

AKUT BAKIM GEREKTİREN HASTALARDA GELİŞEN İNFEKSİYONLARDAN İZOLE EDİLEN KLEBSIELLA TÜRLERİNDE ANTIBAKTERİYEL DUYARLILIK PATERNLERİNİN VE GENİŞ-SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Ayşegül ESKİTÜRK¹, Volkan KORTEN², Güner SÖYLETİR¹

ÖZET

Akut bakım ünitelerinde izlenen hastalardan izole edilen 46 *Klebsiella* suşunun 14 antibiyotik veya beta-laktam+beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonuna duyarlılıklarını E-test yöntemi ile saptanmıştır. Çeşitli beta-laktam antibiyotikler ve aminoglikozidlere değişen oranlarda direnç saptanırken, ciprofloksasin ve imipeneme tüm suşlar duyarlı bulunmuştur. ESBL direnci seftazidim-klavulanat E-test stripleri ve/veya çift disk yöntemi kullanılarak araştırılmış ve bu yöntemlerden herhangi biri ile 24/46 (% 52) izolatta belirlenmiştir. Çalışmamız, bazı diğer merkezlerde de belirlendiği gibi, ülkemizde yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Klebsiella*'larda Avrupa'daki en yüksek ESBL oranına ulaşlığını göstermektedir. Üçüncü jenerasyon sefaloспорinlere duyarlı olarak bildirilmeleri tedavide önemli sakincalar doğurabileceğinden, bu suşların saptanmasında ya seftazidim, sefotaksim veya aztreonam içeren disklerin amoksisilin-klavulanatla birlikte denenmesi, ya da seftazidim fenotipi yaygın olduğundan, seftazidim/klavulanat içeren E-test striplerinin kullanılması yararlı olacaktır.

SUMMARY

Antibacterial susceptibility patterns and frequency of extended spectrum beta-lactamases in Klebsiella strains isolated from acute care patients.

Antimicrobial susceptibility patterns of 46 *Klebsiella* strains isolated from acute care patients were determined against 14 antimicrobials by E-test method. Although there was somewhat resistance to beta-lactam agents and aminoglycosides, strains were entirely susceptible to ciprofloxacin and imipenem. Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) were detected in 24 of 46 strains (52 %) by using E-test ESBL strip impregnated ceftazidime and ceftazidime/clavulanic acid and/or double disk method. Our study indicates that ESBL production of *Klebsiella* strains isolated from patients hospitalized in intensive care unit has reached the highest level in Europe. Since such isolates may appear susceptible to 3rd generation cephalosporins, ESBL production should be routinely tested by double disk or E-test method to prevent misinterpretation of antimicrobial susceptibility test results.

* 5. Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi'nde sunulmuştur (4-6 Eylül 1995, İstanbul).

1- Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Haydarpaşa, İstanbul.

2- Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı, Altunizade, İstanbul.

GİRİŞ

1980'lerin başında tanımlanan geniş spektrumlu beta-laktamazlar (ESBL), penisilinler, yeni sefalosprinler ve aztreonam gibi antibiyotiklere direnç oluşturmaktı, bu dirençli suşlar bazı beta-laktam+beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarından da etkilenmemekte ve beta-laktamlarla tedaviyi güçlendirmektedir (3). ESBL üreten suşlar tüm dünyada izole edilmekte ve özellikle Avrupa'da salgınlar neden olabilmektedir (12). Rutin duyarlılık deneylerinde bu suşlar kolaylıkla gözden kaçabilmektedir. Oysa sıklıkla *Enterobacteriaceae* ailesinde, özellikle de *Klebsiella* suşlarında rastlanan bu enzimlerin varlığının saptanması uygun tedavinin belirlenmesi yönünden büyük önem taşımaktadır (9). Bu çalışmada, hastanemiz akut bakım ünitelerinde izole edilen *Klebsiella* suşlarının çeşitli antimikrobiyalere duyarlılıklarının belirlenmesi ve ESBL sıklığının saptanmasında kullanılabilecek değişik tekniklerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ekim 1994/Temmuz 1995 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Hastanesi akut bakım ünitelerinde izlenen hastalardan izole edilen 46 *Klebsiella* suşunun antibiyotik duyarlılıkları, çeşitli antibiyotik veya beta-laktam+beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonuna karşı E-test yöntemi ile saptanmıştır. *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşları kontrol olarak kullanılmıştır. E-test (AB Biodisk, Solna, İsveç) yöntemiyle minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) belirlenmesinde iki kat artan 15 dilüsyonda antibiyotik emdirilmiş şeritler kullanılmıştır. McFarland 0.5 yoğunluğa (10^8 cfu/ml) ayarlanan bakteri süspsiyonu ektivyonla PDM-Antibiotic sensitivity medium (AB Biodisk, Solna, İsveç) içeren 150 mm'lik antibiyogram plaklarına yayılmıştır. İyice kurutulan plaklara 4-6 şerit radyal olarak dizildikten sonra bir gece 37°C'de inkübe edilmiş, inkübasyon sonra oluşan eliptik inhibisyon zonlarının şerit kenarını kestiği yerdeki antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak değerlendirilmiştir.

ESBL sıklığı tüm suşlarda çift (double) disk ve 23 suşa seftazidim-klavulanat E-test stripleri kullanılarak araştırılmıştır. E-test yönteminde seftazidim/seftazidim-klavulanat oranı $\geq 1/16$ olan (MİK değerinde 4 kat azalma) suşlar ESBL pozitif olarak kabul edilmiştir. Disk difüzyon metoduyla antimikrobial duyarlılık belirlenmesinde NCCLS'nin belirlediği kriterler kullanılmıştır (10). Çift disk metodunda Mueller-Hinton plağına amoksisilin-klavulanat diskı ortada; seftriakson, seftazidim, aztreonam, sefuroksim diskleri çevrede olacak şekilde dizilmiştir. Bir gece 37°C'de inkübasyon sonrasında disk zonları etrafında genişleme olan izolatlar ESBL pozitif olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

46 suşa E-test yöntemiyle saptanan direnç oranları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri tablo 1'de gösterilmiştir. Beta-laktamlar içinde en yüksek direnç seftazidim, sefuroksim ve aztreonama karşı saptanırken siprofloksasin ve imipeneme hiç direnç saptanmamıştır. Bir diğer önemli bulgu piperasilin-tazobaktam kombinasyonuna % 50 oranında direnç saptanmasıdır. ESBL direnci kullanılan yöntemlerden herhangi biri ile 24/46 (% 52) izolatta saptanmıştır. Disk difüzyon ve E-test sonuçları gözden geçirildiğinde (Tablo 2) bazı suşların çeşitli beta-laktamlara duyarlı gibi davranışlığı

Tablo 1. 46 Klebsiella susunun E-test ile saptanan antibiyotik duyarlılıklarını.

	CAZ	CRO	CTX	AZT	PIP	PIP-TAZ	GEN	AMIK	CIP	AMOX-CLAV	CEF	IMP
Dirençli (%)	30	13	9	33	74	50	28	0	0	4	30	0
Orta duyarlı (%)	17	11	11	13	7	0	15	0	0	35	9	0
MfK ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	4	1,5	1	8	>256	8	8	12	0,032	8	4	0,19
MfK ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)	>256	96	32	>256	>256	24	24	0,19	24	>256	0,25	
MfK sınırları ($\mu\text{g/ml}$)	0,064-	0,016-	0,016-	0,016-	3-	1-	0,25-	0,75-	0,006-	1-	1-	0,094-
	>256	>256	>256	>256	>256	>256	128	32	2	128	>256	0,75

CAZ: seftazidim, CRO: seftriakson, CTX: seftoraksin, AZT: aztreonam, PIP: piperasilin, PIP-TAZ: piperasilin-tazobaktam, GEN: gentamisin, AMIK: amikasin, CIP: siprofloksasin, AMOX-CLAV: amoksisilin-klavulanat, CEF: sefuroksim, IMP: imipenem.

Tablo 2. ESBL üreten 24 Klebsiella susunun disk difüzyon ve E-test sonuçlarının karşılaştırılması.

	CAZ	CAZ-CLAV	CTX	CEF	AZT	PIP	CIP
Disk difüzyon							
Dirençli (%)	14 (60)		9 (39)	13 (56)	22 (96)	0	0
Orta duyarlı (%)	5 (22)		11 (47)	10 (43)	1 (12)	0	0
E test							
Dirençli (%)	14 (60)	0	6 (26)	10 (43)	11 (48)	0	0
Orta duyarlı (%)	4 (17)	0	8 (34)	8 (34)	10 (43)	0	0

CAZ-CLAV: seftazidim-klavulanat, diğer kısaltmalar için tablo 1'e bakınız.

gözlenmiştir. Örneğin sefotaksime karşı suşların % 86'sı disk difüzyon ile dirençli veya orta derecede duyarlı bulunurken bu oran E-testde % 60'a kadar düşmektedir. Çift disk yönteminde kullanılan antibiyotikler açısından zon genişleme ile ESBL saptanması yönünden bir fark bulunmamakla birlikte, birçok kez uygun disk aralıklarının yeniden belirlenmesi gerekmıştır. Seftazidim-klavulanat E-test stripleri seftazidime dirençli bütün suşlarda ve 2 orta düzeyde duyarlı suşa seftazidim MİK değerlerini en az 7 kez düşürerek kolayca ESBL saptanmasına olanak vermiştir.

TARTIŞMA

ESBL prevalansı ülkelere göre değiştiği gibi, aynı ülkede farklı hastanelerde de değişik sonuçlar alınabilmektedir. *Klebsiella* suşlarında ESBL sıklığı A.B.D'de %8.6 (5), Londra'da % 11 (7), Fransa'da % 16 (13) gibi oranlarla saptanırken bu oran hastanemizde % 52'ye ulaşmaktadır.

Geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanılması ESBL üreten suşların seçilmesini artırmaktır, plazmidlerle aktarılabilen bu direnç hızla tüm hastaneyeye yayılabilmektedir (9). Rutin laboratuvarlarda kullanılan disk difüzyon testleri bu suşların tanımlanmasına olanak vermediği gibi, MİK çalışmalarıyla elde edilen sonuçlar da yanılıcı olabilmektedir (6). Bu nedenle bu suşların hızla ve doğru olarak tanımlanmasına yönelik diğer testler geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılan antibiyogram plâğının ortasına beta-laktam+beta-laktamaz inhibitörünün konmasını takiben beta-laktam antibiyotik disklerinin dairesel olarak bu diskin etrafına dizilmesi ve inkübasyon sonrası zon çaplarındaki genişlemenin izlenmesi prensibine dayanan çift disk sinerji yöntemidir (4). Thomson ve ark. (14) iki farklı konsantrasyonda bakteri yoğunluğunun kullanımla gerçekleştirenl "uç boyutlu test" adındaki yöntemle elde ettikleri sonuçların disk difüzyon sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmesi durumunda % 93 duyarlılıkla ESBL üretiminin saptanabileceğini savunmuşlardır. ESBL saptanmasında önerilen en yeni yöntem disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemlerinin modifikasyonu olan ve konsantrasyon gradientiyle emdirilmiş antimikrobiyaller içeren plastik şeritlerin kullanıldığı E-test yöntemidir. Çok yakın zamanda piyasaya sürülen 'beta-laktam+klavulanat kombinasyonunun emdirildiği şeritlerin kullanılmasıyla MİK değerinde 4 kat düşme saptanması durumunda ESBL üreten suşların % 100'ü tanımlanabilmektedir ve çalışmamızda da bu suşlarda klavulanat ilavesiyle seftazidimin MİK değerinin en az 7 kat düşüğü gözlenmiştir (1, 2). ESBL üreten suşların rutin duyarlılık testlerinde bazı beta-laktamlara dirençli iken diğer bazlarına duyarlı gibi görünümleri yanlış antibiyotik uygulamalarını ve dolayısıyla tedavi başarısızlığını beraberinde getirmektedir. Bu çalışmada da bazı *Klebsiella* suşları disk difüzyon ve E-test yöntemleriyle beta-laktamlara duyarlı bulunmuşlardır, ancak bunların ESBL üretikleri saptanmıştır.

Sonuç olarak çalışmamız, bazı diğer merkezlerde de saptandığı gibi, ülkemizde yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Klebsiella*'larda Avrupa'daki en yüksek ESBL oranına ulaşıldığını göstermektedir. Üçüncü jenerasyon sefalosporinlere duyarlı olarak bildirilmeleri tedavide önemli sakincalar doğurabilecekinden, ESBL üreten suşların saptanmasında değişik fenotipler nedeni ile ya seftazidim, sefotaksim ve aztreonam içeren disklerin klavulanatla birlikte denenmesi veya seftazidim fenotipi yaygın olduğundan pratik olarak seftazidim/klavulanat içeren E-test striplerinin kullanılması yararlı olacaktır.

Çalışmamızın en çarpıcı bulgularından biri İngiltere'de *Klebsiella* suşlarının yalnızca % 5'inde direnç saptanan piperasillin-tazobaktam kombinasyonuna karşı suşlarımızda % 50 oranında direnç gözlenmesidir (8). Bu suşlarda, beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmemekle birlikte geniş spektrumlu penisilinleri etkin bir şekilde parçalayan bir enzimin yaygın olarak yer aldığı söylenebilir. Fluorokinolonlar ve imipenemin ESBL üreten suşlar dahil tüm *Klebsiella*'lara karşı en etkin iki antibiyotik grubu olduğu gözlenmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Balström A, Karlsson A, Mills K: Detection of ESBLs using a new E test strip, 7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, p 49, Vienna (1995).
- 2- Baquero F, Canton R, Martinez Beltran J, Bolmstrom A: The E test as an epidemiologic tool, *Diagn Microbiol Infect Dis* 15: 483 (1992).
- 3- Garau J: Beta-lactamases: Current situation and clinical importance, *Intensive Care Med* 20: S5 (1994).
- 4- Jacoby G A, Archer G L: New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents, *N Eng J Med* 324: 601 (1991).
- 5- Jones R N, Kehrberg E N, Erwin M E, Anderson S C: Prevalance of important pathogens and antimicrobial activity of parenteral drugs at numerous medical centers in the United States, *Diagn Microbiol Infect Dis* 19: 203 (1994).
- 6- Katsanis G P, Spargo J, Ferraro M J, Sutton L, Jacoby G A: Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended spectrum beta-lactamases, *J Clin Microbiol* 32: 691 (1994).
- 7- Liu P Y, Gür D, Hall L M, Livermore D M: Survey of the prevalence of beta-lactamases amongst 1000 Gram negative bacilli isolated consecutively at the Royal London Hospital, *J Antimicrob Chemother* 30: 429 (1992).
- 8- Livermore D M: Evaluation of beta-lactamase inhibitors, *Intensive Care Med* 20: S10 (1994).
- 9- Meyer K S, Urban C, Eagan J, Berger B, Rahal J: Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins, *Ann Intern Med* 119: 353 (1993).
- 10- NCCLS: *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test*, 5.ed, Document M2A5, Villanova (1993).
- 11- Philippon A, Arlet G, Lagrange P H: Origin and impact of plasmid mediated extended spectrum beta-lactamases, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13: 17 (1994).
- 12- Quinn J P: Clinical significance of extended spectrum beta-lactamases, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13: 39 (1994).
- 13- Sirot DI, Goldstein FW, Saussy CJ, Husson MD: Resistance to cefotaxime and seven other beta-lactams in members of family Enterobacteriaceae: a 3 year survey in France, *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1677 (1992).
- 14- Thomson K S, Sanders C: Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three dimensional tests, *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1877 (1992).