ANKEM Derg 12 (No. 4): 442-446 (1998)

GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE GENİŞLETİLMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZLARIN ÇİFT DİSK SİNERJİ YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ*

İlknur KALELİ, Nermin ÖZEN, Mustafa ŞENGÜL, Nural CEVAHİR, Filiz AKŞİT

ÖZET

Klinik örneklerden soyutlanan 72 *Escherichia coli,* 38 *Klebsiella pneumoniae,* 18 *Enterobacter* suşunun genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz üretimi çift disk sinerji yöntemiyle incelenmiştir. Bu amaçla disk difüzyon yönteminin standartlarına uyularak suşlar Mueller-Hinton agar besiyerine yayılmış, merkeze amoksisilin-klavulanik asit diski konulmuş, çevreye ise merkezden merkeze 25 mm olacak şekilde aztreonam, sefotaksim ve seftazidim diskleri yerleştirilmiştir. Araştırılan 38 *K.pneumoniae* suşunun 18'inde (% 47), 18 *Enterobacter* spp.'nin 4'ünde (% 22) ESBL varlığı gösterilirken, *E.coli* suşlarında ESBL üretimi belirlenmemiştir. ESBL üreten suşlardan 2'si dahiliye, 4'ü pediatri, 16'sı yoğun bakım servisine aittir. Sonuç olarak yoğun bakım servisinde soyutlanan *Klebsiella* ve *Enterobacter* suşlarında ESBL üretiminin yüksek olduğu görülmüştür.

SUMMARY

Detection of extended broad spectrum beta-lactamase activity in Gram negative bacteria by using double disk synergy method.

Seventy two clinical isolates of *E.coli,* 38 isolates *of Klebsiella pneumoniae* and 18 isolates of *Enterobacter* spp. were examined for extended spectrum beta-lactamase activity. To detect this activity double disk synergy methot was applied. After inoculation of the bacteria on Mueller Hinton agar according to disk diffusion method, amoxicillin-clavulanate disk was placed at the center of the agar and the disks of aztreonam, cefotaxime and ceftazidime were placed 25 mm center to center distance from amoxicillin-clavulanate disk peripherally.

Eighteen strains of *K.pneumoniae* isolates and four of *Enterobacter* isolates have produced ESBL. None of the *E.coli* strains had this activity. Of the ESBL producing bacteria two were isolated from the ward of internal medicine, 4 from paediatrics and 16 from intensive care unit.

In conclusion, ESBL producing bacteria have been frequently isolated from the intensive care units where antibiotic usage is high.

GİRİŞ

Klinikten izole edilen Gram negatif bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere dirençlerinde en önemli mekanizma beta-laktamaz üretimidir (13). Genişletilmiş spektrumlu beta-

---

* 8. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi'nde sunulmuştur (6-10 Ekim 1997, Antalya).

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

laktamazlar (ESBL) aztreonam, sefotaksim, seftazidim gibi oksiimino beta-laktamları, penisilinleri ve sefalosporinleri hidrolize eden, plazmid aracılığı ile taşınan enzimlerdir (7,11). TEM ve SHV enzimlerindeki 1-4 aminoasit değişikliğini kapsayan mutasyon sonucu oluşurlar (2). Gram negatif bakterilerde TEM ve SHV dışında sekonder beta-laktamazlar tanımlanmıştır, ancak bunlar oldukça nadirdir (2,10).

Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz ilk olarak 1983 yılında Almanya'da tanımlanmıştır. 1980'li yılların ortasında hızla Avrupa'ya yayılmış, özellikle Fransa'da yaygın olarak görüldüğü bildirilmiştir. 1980'li yılların sonunda Amerika'da sporadik olarak görülmeye başlanmıştır. Günümüzde bütün dünyada yaygın olarak bildirilmektedir (13). Daha çok *Klebsiella* suşlarında görülmekle beraber diğer Gram negatif çomaklarda da bildirilmektedir (2,10,15).

Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar, 3. kuşak sefalosporinleri ve aztreonamı hidrolize edebilmesine rağmen sefamisinlere (sefoksitin, moksalaktam) ve karbapenemlere (imipenem, meropenem) etkisizdirler. Bu beta-laktamazların çoğu, klavulanik asit ve diğer beta-laktamaz inhibitörleriyle inaktive olurlar (10,15).

Bazı ESBL enzimleri bütün oksiimino beta-laktamlara yüksek düzeyde direnç sağlarken bir kısım enzimde bu direnç hafif düzeyde veya selektif olabilir. Bu klinikte önemli bir sorundur, çünkü bu enzimi üreten suşlar rutin antibiyogramda duyarlı görünebilir (11). Yoğun bakım ünitesinde kalma, yakın zamanda yapılan cerrahi girişim, enstrümentasyon, uzun süre hastanede kalma, geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotikleri aşırı kullanma, ESBL taşıyan bakterilerle kolonizasyon veya infeksiyon için risk faktörleridir (15).

ESBL genleri taşıyan plazmidler, aynı konak vücudundaki *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında bile kolayca nakledilebilirler (16). Dirençli suşlarla gelişen infeksiyonların tedavisinde sorun olacağından, ESBL sentezleyen suşların rutin laboratuvarda araştırılması ve klinisyene bildirilmesi gerekmektedir (16). Bu amaçla kullanılan başlıca testler, çift disk sinerji testi, üç boyutlu test, E testi, antibiyogram plağını yorumlayarak okuma, seftazidim direncine bakma, daha yüksek bakteri yoğunluğu kullanma, daha dar direnç sınırları uygulamadır (2,10,15).

Çalışmamızda çeşitli klinik örneklerden izole edilen Gram negatif bakterilerde ESBL aktivitesinin çift disk sinerji testi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında çeşitli klinik materyallerden izole edilen 72 *E.coli*, 38 *Klebsiella pneumoniae*, 18 *Enterobacter* spp. olmak üzere toplam 118 suşta ESBL üretimi çift disk sinerji yöntemi ile araştırılmıştır. Tüm suşların beta-laktam antibiyotiklere duyarlılıkları NCCLS önerilerine uygun olarak disk difüzyon yöntemi ile zon çapları ölçülerek saptanmıştır (14).

Çift disk sinerji yönteminin uygulanmasında, NCCLS kriterlerine uygun olarak, 0.5 McFarland yoğunluğunda hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton agarın yüzeyine sürülmüş, ortaya amoksisilin-klavulanik asit diski konulmuş, çevreye ise merkezden merkeze uzaklığı 25 mm olacak şekilde sefotaksim, seftazidim ve aztreonam diskleri yerleştirilmiştir. 35°C'de 18-20 saatlik inkübasyondan sonra sonuçlar değerlendirilmiştir. Sefotaksim, seftazidim ve aztreonam disklerinin herhangi birinin zorunda amoksisilin-klavulanik aside doğru genişleme olması pozitif sinerji ve ESBL pozitifliği olarak kabul edilmiştir (12).

BULGULAR

Denenen 72 *E.coli* suşunda ESBL varlığı saptanmamıştır. Otuzsekiz *K.pneumoniae* suşunun 18'inde (% 47), 18 *Enterobacter* suşunun 4'ünde (% 22) ESBL üretimi saptanmıştır.

ESBL oluşturduğu saptanan 22 suşun 2'si dahiliye (% 9), 4'ü pediatri (% 18), 16'sı yoğun bakım (% 73) ünitesinden izole edilmiştir.

ESBL üretiminin saptanmasında kullanılan beta-laktam diskleri değerlendirildiğinde aztreonam diskinin 22 suşta, seftazidim ve sefotaksim diskinin 20 suşta tanımlayıcı olduğu görülmüştür (Tablo 1).

Çalışmamızda ESBL ürettiği belirlenen 18 *K.pneumoniae* suşundan dördünün aztreonama duyarlı işareti zon verdiği belirlenmiştir. Diğer ESBL üreten suşlar aztreonama, sefotaksime ve seftazidime dirençli bulunmuştur.

Tablo 1. Çift disk sinerji yönteminde ESBL üretiminde belirleyici olan beta-laktam antibiyotikler.

	ATM+CAZ	ATM+CTX	ATM+CAZ+CTX	Toplam n	%
K. pneumoniae	2	2	14	18	47
Enterobacter spp.	0	0	4	4	22

ATM: Aztreonam, CAZ: Seftazidim, CTX: Sefotaksim.

TARTIŞMA

Bilinen TEM ve SHV türevi enzimlere dayanıklı olan geniş spektrumlu beta-laktamlar (3. kuşak sefalosporinler) 1978'de Avrupa'da, 1981'de Amerika'da klinik kullanıma girmiştir (13). Ancak bundan kısa bir süre sonra Almanya'da (1983'te) bu antibiyotiklere oldukça dirençli olan *K.pneumoniae* izolatlarında plazmidal beta-laktamaz saptanmıştır (13). Fransa'da 1985'te % 1 olan direnç oranı 1989'da % 11'e yükselmiştir. Avrupa'da yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Klebsiella* suşlarında % 20-25 oranında direnç saptanmıştır (9). Bu enzimler daha çok *K.pneumoniae*'da görülmekle birlikte *Enterobacter aerogenes, E.cloacae, Citrobacter freundii, C.koserii, E.coli, Serratia marcessens* ve *Morganella morganii* gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinde de saptanmıştır (6).

Çalışmamızda 118 Gram negatif çomak incelenmiştir. Otuz sekiz *K.pneumoniae* suşunun 18'inde (% 47), 18 *Enterobacter* suşunun 4'ünde (% 22) ESBL varlığı gösterilmiştir. Yetmişiki *E.coli* suşunun hiçbirinde ESBL saptanmamıştır. Akyıldız ve ark (3), 67 *K.pneumoniae* suşunu incelemişler, % 14.9'unda ESBL saptamışlardır. Gülay ve ark (9), farklı beta-laktamaz inhibitörü kullanarak yaptıkları çalışmada 44 *K. pneumoniae* suşunun 20'sinde, 72 *E.coli* suşunun 12'sinde ESBL varlığını göstermişlerdir. Büyükbaba ve ark (5), 37 *K.pneumoniae* suşunun 16'sında (% 43.2), 17 *Enterobacter* suşunun 3'ünde (% 17.6) ESBL üretimi saptamışlardır. Yine Akata ve ark (1), benzer şekilde *K.pneumoniae*'da % 44, *Enterobacter* spp'de % 22 oranında ESBL saptamışlardır. Evrensel ve ark (8), Kayseri'de *Klebsiella* suşlarında % 34, *Enterobacter* suşlarında % 14.28 oranında ESBL pozitifliği bildirmişlerdir.

Çalışmamızda yatan hastalardan izole edilen *E.coli* suşlarında ESBL üretimi gösterilememiştir. Benzer şekilde Büyükbaba ve ark (5) poliklinik ve yatan hastalardan, Akata ve ark (1) yatan hastalardan izole edilen *E.coli* suşlarında ESBL varlığını saptamamışlardır. Evrensel ve ark (8), yatan hastalardan izole edilen 19 *E.coli* suşunun 11'inde (% 57.8) ESBL üretimi saptandığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda 22 suşun hepsinin aztreonam ile, 20 suşun sefotaksim ve seftazidim ile ESBL oluşturduğu saptanmıştır. ESBL araştırılmasında her üç diskin de kullanılabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda ESBL oluşturduğu belirlenen 18 *K.pneumoniae* suşundan 4'ünün aztreonama duyarlı işareti zon verdiği saptanmıştır. Bu yanlış sonuçlara engel olmak için duyarlılık deneyleriyle birlikte çift disk sinerji yöntemi gibi pratik bir yöntemle ESBL direncinin de belirlenmesi gereklidir.

ESBL oluşturduğu belirlenen suşların % 73'ü yoğun bakım ünitesinden izole edilmiştir. Yoğun bakım ünitesinde geniş spektrumlu antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Yoğun antibiyotik kullanımının dirençli suşların ortaya çıkışında önemli bir rolü vardır. Belirli antibiyotiklerin yoğun olarak kullanılmasını takiben bu antibiyotiklere dirençli suşlara bağlı nozokomiyal epidemilerin oluştuğu vurgulanmıştır (15). Direnç genleri enterik bakteriler arasında kolaylıkla transfer olabilmektedir. Deneysel çalışmalar ESBL kodlayan genin kolayca *K.pneumoniae*'dan *E.coli* suşlarına geçtiğini göstermiştir (4). Direncin yoğun antibiyotik kullanımıyla indüklenebilir olması ve ortaya çıkan direncin Gram negatif çomaklar arasında kolaylıkla aktarılıyor olması, dirençli suşların izlenmesinin önemini ortaya koymaktadır. Nozokomiyal suşlar çoğu kez direnç genleri taşımaktadırlar. Hastane infeksiyonu ve direncin sorun olması nedeniyle bu beta-laktamazların da izlenmesi gereklidir (2).

Rutin antibiyogramda saptanamayan ESBL kolay, uygulanabilir bir yöntem olan çift disk sinerji yöntemi ile kolayca saptanabilmektedir. Antibiyogram plağına bu diskler özel dizilimle yerleştirilmeli ve ESBL varlığında o suş sefamisinler dışında tüm sefalosporinlere dirençli olarak bildirilmelidir.

KAYNAKLAR

1- Akata F, Otkun M, Tekcr B, Karabey O, Öğütlü A, Tuğrul M, Dündar V: Nozokomiyal Gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu ve kromozomal beta-laktamaz sıklığı, *İnfeksiyon Derg 11:* 255 (1997).

2- Akata F: Gram negatif bakterilerde beta-laktamaz tipleri ve antibiogramdan beta-laktamaz tipini tahmin etmede kullanılabilecek yöntemler, *İnfeksiyon Derg 11:* 303 (1997).

3- Akyıldız R, Altunay H, Özsoy M F, Koçak N, Çavuşlu Ş, Yenen O Ş: K. pneumoniae suşlarında çift disk sinerji testi ve üç boyutlu test ile ESBL sıklığının araştırılması, *3. Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik-Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler* (16-22 Mayıs 1997, Kuşadası), Kongre Kitabında s. 335 (1997).

4- Bush K: It is important to identify extended-spectrum beta-lactamase-producing isolates, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis 15:* 361 (1996).

5- Büyükbaba Ö, Aydın D, Anğ Ö: İdrar yolu infeksiyonu etkeni Gram negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu ß-laktamazların çift disk sinerji yöntemi ile belirlenmesi, *Klimik Derg 9:* 27 (1996).

6- Coudron PE, Moland ES, Sanders CC: Occurence and detection of extended-spectrum ß-lactamases in members of the Family Enterobacteriaceae at a Veterans Medical Center: seek and you may

find, *J Clin Microbiol 35:* 2593 (1997).

7- Emery CL, Weymouth LA: Detection and clinical significance of extended-spectrum ß-lactamases in a tertiary-care medical center, *J Clin Microbiol 35:* 2061 (1997).

8- Evrensel N, Koç AN, Sümerkan B: Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen Gram negatif basillerde genişlemiş spektrumlu ß-laktamaz saptanması, *Flora 2:* 105 (1997).

9- Gülay Z, Yüce A, Yuluğ N: Klebsiella pneumoniae ve Echerichia coli suşlarında değişik beta-laktamaz inhibitörleri kullanılarak genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin saptanması, *3. Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik-Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler* (16-22 Mayıs 1997, Kuşadası), Kongre Kitabında s. 333 (1997).

10- Gür D: ß-laktamazlar, *Flora 2:* No. 3 Eki (1997).

11- Jacoby GA. Han P: Detection of extended-spectrum ß-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli, *J Clin Microbiol 34:* 908 (1996).

12- Jarlier V, Nicolas M, Fournier G, Philippon A: Extended broad-spectrum ß-lactamases conferring transferable resistance to newer ß-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns, *Rev Infect Dis 10:*867 (1988).

13- Mayer KH, Opal SM, Medeiros AA: Mechanisms of antibiotic resistance, "Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (eds): *Principles and Practice of Infectious Diseases,* 3. ed" kitabında s. 218, Chuchill Livingstone Inc, New York (1990).

14- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standard for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests,* 5th ed, Approved Standard M2-A5, Vol 13 No: 24, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova (1993).

15- Quinn JP: Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis 13 (Suppl 1):* 39 (1994).

16- Sirot D, Champs CD, Chanal C, Labia R, Darfeuille-Michaud A, Perrous R, Sirot J: Translocation of antibiotic resistance determinants including an extended-spectrum ß-lactamase between conjugative plasmids of Klebsiella pneumoniae and Escherichica coli, *Antimicrob Agents Chemother 35:* 1576 (1991).