

ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ENTEROBACTERIACEAE SUŞLARINDA GSBL OLUŞTURMANIN ÇDST VE VITEK2 YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

Murat MEHLİ *, Yasemin ZER **, Efgan GAYYURHAN *

*Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, GAZİANTEP

**Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Merkez Laboratuvarı, GAZİANTEP

ÖZET

Nisan 2006-Ağustos 2006 arasında hastanemizde çeşitli klinik örneklerden izole edilen 212 *Escherichia coli*, 71 *Klebsiella spp.*, 28 *Proteus spp.* ve 10 *Enterobacter spp.* olmak üzere toplam 321 suşun GSBL enzimi çift disk sinerji testi (ÇDST) ile ve Vitek2 (bioMérieux) cihazında GN13 kartları ile prospektif olarak araştırılmıştır. GSBL oranları ÇDST ve Vitek2 ile sırasıyla *E.coli*'de % 49 ve % 51, *Klebsiella spp.*'de % 44 ve % 51 olarak bulunmuştur. *Proteus spp.* ve *Enterobacter spp.* suşlarında GSBL tespit edilmemiştir. Hastanemizde *E.coli* suşlarında oldukça yüksek GSBL enzimi olduğu görülmüştür. Vitek2 GN13 kartları ile GSBL testinin ÇDST'ne göre duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 94.1 olarak bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: çift disk sinerji testi, Enterobacteriaceae, GSBL, Vitek2

SUMMARY

ESBL Investigation in Enterobacteriaceae Strains Isolated from Various Clinical Samples by DDST and Vitek2 Methods

Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production by 212 *Escherichia coli*, 71 *Klebsiella spp.*, 28 *Proteus spp.* and 10 *Enterobacter spp.* strains isolated in our hospital was prospectively investigated by double disk synergy test (DDST) and Vitek2 GN13 cards system. ESBL positivity was detected by DDST and Vitek2 system in *E.coli* strains as 49 % and 51 %, in *Klebsiella spp.* strains as 44 % and 51 %, respectively. GSBL production was not detected in *Proteus spp.* and *Enterobacter spp.* strains. High ratio of GSBL production was found in *E.coli* strains in our hospital. When compared to the result of DDST, the sensitivity of Vitek2 system was calculated as 100 % and the specificity as 94.1 %.

Keywords: double disk synergy test, Enterobacteriaceae, extended-spectrum beta-lactamase, Vitek2

GİRİŞ

Enterobacteriaceae ailesindeki bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere direncinde en önemli kaynak beta-laktamaz enzimleridir⁽²⁾. Beta-laktamazlar, en çok Gram negatif bakteriler tarafından sentezlenen, beta-laktam grubu antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hale getiren enzimlerdir^(2,17). Sayıları 350 kadar olan beta-laktamazların bazıları doğal olarak mikroorganizmaların kromozomlarında, bazıları da bakteriler arasında aktarılabilen plazmidler

üzerinde kodlanmaktadır^(3,22). Plazmid kontrolündeki beta-laktamazlardan yaklaşık 150'si "geniş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) (extended-spectrum beta-lactamase)" olarak adlandırılır^(2,22). GSBL enzimleri penisilinler, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama karşı dirençten sorumludur⁽⁵⁾. Günümüzde en çok *Klebsiella* ve *Escherichia coli*'de rastlanmakla birlikte son yıllarda diğer patojen bakteriler arasında da hızla yaygınlaşmakta, özellikle nozokomiyal etkenler arasında GSBL pozitif suşlara daha sık rastlanmaktadır^(5,15). Bu sebeple izole

Yazışma adresi: Yasemin Zer. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Merkez Laboratuvarı, GAZİANTEP

Tel.: (0342) 360 60 60/77373

e-posta: yaseminzer@hotmail.com

Alındığı tarih: 01.02.2007, revizyon kabulü: 24.04.2007

edilen etkenin GSBL enziminin olup olmadığı araştırılmalı, GSBL varlığında suş tüm geniş spektrumlu sefalosporinlere, penisilinlere ve aztreonama dirençli bildirilmelidir^(3,11). GSBL üreten suşların saptanmasında çift disk sinerji testi (ÇDST), E test, üç boyutlu test ve otomatize bazı sistemlere ait tanı kartları kullanılabilir^(1,2,16). Rutin uygulamada ÇDST en sık kullanılan yöntem olup, beta-laktam ve beta-laktamaz inhibitörleri arasında sinerji varlığına dayalı ucuz ve kolay bir testtir^(8,11). Günümüzde otomatize sistemler, bakteri tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yapılmasında sıkça kullanılmaktadır. Bu sistemlerin bazılarında GSBL de saptanabilmektedir. Bu çalışmada bazı laboratuvarlarda kullanılmakta olan Vitek2 ile tespit edilen GSBL oranlarının, daha yaygın olarak kullanılan ÇDST ile uyumu irdelenmek istenmiş, bu iki yöntemin moleküler çalışmaları gerektiren mutlak performanslarını belirlemek amaçlanmamıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Nisan 2006-Ağustos 2006 arasında Mikrobiyoloji birimimize gelen çeşitli örneklerden izole edilen 212 *E.coli*, 71 *Klebsiella* spp., 28 *Proteus* spp. ve 10 *Enterobacter* spp. olmak üzere 321 suşda GSBL enzimi, suşlar stoklanmadan, izole edilmelerini takiben prospektif olarak ÇDST ve Vitek2 GN13 kartları ile araştırılmıştır.

Vitek2 identifikasyon kartları ile tüm suşların tanımlaması yapılmış, tanımlama için gerektiğinde klasik yöntemler kullanılmıştır. GSBL belirlenmesi de Vitek2 GN13 kartları ile yapılmıştır. Bu kartlarda sefepim (klavulanik asitli ve klavulanik asitsiz), sefotaksim (klavulanik asitli ve klavulanik asitsiz), seftazidim (klavulanik asitli ve klavulanik asitsiz) olmak üzere 6 kuyudaki antibiyotik kombinasyonları ile GSBL belirlenmektedir.

ÇDST'de disk difüzyon yönteminin standartları kullanılmıştır. Mueller Hinton agarının merkezine amoksisilin-klavulanik asit (20/10 µg) diski ve bu diskin etrafına merkezden merkeze uzaklıkları 20 mm olacak şekilde seftriakson (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftazidim (30 µg)

ve aztreonam (30 µg) diskleri dispenser ile yerleştirilmiştir. Plaklar 18-20 saat süreyle 35°C'de inkübe edilmiştir. Disklerden herhangi birinin inhibisyon zonunun amoksisilin-klavulanik asit diskiye bakan kısmında genişleme olması GSBL pozitif olarak değerlendirilmiştir^(16,18). Çalışmada GSBL üretmediği bilinen *E.coli* ATCC 25922 suşu kontrol suşu olarak kullanılmıştır.

İstatistiksel değerlendirme kıkare testi kullanılarak yapılmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya alınan örneklerin 173'ü (% 54) kadın, 148'i (% 46) erkek hastalardan izole edilmiştir. İncelenen 321 örneğin 192'si (% 60) idrar, 27'si (% 8) kan kültürü, 24'ü (% 7) yara sürüntüsü, 24'ü (% 7) dışkı, 18'i (% 6) balgam, 13'ü (% 4) sonda ucu ve 23'ü (% 7) diğer örneklerden (dren, boğaz sürüntüsü, trakeal aspirat, stent ucu, açlık mide suyu, plevra) izole edilmiştir. Örneklerin 223'ü (% 69) serviste yatmakta olan hastalara, 98'i (% 31) ise ayaktan tedavi için polikliniklere başvuran hastalara aitti. Serviste yatan hastalardan soyutlanan 223 suşun 151'i (% 68) *E.coli*, 57'si (% 26) *Klebsiella* spp., 8'i (% 4) *Enterobacter* spp., 7'si (% 3) *Proteus* spp.; poliklinik hastalarından izole edilen 98 suşun 61'i (% 62) *E.coli*, 14'ü (% 14) *Klebsiella* spp., 21'i (% 21) *Proteus* spp. ve 2'si (% 2) *Enterobacter* spp. olarak tanımlanmıştır.

Servis ve poliklinik hastalarından izole edilen suşlarda iki yöntemle saptanan GSBL pozitifliği tabloda gösterilmiştir. *Enterobacter* spp. ve *Proteus* spp. suşlarında GSBL varlığı belirlenmemiştir.

ÇDST ile GSBL negatif bulunan 6 *E.coli* ve 5 *Klebsiella* spp. suşunda Vitek2 ile pozitif sonuç alınmış, Vitek2 ile negatif, ÇDST ile pozitif sonuç veren suş olmamıştır. Bu durumda ÇDST kriter alındığında Vitek2'nin duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 94.1 olarak hesaplanmıştır. GSBL varlığı açısından servis ve poliklinik hastaları arasında istatistiksel fark olduğu saptanmıştır (p<0.05). Kontrol suşu iki yöntemle de negatif sonuç vermiştir.

Tablo: Servis ve poliklinik hastalarından izole edilen suşlarda ÇDST ile ve Vitek2 GN 13 kartı ile saptanan GSBL pozitifliği.

Bakteri	Servis		Poliklinik		Toplam	
	ÇDST	Vitek2	ÇDST	Vitek2	ÇDST	Vitek2
<i>E.coli</i>	92/151* (61)	97/151 (64)	11/61 (18)	12/61 (20)	103/212 (49)	109/212 (51)
<i>Klebsiella spp.</i>	28/57 (49)	33/57 (58)	3/14 (21)	3/14 (21)	31/71 (44)	36/71 (51)
<i>Proteus spp.</i>	0/7	0/7	0/21	0/21	0/28	0/28
<i>Enterobacter spp.</i>	0/8	0/8	0/2	0/2	0/10	0/10
Toplam	120/223 (54)	130/223 (58)	14/98 (14)	15/98 (15)	134/321 (42)	145/321 (45)

* GSBL pozitif suş sayısı/denenen suş sayısı (% pozitiflik).

TARTIŞMA

GSBL üreten *E.coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarının yol açtığı infeksiyonlar mortalitede artışa neden olmasının yanında ciddi ekonomik kayıplara sebep olmasından dolayı da önemlidir. Rutin antibiyogram bildirimlerine bakarak GSBL varlığından şüphelenmek mümkündür. Sefotaksim, seftazidim, seftriakson ve/veya aztreonam alışımlışın dışında direnç görülmesi GSBL için uyarıcı olabilmekle birlikte, bazı GSBL pozitif bakterilerle yapılan duyarlılık deneylerinde bir kısım bakterinin yanlışlıkla duyarlı olarak bulunabileceği gözlenmiştir^(4,7,18). GSBL belirlemede dilüsyon yöntemleri, çift disk sinerji testi, üç boyutlu test, otomatize sistemler (Vitek gibi) ve E test kullanılabilir^(8,16,18). GSBL araştırmak amacıyla ÇDST halen en yaygın kullanılan, en ucuz ve uygulaması en kolay olan yöntemdir.

Enterobacteriaceae ailesinde bulunan pek çok bakterinin GSBL ürettiği bilinmektedir. Özellikle *Klebsiella spp.* suşlarında GSBL'ye daha sık rastlandığı, bunun da *Klebsiella spp.* suşlarında daha sık spontan mutasyon olmasına bağlı olduğu bildirilmektedir⁽¹⁰⁾. Suşlarımızda ÇDST ile *E.coli*'de % 49, *Klebsiella spp.*'de % 44 oranında GSBL saptanmıştır. Türkiye'de GSBL oranlarını *E.coli* ve *Klebsiella spp.*'de sırası ile Özkan ve ark.⁽¹³⁾ % 39 ve % 66, Mumcuoğlu ve ark.⁽¹²⁾ % 20 ve % 44 olarak bildirmişlerdir. Delialioğlu ve ark.⁽⁶⁾ klinikte yatan hastalardan

izole edilen *E.coli* suşlarında % 29, *Klebsiella pneumoniae* suşlarında % 35.8 oranında GSBL varlığı bulmuşlardır. Yetkin ve ark.⁽²¹⁾ kan kültürlerinden izole edilen *E.coli* suşlarında % 34.5 oranında GSBL tespit etmişlerdir. Dünya genelinde yapılan çok merkezli çalışmalarda *Klebsiella spp.* izolatlarında GSBL oranının genellikle daha yüksek olduğu ve oranın farklı coğrafik bölgelerde % 2-45, *E.coli*'de ise bu oranın % 6-30 olduğu bildirilmektedir^(9,19,20). *Klebsiella spp.*'de bulunmuş olduğumuz oranların benzer, *E.coli* için bir miktar yüksek olduğu gözlenmiştir. Kliniğimizde 2002 yılında Zer ve ark.⁽²³⁾ tarafından yapılan benzer bir çalışmada GSBL oranları *E.coli* ve *Klebsiella* suşlarında sırasıyla % 26.19 ve % 46.34 olarak bulunmuştur. Hastanemizde *Klebsiella* suşlarının GSBL oranlarında değişiklik olmadığı, *E.coli* suşlarında ise artmış olduğu gözlenmiştir. Tespit etmiş olduğumuz oranlardaki değişikliğin, hastanemizdeki direnç profilindeki değişikliğe bağlı olabileceğini, bu verilerin güncellenmesinin antibiyotik kullanım prensiplerini yönlendireceğini düşünmekteyiz. Her bölge ve her hastanede, hatta hastanelerin farklı servislerinde tespit edilen direnç oranları farklı olup, bu verilerin hastanemizin çalışmış olduğumuz periyottaki direnç profilini yansıttığı düşünülmektedir. Servis ve poliklinik hastalarından izole edilen suşlardaki GSBL oranlarının *E.coli* suşlarında % 61 ve % 18; *Klebsiella spp.* suşlarında % 49 ve % 21 olduğu, tüm suşlar için servis ve poliklinik suşları arasında anlamlı fark olduğu görülmüş-

tür ($p < 0.05$). Servislerden izole edilen bakterilerin çeşitli faktörlerden dolayı daha dirençli olduğu göz önüne alınarak, bu, tahmin edilebilen bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada GSBL enzimi ÇDST ve Vitek2 ile araştırılmış, sırası ile *E.coli*'de % 49 ve % 51; *Klebsiella* spp.'de % 44 ve % 51 oranında GSBL tespit edilmiştir. İzolatlardan 6 *E.coli* ve 5 *Klebsiella* spp. suşunda ÇDST ile GSBL tespit edilmezken, Vitek2 ile tespit edilmiştir. Bu suşlarda her iki test de tekrarlanmış, aynı sonuçlar alınmıştır. Bunun sebebi olarak Vitek2'de GSBL belirlemek için ÇDST'den farklı olarak, sefepimin de test ediliyor olması düşünülmüştür. Bu verilere göre ÇDST'e göre Vitek2'nin duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 94.1 olarak bulunmuştur. Sanders ve ark.⁽¹⁴⁾ da Vitek2 ve ÇDST ile yaptıkları benzer bir çalışmada GSBL saptanmasında Vitek2'nin duyarlılığını % 98.1, özgüllüğünü % 99.4 olarak bulmuşlar, Vitek2 ile *E.coli* ve *Klebsiella* spp.'da GSBL'nin güvenilir bir şekilde tespit edilebildiğini bildirmişlerdir.

Sonuçlarımız Vitek2 GN13 kartlarının ÇDST yerine GSBL saptanmasında kullanılabileceğini göstermektedir. ÇDST ile pozitif, Vitek2 ile negatif sonuç alınmamıştır. Ancak ÇDST ile negatif, Vitek2 ile pozitif sonuç veren suşlarda ÇDST'nin mi yanlış negatif, Vitek2'nin mi yanlış pozitif sonuç verdiği moleküler yöntemlerle araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Bal Ç: Beta-laktamazlar: güncel durum, Flora 2003;8(2):111-23.
2. Bradford PA: Extended-spectrum beta-laktamazlar in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat, Clin Microbiol Rev 2001;14(4):933-51.
3. Bush K: New beta-laktamazlar in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy, Clin Infect Dis 2001;32(7):108-59.
4. Büyükbaba Ö, Aydın D, Anç Ö: İdrar yolu enfeksiyonu etkeni Gram negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların çift disk sinerji yöntemi ile belirlenmesi, Klimik Derg 1996;9(1):27-30.
5. Datta P, Thakur A, Mishra B, Gupta V: Prevalence of clinical strains resistant to various beta-laktamazlar in tertiary care hospital in India, Jpn J Infect Dis 2004;57(4):14-69.
6. Delialioğlu N, Öcal ND, Emektaş G: Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz oranları, ANKEM Derg 2005;19(2):84-7.
7. Derbentli Ş, Katrancı H, Nakiboğlu Y: Gram negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların belirlenmesinde üç boyutlu yöntem ve çift disk sinerji yönteminin karşılaştırılması, ANKEM Derg 1996;10(1):1-13.
8. Gill VJ, Fedorko DP, Witebsky FG: The clinician and microbiology laboratory, "Mandel GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 5.baskı" kitabında s.184-221, Churchill Livingstone, Philadelphia (2000).
9. Ho PL, Tsang DN, Que TL, Ho M, Yuen KY: Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum beta-laktamazlar and their prevalence among *E.coli* and *Klebsiella* species in Hong Kong, APMIS 2000;108(3):237-40.
10. Jacoby GA, Medeiros AA: More extended-spectrum beta-laktamazlar, Antimicrob Agents Chemother 1991;35(9):1697-704.
11. Livermore DM, Brown DF: Detection of beta-laktamaz mediated resistance, J Antimicrob Chemother 2001;48(Suppl 1):59-64.
12. Mumcuoğlu İ, Gündüz T, Baydur H: *Escherichia*, *Klebsiella* ve *Proteus* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığı ve çeşitli antibiyotiklere direnç durumu, ANKEM Derg 2004;18(1):9-11.
13. Özkan Ç, Oldacay M, Erdem G: Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı, ANKEM Derg 2002;16(1):65-8.
14. Sanders CC, Barry AL, Washington JA et al: Detection of extended-spectrum beta-laktamazlar producing members of the family Enterobacteriaceae with Vitek ESBL test, J Clin Microbiol 1996;34(12):2997-3001.
15. Sanders CC, Sanders WE: Beta-laktamaz resistance in gram negative bacteria; global trends and clinical impact, Clin Infect Dis 1992;15(5):824-39.
16. Sanders CC, Thomson KS, Bradford PA: Problems with detection of beta-laktamaz resistance among nonfastidious gram negative bacilli, Infect Dis Clin North Am 1993;7(2):411-23.
17. Steward CD, Rasheed JK, Hubert SK et al: Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards ex-

- tended-spectrum beta-lactamase detection methods, J Clin Microbiol 2001;39(8):286-472.
18. Thomson KS, Sanders CC: Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests, Antimicrob Agents Chemother 1992;36(9):1877-82.
 19. Villegas MV, Correa A, Perez F, Miranda MC, Zuluaga T, Quinn JP: Prevalence and characterization of extended spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals, Diagn Microbiol Infect Dis 2004;49(3):217-22.
 20. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N: Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region, Clin Infect Dis 2001;32(2):94-103.
 21. Yetkin G, Kuzucu Ç, Çalışkan A, Ay S: Kan kültürlerinde üreyen *Escherichia coli*'lerin antibiyotik duyarlılıkları, GSBL oranları ve hastane birimlerine göre dağılımı, İnönü Üniv Tıp Fak Derg 2006;13(3):147-50.
 22. Yorgancıgil B: Beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları, Turgut Özal Tıp Merkezi Derg 1999;6(2):176-82.
 23. Zer Y, Bayram A, Orhan G, Çeliksöz C, Korkmaz G, Balcı İ: Hastanede yatan hastalardan izole edilen Gram negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların ve çeşitli antibiyotiklere duyarlılığın araştırılması, Anadolu Tıp Derg 2002;4(2):71-5.