

KLEBSIELLA PNEUMONIAE SUŞLARINDA “EXTENDED BROAD SPECTRUM” BETA-LAKTAMAZLARIN ARAŞTIRILMASI

Tamer ŞANLIDAĞ¹, Güldemir SAYGI¹, Semra ÖZÇELİK¹,
Nedim ÇAKIR², Ali ÇELİKSÖZ¹

ÖZET

Çalışmamızda *Klebsiella pneumoniae* suşlarında “Extended Broad Spectrum” beta-laktamaz (EBSBLa) varlığı araştırılmıştır. Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi (n=28) ve Cumhuriyet Üniversitesi (n=16) Hastanelerinin yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastalardan izole edilen toplam 44 *K.pneumoniae* suşi ile yapılmıştır. Kromojenik sefałosporin yöntemiyle tümünde beta-laktamaz enzimleri saptanan suşlar, çift disk sinerji yöntemiyle EBSBLa yönünden incelettilerinde, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesinden izole edilenlerin %21’inde, Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesinden izole edilenlerin ise %56’sında bu enzimlerin varlığı saptanmıştır.

SUMMARY

Investigation of “Extended Broad Spectrum” beta-lactamases in Klebsiella pneumoniae strains.

In this study, EBSBLa enzymes of *K.pneumoniae* strains were investigated. Twenty-eight strains of the Hospital of Dokuz Eylül University and 16 strains of the Hospital of Cumhuriyet University isolated from intensive care units were used in the study. Beta-lactamase activity was detected in all strains (100%) by chromogenic cephalosporin method. EBSBLa activities were detected by double-disk synergy in 21% and 56% of the isolates of the Hospital of Dokuz Eylül University and Cumhuriyet University, respectively.

GİRİŞ

K.pneumoniae, nozokomiyal infeksiyonlardan sıkılıkla izole edilen bakterilerdir (7). Birçok hastancı infeksiyonu salgınlarından izole edilmekte ve antibiyotiklere çoğul direnç gösterdiklerinden dolayı tedavide güçlükler yaratmaktadır (2,15,18,19,22,23). Seksenli yılların başında ilk kez Almanya'da *Klebsiella* suşlarında bildirilen “Extended Broad Spectrum” beta-laktamaz (EBSBLa) enzimleri, günümüzde diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde, *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında ve tüm dünyada saptanmıştır (9,10,14,24). Özellikle Avrupa ülkelerinde EBSBLa üreten *K.pneumoniae* suşları ile meydana gelen hastane infeksiyonu salgınları sık görülmektedir (2,4,11,23). EBSBLa enzimleri, plazmidler tarafından kodlanmaktadır ve bu nedenle de bakteriler arasında hızlı bir şekilde yayılmaktadır (21). Penisilin, sefałosporin, oksümino-beta-laktam

* 11. Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi'nde sunulmuştur (2-6 Haziran 1996, Kuşadası).
1. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sivas.
2. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

gibi geniş spektrumlu beta-laktamları hidrolize ederler, ancak sefamisin veya metoksümino sefalosporin, penem veya karbapenemleri hidrolize etmezler (16).

EBSBLa enzimleri, TEM ve SHV tip enzimleri kodlayan genlerdeki nokta mutasyonları nticesinde meydana gelirler ve klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır (6,16). Bu enzimler rutin antibiyotik duyarlılık deneyleri ile saptanamamışlardır (16,17). Bu yüzden EBSBLa üreten *K.pneumoniae* suşlarının daha yaygın olduğu düşünülmekte, ancak laboratuvarlarda karşılaşılan tanı güçlüklerinden dolayı daha düşük oranlarda saptandığı bildirilmiştir (12). EBSBLa enzimlerinin belirlenmelerinde sıkılıkla çift disk sinerji (ÇDS) yöntemi ve E Testi kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, her iki üniversitede hastanesinin yoğun bakım ünitesinde yataktaki hastalarından izole edilen *K.pneumoniae* suşlarında, ÇDS yöntemiyle EBSBLa sıklığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakteriler: Çalışmamızda, 1995-96 yıllarında, Dokuz Eylül (n=28) ve Cumhuriyet Üniversitesi (n=16) Tıp Fakültesi Hastanelerinin yoğun bakım ünitelerinde yataktaki hastaların trakeal sekresyon örneklerinden izole edilmiş 44 *K.pneumoniae* suşı kullanılmıştır.

Beta-laktamaz enzimlerinin araştırılması: Suşların beta-laktamaz aktivitelerinin araştırılmasında kromojenik sefalosporin yöntemi uygulanmış ve bu amaç için de sefinaz (BBL, Becton-Dickinson) diskleri kullanılmıştır. Test, beta-laktamaz enziminin, nitrosefinde bulunan beta-laktam halkasındaki amid bağıni hidrolize etmesiyle, rengin sarıdan kırmızıya dönüşmesi esasına dayanmaktadır. Bunun için Mueller-Hinton agarda üretilen bakteri kolonilerinden bir öze dolusu alınarak, sefinaz diskinin yüzeyine sürülmüş ve renk değişimi gözlenmiştir. Bir saat içerisinde, rengin sarıdan kırmızıya dönüşmesi pozitif olarak, bu sürec içerisinde renk değişikliğinin görülmemesi ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

EBSBLa enzimlerinin araştırılması: Kromojenik sefalosporin yöntemiyle beta-laktamaz酶 ortaya koymak amacıyla ÇDS yöntemi uygulanmıştır. Suşlarda EBSBLa enzimini ortaya koymak amacıyla ÇDS yöntemi uygulanmıştır. McFarland 0.5 eşeline göre bakteri süspansiyonları hazırlanıp Mueller-Hinton agar yüzeyine yayılmıştır. Daha sonra merkeze bir amoksisilin-klavulanik asit (Oxoid) diskı ve çevresine, disk merkezleri arası uzaklık 30 mm olacak şekilde aztreonam, seftazidim ve sefotaksim (Oxoid) diskleri yerleştirilmiştir. Besiyerleri 37°C'de 18 saat inkübe edildikten sonra, herhangi bir diskin inhibisyon zonunun, amoksisilin-klavulanik asit diskine doğru genişlemesi EBSBLa pozitifliği olarak kabul edilmiştir (8).

BULGULAR

Çalışmada kullanılan 44 *K.pneumoniae* suşunun tümünde (%100) kromojenik sefalosporin yöntemiyle beta-laktamaz酶 saptanmıştır. Tüm suşlar EBSBLa tayini için kullanılmış ve Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesinden izole edilen suşlarda %21, Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesinden izole edilenlerde ise %56 oranında EBSBLa saptanmıştır.

TARTIŞMA

İlk önce Almanya'da izole edilen *Klebsiella* suşlarında saptanan EBSBLa enzimleri, günümüzde diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde ve *P.aeruginosa* suşlarında da bulunmuştur (9,10,14,24). Bu enzimlerin plazmidler tarafından kodlanması, bakteriler arasında hızla yayılmalarına neden olmaktadır (21). Başta beta-laktam grubu olmak üzere antibiyotiklerin klinikte sık kullanılması ve bunun yanında birçok faktöre bağlı olarak, EBSBLa üreten bakterilerin çoğalması infeksiyonların tedavisinde ciddi problemler yaratmaktadır (16,17). Rutin antibiyotik duyarlılık deneylerinde saptanmadıklarından, şu an bildirilenlerden daha yüksek oranda EBSBLa üreten suşlar olduğu düşünülmektedir (12). Bu enzimlerin beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı olmalarından dolayı, belirlenmelerinde, klavulanik asit ile üçüncü kuşak bir sefaloспорin veya aztreonam arasındaki sinerjiyi temel alan ÇDS yöntemi önerilmektedir (10,13). Ancak çeşitli araştırmacılar ÇDS yönteminde diskler arasındaki uzaklığın, EBSBLa enzimlerinin saptanmasında etkili olabileceğini bildirmiştir (22). Nitekim Gülay ve ark. (8)'ları ÇDS yöntemiyle *K.pneumoniae* suşlarında %56.8 oranında EBSBLa saptarlarken, disklerin daha yakın bir mesafede durması temeline dayanan modifiye çift disk sinerji yöntemiyle bu oranı %88.6 olarak bulmuşlardır. Abacıoğlu ve ark. (1)'ları ise *K.pneumoniae* suşlarında EBSBLa araştırılması ile ilgili çalışmalarında ÇDS yöntemiyle E Testini karşılaştırmışlar; ÇDS ile %62.5, E testi ile % 50 oranında EBSBLa saptamları ve ÇDS yönteminin E Testine göre daha ucuz, kolay ve uygulanabilir pratik bir yöntem olduğunu bildirmiştir. Legrand ve ark. (13)'ları ise hastane kaynaklı infeksiyonlardan izole ettikleri *K.pneumoniae* suşlarında %31 oranında EBSBLa saptamlarıdır. Bauerfeind ve ark. (3)'ları sefamisinlere dirençli EBSBLa (CMY-1) varlığını bildirmişler ve bu enzimlere "Super-Extended-Beta-Laktamaz" (SEBSBLA) adını vermişlerdir. Aynı araştırmacılar SEBSBLA tayininde ÇDS yönteminde amoksisilin-klavulanik asit diskleri yerine sulbaktam-ampisilin diskinin konuğmasını, çünkü bu tür enzimlerin klavulanik asite düşük düzeyde duyarlılık gösterdiklerini bildirmiştir. EBSBLa üreten *K.pneumoniae* suşlarının oranları, ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye, hatta aynı hastane içerisindeki klinikler arasında bile farklılıklar gösterebilmektedir (5,13). Nitekim farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda Fransa'da %16, Londra'da %11, Şikago'da %20, Bangkok'ta %50 ve Dakar'da %74.6 oranında EBSBLa üreten *Klebsiella* suşları bildirilmiştir (18).

Yapmış olduğumuz çalışmada ise Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesinden izole edilen suşların %21'inde, Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesinden izole edilen suşların ise %56'sında EBSBLa enzimleri saptanmıştır. Bulgularımıza göre, Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesi yoğun bakım ünitesinde EBSBLa üreten *K.pneumoniae* suşlarının daha sıkılıkla infeksiyonlardan sorumlu olduğu görülmektedir. Bu farklılığın temelinde, lokal epidemiyolojik faktörlerin, genel infeksiyon kontrol önlemlerinin ve antibiyotik kullanım politikalarının etkili olduğu düşünülmüşür.

KAYNAKLAR

- 1- Abacıoğlu YH, Yücesoy M, Gülay Z, Yuluğ M: "Extended spectrum beta-lactamases" saptanmasında E testi ile çift disk sinerji testinin karşılaştırılması, *İnfeksiyon Derg* 9: 93 (1995).
- 2- Arlet G, Sanson-le Pors MJ, Rouveau M, Fournier G, Maric O, Schlemmer B, Philippon A: Outbreak of nosocomial infections due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-4 beta-lactamase, *Eur J Microbiol Infect Dis* 9: 797 (1990).

- 3- Bauerfeind A, Chong Y, Schweighart S: Extended broad spectrum beta-lactamase in *K.pneumoniae* including resistance to cephamycin. *Infection* 17: 316 (1989).
- 4- Bingen HE, Desjardins P, Arlet G, Bourgeois F, Mariani-Kurkdjian P, Lambert-Zechovsky NY, Denamur E, Philippon A, Elion J: Molecular epidemiology of plasmid spread among extended broad-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital, *J Clin Microbiol* 31: 179 (1993).
- 5- Brun-Buisson C, Philippon A, Ansquer M, Legrand P, Montravers F, Duval J: Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*, *Lancet ii*: 302 (1987).
- 6- Du Bois SK, Marriott MS, Amyes SGB: TEM- and SHV-derived extended-spectrum β -lactamases: Relationship between selection, structure and function, *J Antimicrob Chemother* 35: 7 (1995).
- 7- Farmer III JJ, Kelly MT: Enterobacteriaceae, "Balows A, Hausler Jr W J, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 5.baskı" kitabında s.360, Am Soc Microbiol, Washington (1991).
- 8- Gülay Z, Abacıoğlu YH, Yuluğ N: Çift disk sinerji yönteminde diskler arası uzaklığın sonuca etkisi, *İnfeksiyon Derg* 9: 89 (1995).
- 9- Hall LMC, Livermore DM, Gür D, Akova M, Akalın HE: OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1637 (1993).
- 10- Jarlier V, Nicolas M-H, Fournier G, Philippon A: Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns, *Rev Infect Dis* 10: 867 (1988).
- 11- Johnson AP, Weimbren MJ, Ayling-Smith B, Du Bois SK, Amyes SGB, George RC: Outbreak of infection in two UK hospitals caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* resistant to cefotaxime and ceftazidime, *J Hosp Infect* 20: 97 (1992).
- 12- Katsanis GP, Spargo J, Ferraro MJ, Sutton L, Jacoby GA: Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases, *Clin Microbiol Rev* 32: 691 (1994).
- 13- Legrand P, Fournier G, Bure A, Jarlier V, Nicolas MH, Decre D, Duval J, Philippon A: Detection of extended broad-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae in four French Hospitals, *Eur J Microbiol Infect Dis* 8: 527 (1989).
- 14- Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R: Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob Agents Chemother* 37: 962 (1993).
- 15- Petit A, Sirot DL, Hanal MC, Sirot JL, Labia R, Gerbaud G, Cluzel RA: Novel plasmid-mediated beta-lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* more resistant to ceftazidime than the other broad-spectrum cephalosporins, *Antimicrob Agents Chemother* 32: 626 (1988).
- 16- Philippon A, Arlet G, Lagrange PH: Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases, *Eur J Microbiol Infect Dis* 13 (Suppl 1): 17 (1994).
- 17- Philippon A, Labia R, Jacoby G: Extended-spectrum beta-lactamases, *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1131 (1989).
- 18- Quinn JP: Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13 (Suppl 1): 39 (1994).
- 19- Reish O, Ashkenazi S, Naor N, Samra Z, Merlob P: An outbreak of multiresistant *Klebsiella* in a neonatal intensive care unit, *Hosp Infect* 25: 287 (1993).
- 20- Smith CE, Tilman SB, Howell AW, Longfield RN, Jrgensen JH: Failure of ceftazidime-amikacin therapy for bacteraemia and meningitis due to *Klebsiella pneumoniae* producing an extended-spectrum beta-lactamase, *Antimicrob Agents Chemother* 34: 1290 (1990).

- 21- Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P: Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes, *Rev Infect Dis* 10: 879 (1988).
- 22- Thomson KS, Sanders CC, Washington II JA: High-level resistance to cefotaxime and ceftazidime in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Cleveland, Ohio, *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1001 (1991).
- 23- Urban C, Meyer KS, Mariano N, Rahal JJ, Flamm R, Ramussen BA, Bush K: Identification of TEM-26 beta-lactamase responsible for a major outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Antimicrob Agents Chemother* 38: 392 (1994).
- 24- Vanhoof R, Godard C, Nulens E, Nyssen HJ, Wildemauwe C, Hubrechts JM, Maes P, Hannecart-Pocorni E: Serotypes and extended spectrum beta-lactam resistance in aminoglycoside resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from two Belgian general hospitals: A seven year study, *J Hosp Infect* 24: 129 (1993).