, %85.5, %93.8 olarak saptanmıştır. Gülay ve ark. (18) GSBL pozitif izolatlarda imipenem, gentamisin, siprofloksasin duyarlılığını %100, %100, %64 olarak bulmuşlardır. Gürdoğan ve ark. (12) GSBL pozitif hastane dışı *E. coli* kökenlerinde ofloksasin, imipenem, amikasin, sefepim

duyarlılığını sırasıyla %100, %100, %86, %71.5; hastane kökenli *E. coli*lerde ise sırasıyla %56.5, %100, %62.5, %37.5 olarak saptamışlardır.

Sonuç olarak; GSBL üreten suşların çift disk sinerji testi gibi rutinde uygulanması kolay olan bir yöntemle saptanması gerekir. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz pozitif

bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde alternatif olarak kullanılan sefepim, imipenem, amikasin, gentamisin ve siprofloksasinin bu suşlara karşı tedavide etkili olarak kullanılabilmesi ancak, siprofloksasine GSBL pozitif suşlarda artan oranda direnç olması nedeniyle, ampirik tedavide bu antibiyotik kullanılmaması gerektiği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. **Gülay Z, Sümerkan B.** Antibiyotik direnci: Mekanizma fenotip ilişkisi ve bildirimi. 5. *Antimikrobik Kemoterapi Günleri (1-3 Nisan 2002, İstanbul Program ve Özet Kitabı*'nda. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, **2002**: 43-67.
2. **Livmore DM.** Beta lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* **1995**; 8: 557-84.
3. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Ninth Informational Supplement, MS 100. Wayne, Pa: NCCLS, **1999**.
4. **Bal Ç.** Beta laktamaz testleri ve rutinde kullanımları. *Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı (11-12 Nisan 1997)*'da. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No. 33. İstanbul: Turgut Yayıncılık ve Ticaret AŞ, **1998**: 101-11.
5. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test Approved Standard*, M2-A6. Sixth ed. Villanova, Pa: NCCLS, **1997**.
6. **Swenson JM, Hindler JA, Petterson LR.** Special tests for detecting antibacterial resistance. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM Press, **1995**: 1356.
7. **Sanders CC, Thomson KS, Bradford PA.** Problem with detection of beta lactam resistance among nonfastidious Gram negative bacilli. *Infect Dis Clin North Am* **1993**; 7: 411.
8. **Quinn JP.** Clinical strategies for serious infection: A North American perspective. *Diag Microbiol Infect Dis* **1998**; 31: 389-95.
9. **Ho PL, Tsang DN, Que TL, Ho M, Yuen KY.** Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum beta lactamases and their prevalence among *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in Hong Kong. *APMIS* **2000**; 108: 237-40.
10. **Pai H.** The characteristics of extended-spectrum beta lactamases in Korean isolates of Enterobacteriaceae. *Yonsei Med J* **1998**; 39: 514-9.
11. **Esen Ş, Eroğlu C, Sünbül M, Leblebicioğlu H.** *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında TEM ve SHV türü beta-laktamaz sıklığı. *Mikrobiyol Bül* **2001**; 35: 37-43.
12. **Gürdoğan K, Arslan H, Nazlier S.** Hastane kökenli ve hastane dışı *E. coli*lerde genişlemiş spektrumlu beta laktamaz araştırılması ve izolatlara çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları. VIII. *Türk Mikrobiyoloji Kongresi (4-9 Ekim 1998, Antalya) Program ve Özet Kitabı*'nda. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, **1998**: Poster No. 12-233.
13. **Eroğlu C, Günaydın M, Birinci A, Esen Ş, Sünbül M, Leblebicioğlu H.** İdrardan izole edilen *E. coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta laktamazların saptanması. XXVIII. *Türk Mikrobiyoloji Kongresi (4-9 Ekim 1998, Antalya) Program ve Özet Kitabı*'nda. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, **1998**: Poster No. 12-234.
14. **Durmaz R, Durmaz B, Köroğlu N, Tekeroğlu MS.** Detection and typing of extended spectrum beta-lactamases in clinical isolates of the family Enterobacteriaceae in a medical center in Turkey. *Microb Drug Resist* **2001**; 7:171-5.
15. **Kaleli İ, Özen N, Şengül M, Cevahir N, Akşit F.** Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta laktamazların çift disk sinerji yöntemiyle belirlenmesi. 8. *Türk Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (6-10 Ekim 1997, Antalya) Program ve Özet Kitabı*'nda. İstanbul: KLİMİK Derneği, **1997**: 718.
16. **Aktaş AE, Al FD, Şahin ÜA, Yiğit N, Ayyıldız A.** Non fermentatif Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu ve kromozomal beta laktamaz varlığının araştırılması. XXIX. *Türk Mikrobiyoloji Kongresi (8-13 Ekim 2000, Antalya) Program ve Özet Kitabı*'nda. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, **2000**: 384.
17. **De Champs C, Bonnet R, Sirot D, Chanal C, Sirot J.** Clinical relevance of *Proteus mirabilis* in hospital patients: A two year survey. *J Antimicrob Chemother* **2000**; 45: 537-9.
18. **Gülay Z, Atay T, Esen N, Biçmen M, Çetintepe L, Ocak B, Yuluğ N.** Genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz üreten *Klebsiella pneumoniae* suşlarının moleküler epidemiyolojisi. XXIX. *Türk Mikrobiyoloji Kongresi (8-13 Ekim 2000, Antalya) Program ve Özet Kitabı*'nda. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, **2000**: 396.