

HASTANE KÖKENLİ *ESCHERICHIA COLI* VE *KLEBSIELLA* spp. SUŞLARINDA İKİ FARKLI YÖNTEMLE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ ÜRETİMİNİN BELİRLENMESİ*

Yasemin ERSOY¹, Mehmet FIRAT¹, Kivanç SEREFHANOĞLU¹, İbrahim Halil ÖZEROL²,
Gülden BİLİŞİK¹, Ayşe DİNÇ BUT¹

ÖZET

Sıklıkla *Enterobacteriaceae* ailesinde rastlanan genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL), özellikle hastane kökenli suşların oluşturdukları infeksiyonların tedavisinde önemli bir problem oluşturmaktır ve rutin duyarlılık testlerinde gözden kaçabilemektedir. Bu çalışmada, çift disk sinerji (CDS) ve E-test yöntemleri karşılaştırılmıştır.

İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen 63 idrar, 21 trakeal aspirat, 18 yara ve muhtelif örneklerden hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen 85 *Escherichia coli* ve 17 *Klebsiella* spp. olmak üzere toplam 102 suş çalışmaya alınmıştır. *Klebsiella* ve *E.coli* suşlarında NCCLS kriterlerine göre CDS ve sefotaksim/sefotaksim+klavulanik asit (CT/CTL) E-test yöntemi ile GSBL üretimi araştırılmıştır. E-test yöntemi ile MİK CT/CTL ≥ 8 olması, CT inhibisyon elipsinde deformasyon oluşumu GSBL için pozitif kriterler olarak kabul edilmiştir.

Çalışılan 102 suştan 29'unda GSBL varlığı bulunmuş, CDS yöntemi ile 17 suştan, CT/CTL E-test ile 23 suştan GSBL varlığı tespit edilmiştir. Sadece 11 suş her iki yöntem ile de pozitif bulunmuştur. GSBL üreten suşların 22'si *E.coli* (22/85), 7'si *Klebsiella* spp. (7/17) idi. GSBL üreten 29 suştan 18'i florokinolonlara da dirençli olup, bunlardan biri hariç tamamı *E.coli* olarak saptanmıştır.

Çalışılan suşlarda, GSBL üretimini tesbit etmek için her iki yöntemin de tek başına yeterli olmadığı, iki testin bir arada kullanılması ile daha doğru sonuç alındığı görülmüştür.

Anahtar sözcükler: *E.coli*, *Klebsiella*, GSBL

SUMMARY

Detection of the extended spectrum beta-lactamase production with two different methods in Escherichia coli and Klebsiella spp. strains isolated from hospital infections.

Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), frequently produced by *Enterobacteriaceae*, especially lead to difficulties in the treatment of nosocomial infections and may not be detectable in the routine disk diffusion susceptibility tests. In this study, double disk synergy and E-test methods were compared to detect ESBL-producing bacteria.

A total of 102 bacteria including *Escherichia coli* (85), and *Klebsiella* spp. (17), responsible for nosocomial infections were isolated from clinical specimens of urines (63), tracheal aspirates (21), and wound and other specimens (18). ESBL production in *Klebsiella* and *E.coli* strains were tested by the double disk synergy and cefotaxime/cefotaxime plus clavulanic acid (CT/CTL) E-test methods according to the NCCLS criteria. CT/CTL MIC of ≥ 8 and occurring of disturbance in the ellipse of CT inhibition in the E-test method were accepted as positive criteria for the identification of ESBL production.

Of the 102 isolates, 29 were identified as ESBL producers. Seventeen and 23 isolates were identified as ESBL producers by the double disk synergy and CT/CTL E-test, respectively. Both methods gave positive results only for 11 isolates. Twenty two and seven of the ESBL-producing isolates were *E.coli* (22/85) and *Klebsiella* spp. (7/17), respectively. Eighteen of the 32 ESBL-producing isolates were also resistant to fluoroquinolones and except one, all of these were *E.coli* isolates.

In this study, it is thought that none of the methods was sufficient alone to identify ESBL-producing strains and when both methods were used together, the results were more reliable.

Key words: *E.coli*, *Klebsiella*, ESBL

* XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde sunulmuştur (30 Eylül - 5 Ekim 2002, Antalya).

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, 1- İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2- Tibbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.

GİRİŞ

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimi, Gram negatif bakteriler arasında özellikle *Klebsiella* ve *E.coli* suşlarında daha yaygın olarak görülen önemli bir direnç mekanizmasıdır. *Enterobacteriaceae* ailesinde görülen GSBL üretimi başlıca penisilinler, oksimino-sefalosporinler ve monobaktamlara karşı dirence yol açar (7). Bu enzimler çoğunlukla TEM ve SHV'den köken almaktadır, suşlar karbapenemler, sefoksitin, sefotetan ve çoğunlukla beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır. GSBL üretimi, rutin duyarlılık testleriyle gözden kaçabilmektedir, oysa *Enterobacteriaceae* ailesinde rastlanan bu enzimlerin varlığının saptanması uygun tedavinin belirlenmesi yönünden büyük önem taşımaktadır (6). GSBL'lerin üretiminden sorumlu olan plazmidlerin aynı zamanda diğer antimikrobiyal ajanlara direnç gen-

lerini taşıdıklarını da saptanmıştır (4). GSBL oluşturan suşların hastane infeksiyonu salgılarına yol açtığı ve taşıdıkları plazmidlerin türler arasında transfer edilebildikleri bildirilmektedir (14). GSBL üreten suşların çoğu hastane kökenli olup, yoğun antibiyotik baskısı altındaki hastane ortamlarında bu suşlarla infeksiyon ve kolonizasyon daha sık görülmektedir. GSBL salgılayan suşların saptanması için klavulanik asidin bu enzimlerin aktivitesini inhibe etmesi temelde dayanan çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Standart disk difüzyon testleri GSBL üretimini % 48 oranında yakalayabilmektedir. Bu nedenle bu enzimleri tesbit etmek için ilave testlere ihtiyaç vardır (16).

Bu çalışmada ÇDS ve E-test ile GSBL üretiminin saptanması ve iki yöntemin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ceşitli kliniklerden gönderilen 63 idrar, 21 trakeal aspirat, 18 yara ve diğer muhtelif örneklerden izole edilen *E.coli* ve *Klebsiella* suşları çalışmaya alınmıştır. GSBL üretiminin tesbit etmek için çift disk sinerji (ÇDS) ve sefotaksim/sefotaksim-klavulanik asit (CT/CTL) E-test (AB Biodisk, Sweden) yöntemi uygulanmıştır. Disk difüzyon yönteminde NCCLS kriterlerine uygun olarak; 0.5 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton agar (Oxoid) yüzeyine yayılıp, besiyerinin merkezine amoksilsin-klavulanik asit diskı ve çevresine 25 mm uzaklıkta olacak şekilde seftriakson (CRO-Oxoid), seftazidim (CAZ-Oxoid), sefotak-

sim (CTX-Oxoid) ve aztreonam (ATM-Oxoid) diskleri yerleştirilmiştir. Yirmi dört saat 35°C'de inkübe edildikten sonra CRO, CAZ, CTX ve ATM inhibisyon zonlarının klavulanik asit diskine doğru belirgin genişlemesi veya iki inhibisyon zonu arasındaki bakteri üreyen alanda üremenin inhibe edildiği bir bölgenin görülmESİ GSBL pozitifliği olarak kabul edilmiştir. E-test yönteminde ise sefotaksim/sefotaksim-klavulanik asit MİK oranı 8 ve üzeri olan değerler ve CT inhibisyon elipsinde deformasyon oluşumu, GSBL pozitifliği olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Seksenbeş *E.coli* ve 17 *Klebsiella* suşu olmak üzere toplam 102 suş GSBL üretimi yönünden incelenmiş ve 29'unda GSBL varlığı tespit edilmiştir. Bu suşların 17'sinde ÇDS yöntemiyle ve 23'ünde ise CT/CTL E-test yöntemiyle GSBL varlığı tespit edilmiştir. On bir suş, her iki yöntem ile de GSBL pozitif bulunmuştur (Tablo). GSBL üreten suşlardan 18'inin (% 56) kinolonlara da dirençli olduğu ve bu dirençli suşlardan birinin *Klebsiella*, diğerlerinin ise *E.coli* suşu oldu-

ğu belirlenmiştir. GSBL negatif suşlarda ise kinolon direnci % 48 olarak saptanmıştır. GSBL pozitif *E.coli* suşları arasında kinolon direnci % 76.4 (13/17) iken, GSBL negatif *E.coli*'ler arasında % 37 (20/54) olarak bulunmuştur ($p<0.05$). *Klebsiella* suşları arasında ise GSBL pozitif ve negatif grubun her ikisinden ikişer suşun kinolon direnci gösterdiği tespit edilmiştir.

Tablo. GSBL pozitif *E. coli* ve *Klebsiella* suşlarının dağılımı.

Yöntem	<i>E.coli</i> n=85 (%)	<i>Klebsiella</i> n=17 (%)	Toplam n=102 (%)
GSBL pozitif	22 (25.9)	7 (41.2)	29 (28.4)
E-test ile	17 (20.0)	6 (35.3)	23 (22.5)
ÇDS ile	14 (16.5)	3 (17.6)	17 (16.6)
Her iki test ile	9 (10.6)	2 (11.7)	11 (10.7)

TARTIŞMA

GSBL üreten suşlarla gelişen sporadik nozokomial salgınlar, bazı hastanelerde ciddi sorunlara neden olmaktadır. Özellikle çok sık beta-laktam antibiotik kullanımının olduğu hastane ortamının selektif baskısı altında tedavi gören hastaların solunum ya da sindirim sistemlerinde bu enzimleri üreten bakteri kolonizasyonları görülmektedir (13).

Ülkemizde GSBL üreten suşlar çeşitli merkezlerde incelemiştir, *E. coli* ve *Klebsiella* türlerinin en çok GSBL üreten bakteriler olduğu gözlenmiştir. Ülkemizden yapılan bazı çalışmalarda *E.coli* için % 17-32 arasında GSBL pozitif suş bildirilirken, *K.pneumoniae* için % 42-45 gibi yüksek GSBL pozitifliği bildirilmiştir (2,8,9,11,12,15). Alıcı ve ark. (1)'nın yaptıkları çalışmada ise *Klebsiella* suşları için % 78 gibi yüksek bir GSBL üretimi bildirilmiştir. Ayrıca Kocazeybek (11) *K.pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında GSBL üretimini % 19.5 olarak bildirmiştir. Çalışmamızda ise *Klebsiella* türlerinde GSBL % 41.2 ve *E.coli* suşlarında ise % 25.9 olarak saptanmış olup, bu veriler ülkemiz verileri ile paralel görünülmektedir. Aynı hastaneden Durmaz ve ark. (5)'nin bildirdikleri *Klebsiella* suşlarında % 48.8'lik GSBL pozitifliği oranı benzer iken, *E.coli* suşlarındaki % 1.1'lik oran oldukça farklı görünmektedir. Bu farklılık, yıllar içerisinde *E.coli* suşları arasında plazmid bağımlı bu direnç mekanizmasının hızla yayıldığını düşündürebilir, ancak suş sayısının azlığı karşılaştırmayı güçlitmektedir.

Her iki yöntemin karşılaştırıldığı diğer çalışmalarda ÇDS ve GSBL-E test duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek görünümele birlikte (10,11), çalışmamızda her iki yöntemin de tek başına GSBL üretimini tespit etmek için yeterli olmadığı görülmüştür. ÇDS testi ile tespit ettiğimiz bazı suşların, E-test

yönteminde CT ve CTL MİK değerlerinin çok yüksek olması nedeniyle GSBL pozitif olarak saptanamaması, bu suşlar için ÇDS testinin gerekliliğini ortaya koymuştur. E-test yöntemi ile CT/CTL MİK değeri oranının 8'in üstünde olduğu, ancak ÇDS testinde inhibisyon zon caplarında değişme olmayan suşların daha fazla olduğu saptanmıştır. Her iki testin bir arada kullanılması ile GSBL pozitifliğinin tesbit edilmesi daha verimli görünmektedir. Ancak E test yönteminin pahalılığı nedeni ile rutinde uygulanması hâlâ problem olup, ÇDS yönteminin daha kolay uygulanabilir ve ucuz olması üstünlük sağlamaktadır.

Yapılan bir çalışmada ÇDS yönteminin TEM-12 ve MIR-1 üreten suşları saptayamadığı ve E-test yönteminin de sadece TEM ve SHV benzer GSBL üreten suşlarda % 81.2 oranında suşları doğru tesbit ettiği bildirilmiştir (16). Suşlarımızın taşıdığı enzimlerin genotipik analizi yapılmadığı için bu konuda yorum yapılamamıştır. Ancak şu da bilinmektedir ki Türkiye'de yaygın olan bazı enzimler yurt dışında nadir rastlanmaktadır, bu nedenle ülkemizde bu tür enzimlerin genotipik olarak belirleneceği çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır.

GSBL pozitif *E.coli* suşlarında kinolon direnci GSBL negatif suşlara göre istatistiksel olarak daha yüksek saptanmıştır ($p < 0.05$). Daha önce bazı araştırmacılar tarafından da bildirilen bu durum, *Klebsiella* suşları arasında görülmemektedir (3).

Sonuç olarak ÇDS yöntemi ve E-test birlikte kullanıldığında daha doğru sonuç alınmakla birlikte, bu konuda daha duyarlı testlerin kullanılmasının gerekli olduğu kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1- Alıcı Ö, Kart Yaşa K, Şengöz G, Nazlıcan Ö: Klebsiella pneumoniae suşlarında farklı yöntemlerle ESBL varlığının araştırılması, *ANKEM Derg* 16:112 (2002).
- 2- Büyükbaba Ö, Aydın D, Anğ Ö: İdrar yolu infeksiyonu etkeni Gram negatif çomaklarda genişletilmiş spektrumlu beta laktamazların çift disk sinerji yöntemiyle belirlenmesi, *Klinik Derg* 9:27 (1996).
- 3- Canton R, Coque TM, Varela MC, Oliver A, Perez-Diaz JC, Loza E, Baquero F: High frequency of quinolone resistance in extended spectrum beta lactamase producing *E.coli* but not in *K.pneumoniae* isolates from a Spanish hospital, *Clin Microbiol Infect* 7 (Suppl 1):286 (2001).
- 4- Derbentli Ş, Katrancı H, Nakipoğlu Y: Gram negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların belirlenmesinde üç boyutlu yöntem ve çift disk sinerji yönteminin karşılaştırılması, *ANKEM Derg* 10:1 (1996).
- 5- Durmaz R, Durmaz B, Koroglu M, Tekerekoglu 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* 7:171 (2001).
- 6- Eskitürk A, Korten V, Söyletir G: Akut bakım gerektiren hastalarda gelişen infeksiyonlardan izole edilen *Klebsiella* türlerinde antibakteriyel duyarlılık paternlerinin ve geniş spektrumlu beta-laktamaz sıklığının araştırılması, *ANKEM Derg* 10:14 (1996).
- 7- Ferrara A, Dos Santos C, Cimbro M: Effect of different beta-lactams in combination with beta-lactamase inhibitors in the presence or absence of tobramycin against some Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases, *Chemotherapy* 44:313 (1998).
- 8- Geyik MF, Kökoğlu ÖF, Uçmak H, Çelen MK, Hoşoğlu S, Ayaz C: Hastane kaynaklı Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, *İnfeksiyon Derg* 16:175 (2002).

- 9- Gülay Z, Yüce A, Yuluğ N: Klebsiella pneumoniae ve Escherichia coli suşlarında değişik beta-laktamaz inhibitörleri kullanılarak genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin saptanması, *ANKEM Derg* 12:469 (1998).
- 10- Gülay Z, Bicmen S, Amyes GB, Yuluğ N: Ability of different methods to detect extended spectrum beta lactamases in Enterobactericeae, *Clin Microbiol Infect* 7 (Suppl 1):288 (2001).
- 11- Kocazeybek BS: Antimicrobial resistance surveillance of Gram-negative bacteria isolated from intensive care units of four different hospitals in Turkey. Evaluation of the prevalence of extended-spectrum and inducible beta-lactamases using different E-test strips and direct induction methods, *Chemotherapy* 47:396 (2001).
- 12- Özbilge H, Zeyrek FY, İnanç Y: Gram negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığı ve çeşitli antibiyotiklere direnç durumu, *ANKEM Derg* 17:13 (2003).
- 13- Özsoy MF, Öncül O, Yıldırım A, Pahsa A: Genişletilmiş spektrumlu beta laktamazlar: Klinik önemi ve getirdiği sorunlar, *Flora* 6 (Suppl 1):3 (2001).
- 14- Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA: Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alfa metoxi beta-lactams in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae, *Antimicrob Agents Chemother* 34:2200 (1990).
- 15- Töreci K, Kaygusuz A, Öngen B, Gürler N: Enterobacteriaceae ailesinde ard arda izole edilen 827 suşta genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz oluşturma sıklığı, *ANKEM Derg* 10:121 (1996).
- 16- Vercauteren E, Descheemaeker P, Ieven M, Sanders CC, Goossens H: Comparison of screening methods for detection of extended spectrum β -lactamases and their prevalence among blood isolates of Escherichia coli and Klebsiella spp. in a Belgian Teaching Hospital, *J Clin Microbiol* 35:2191 (1997).