

KLEBSIELLA PNEUMONIAE VE ESCHERICHIA COLI SUŞLARINDA DEĞİŞİK BETA-LAKTAMAZ İNHİBİTÖRLERİ KULLANILARAK GENİŞLETİLMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ ÜRETİMİNİN SAPTANMASI

Zeynep GÜLAY¹, Ayşe YÜCE², Nuran YULUĞ¹

ÖZET

Klinik örneklerden soyutlanan 72 *Escherichia coli* ve 44 *Klebsiella pneumoniae* suşunun genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz (extended spectrum β -lactamase; ESBL) üretimi, üç değişik beta-laktamaz inhibitörü (klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam) ve çift disk sinerji testi kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla, amoksisilin-klavulanik asit (AMC), sulbaktam-ampisilin (SAM) ve tazobaktam (TAZ) diskleri kullanılmıştır. Ayrıca, suşların aztreonam, sefotaksim ve seftazidime duyarlılık paternleri disk diffüzyon yöntemi ile belirlenerek, bunların ESBL varlığı ile korelasyonu da araştırılmıştır. Tazobaktam için 10 μ g'lık iki disk kullanılarak ve gerektiğinde diskler arası uzaklık azaltılarak *E.coli* suşlarından 7'sinde her üç diskle, 5'inde ise AMC ve tazobaktam diskleri ile ESBL varlığı saptanmıştır. *K.pneumoniae* suşları arasında ise, 15'i tüm beta-laktamaz inhibitörü diskleri ile, 3'ü AMC ve tazobaktam diskleriyle, 2'si sadece tazobaktam diskleri ile olmak üzere toplam 20 suşda ESBL üretimi belirlenmiştir. Zon çapları ESBL olumsuz suşlara göre daralmış olmakla birlikte, ESBL varlığı saptanan *K.pneumoniae* suşlarının % 55 (11/20)'inin ve *E.coli* suşlarının % 67 (8/12)'sinin en az bir geniş spektrumlu beta-laktam ajana duyarlı olduğu belirlenmiştir.

SUMMARY

Detection of extended spectrum beta-lactamases in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli isolates by performing disk synergy test with different beta-lactamase inhibitors.

Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production of 72 *Escherichia coli* and 44 *Klebsiella pneumoniae* isolates, was evaluated by the double disk synergy test (DDST) performed with different beta-lactamase inhibitors (clavulanic acid, sulbactam and tazobactam) and the results were compared. Amoxicillin-clavulanic acid (AMC), ampicillin-sulbactam (SAM) and tazobactam (TAZ) disks were used. The isolates were also evaluated by disk diffusion methodology for susceptibility to aztreonam, cefotaxime and ceftazidime in order to see whether a correlation between the susceptibility patterns and the DDST results existed or not. ESBL production was detected in 7 *E.coli* isolates by all inhibitors. Five additional isolates were DDST positive when TAZ and AMC disks were used. Among the *K.pneumoniae*, ESBLs were detected in 20 isolates. Of these 15 was positive with all disks, 3 were positive with AMC and TAZ and 2 were positive with only TAZ disk. When the susceptibility results were evaluated, although the inhibition zones were smaller than the ESBL negative isolates, 8 of the 12 (67 %) ESBL positive *E.coli* isolates and 11 of the 20 (55 %) *K.pneumoniae* isolates were susceptible to at least one of the extended spectrum beta-lactam agents tested.

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, 1- Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2- Klinik Bakterioloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir.

GİRİŞ

İlk kez 1983 yılında bildirilen ve plazmidlerle taşınan genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar ("extended spectrum beta-lactamases", ESBL), *Enterobacteriaceae* üyelerinin etken olduğu infeksiyonların sağaltımında giderek büyüyen bir sorun yaratmaktadır (1,6,8,12). Bunlar köken aldıkları TEM-1, TEM-2, SHV-1 gibi beta-laktamazlardan 1-4 aminoasit değişikliği ile türemiş, ana enzime kıyasla daha yavaş fakat daha geniş spektrumlu enzimlerdir (3,9). ESBL enzimleri, penisilinler ve birinci kuşak sefalosporinlerin yanısıra, sefotaksim, seftazidim, aztreonam gibi geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotikleri de inaktive ederler (1,3,9). Bakterilerin ESBL üretimi, rutin antibiyotik duyarlılık testleri ile saptanamamaktadır (6,8). Hatta, ESBL üreten bakterilerin büyük bir kısmı in-vitro şartlarda oksimino sefalosporinlere karşı düşük düzeyde direnç göstermekte, bu nedenle de yanlış olarak bu antibiyotiklere duyarlı olarak değerlendirilmektedir (5,10). Bu enzimlerin saptanmasında, klavulanik asidin ESBL aktivitesini inhibe etmesi temeline dayanan çift disk sinerji yöntemi (ÇDSY)'nin kullanılması önerilmekte, böylelikle oksimino sefalosporinlere yalancı duyarlılık gösteren bakterilerin saptandığı bildirilmektedir (6,9,10). ESBL üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin başında *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* gelmektedir (3,6). ÇDSY'nin bu türlerde rutin olarak uygulanması gerektiği belirtilmektedir (11).

ESBL varlığının gösterilmesinde standart olarak klavulanat kullanılmaktadır. Ancak, diğer beta-laktamaz inhibitörlerinin de ESBL üretimini değişik oranlarda engellediği bilinmektedir (2). Bu nedenle, çalışmamızda *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında ÇDSY'ni uygulayarak, klavulanik asidin yanısıra klinik tedavide kullanılan diğer beta-laktamaz inhibitörleri olan sulbaktam ve tazobaktamın ESBL varlığını saptayabilme etkinliğini inceledik ve sonuçlarımızı klavulanat ile elde edilenlerle karşılaştırdık. Bunun yanı sıra, suşların aztreonam, sefotaksim ve seftazidime duyarlılık paternlerini ve bunların ESBL üretimi ile korelasyonunu araştırdık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Suşlar: Çalışmaya klinik örneklerden soyutlanan 72 *E.coli* ve 44 *K.pneumoniae* suşu alınmıştır.

Antibiyotik duyarlılık testleri: Suşların aztreonam (ATM), sefotaksim (CTX) ve seftazidime (CAZ) duyarlılıkları disk diffüzyon tekniği ile saptanmıştır (7). Duyarlılık kategorilerinin incelenmesinde, ATM için ≤ 15 mm dirençli, 16-21 mm ortada, ≥ 22 mm duyarlı; CAZ için ≤ 14 mm dirençli, 15-17 mm ortada, ≥ 18 mm duyarlı, CTX için ≤ 14 mm dirençli, 15-22 mm ortada, ≥ 23 mm duyarlı olarak değerlendirilmiştir.

Çift disk sinerji yöntemi: Bu amaçla, amoksisilin-klavulanik asit (AMC, 20/10 μg), sulbaktam-ampisilin (SAM, 10/10 μg) ve tazobaktam (TAZ, 10 μg) diskleri kullanılmıştır. Mueller-Hinton agar (Oxoid) besiyeri yüzeyine McFarland 0.5 eşeline göre ayarlanmış bakteri süspansiyonu yayıldıktan sonra merkeze beta-laktamaz inhibitörü içeren disk ve çevresine, disk merkezleri arasındaki uzaklık 30 mm olacak şekilde, sefotaksim (CTX), seftazidim (CAZ), aztreonam (ATM) diskleri yerleştirilmiştir.

Bir gece 37°C'de inkübasyondan sonra sefalosporin diskleri çevresindeki inhibisyon alanının beta-laktamaz inhibitörü diskine doğru genişlemesi ESBL olumluluğu olarak değerlendirilmiştir (6,9,10). İnhibisyon zon çaplarının dar olduğu ($15 \text{ mm} >$) durumlarda, diskler arası uzaklık azaltılarak modifiye ÇDSY uygulanmıştır (4).

BULGULAR

E.coli suşlarından 7'sinde her üç diskle, 5'inde ise AMC ve TAZ diskleri ile ESBL varlığı saptanmıştır. *K.pneumoniae* suşları arasında ise, 15'i tüm beta-laktamaz inhibitörü diskleri, 3'ü AMC ve TAZ diskleri, 2'si sadece TAZ diski ile olmak üzere toplam 20 suşta ESBL üretimi belirlenmiştir. Değişik beta-laktamaz inhibitörleri ile alınan sonuçlar tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Çift disk sinerji yönteminin değişik beta-laktamaz inhibitörleri kullanılarak uygulanması ile elde edilen sonuçlar.

Tür (n)	ESBL olumlu bulunan suş sayısı			Toplam
	AMC	SAM	TAZ	
<i>E.coli</i> (72)	12	7	12	12
<i>K.pneumoniae</i> (44)	18	15	20	20
Toplam (%)	30 (94)	22 (69)	32 (100)	32

ESBL varlığı saptanan *K.pneumoniae* suşlarının % 55 (11/20)'inin ve *E.coli* suşlarının % 67 (8/12)'sinin en az bir geniş spektrumlu beta-laktam ajana duyarlı olduğu belirlenmiştir (Tablo 2). Ancak, zon çapları ESBL olumsuz suşlara göre daralmış olarak bulunmuştur (Tablo 3). İncelenen geniş spektrumlu beta-laktamlar arasında, ESBL-duyarlılık paterni ilişkisi açısından seftazidim ve aztreonamın, sefotaksim diskine kıyasla daha uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Tablo 2. ESBL üreten ve üretmeyen suşların disk diffüzyon sonuçları*.

Tür (n)	CTX ₃				ATM				CAZ			
	R	I	S**		R	I	S**		R	I	S**	
	≤14	15-22	23-30	>30	≤15	16-21	22-30	>30	≤14	15-17	18-30	>30
<i>K.pneumoniae</i>												
ESBL (+) (20)	6	8	4	2	14	3	2	0	13	2	4	1
ESBL (-) (24)	0	1	9	14	0	2	16	6	0	0	10	14
<i>E. coli</i>												
ESBL (+) (12)	4	3	4	1	8	4	0	0	9	1	2	0
ESBL (-) (60)	0	0	18	42	0	2	29	29	0	0	15	45

* Disk diffüzyon sonuçlarına göre R (dirençli), I (ortada), S (duyarlı) duyarlılık kategorilerinde bulunan suş sayıları belirtilmiştir.

**Duyarlı kategorisindeki zon çapları 30 mm'nin altı ve üstü olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.

Tablo 3. ESBL üretimi ile disk diffüzyon sonuçlarının ilişkisi.

Tür (n)	Ortalama inhibisyon zon çapı (mm)		
	CAZ	ATM	CTX
<i>K.pneumoniae</i>			
ESBL (-) (24)	34.5	30.4	37.5
ESBL (+) (20)	13.4	12.6	19.4
<i>E.coli</i>			
ESBL (-) (60)	32.7	32.7	34.6
ESBL (+) (12)	13.1	13.1	17.2

TARTIŞMA

Plazmidlerle aktarılabilen geniş spektrumlu beta-laktamazlar, *K.pneumoniae* ve *E.coli* gibi Gram-negatif çomaklarda sıklıkla bulunmakta ve bu bakterilerin üçüncü kuşak sefalosporinleri inaktive etmesini sağlayarak infeksiyonlarının sağaltımında sorun yaratmaktadır (9). ESBL üreten bakteriler, rutin antibiyogramlarda çoğu kez beta-laktam antibiyotiklere duyarlı veya orta duyarlı olarak değerlendirilmektedirler (6,8,10). Dolayısıyla, standart antibiyotik duyarlılık testleri ESBL saptanmasında yetersiz kalmaktadır. Bu enzimler, beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı olduğu için ESBL saptanmasında rezistotiplere bakılmaksızın, klavulanik asit ile üçüncü kuşak bir sefalosporin veya aztreonam arasındaki sinerjik etkiyi temel alan ÇDS yönteminin kullanılması önerilmektedir (6,10). Tablo 1 'de görüldüğü gibi, ESBL üretimi sadece AMC ile değil, SAM ve TAZ ile de saptanabilmektedir. Bu açıdan, TAZ'ın AMC'ye eşdeğer etkinlikte olduğu görülmektedir.

ESBL varlığının saptanmasında ÇDSY yanısıra, geniş spektrumlu beta-laktamlara direnç paternlerinin incelenmesi ve zon çaplarındaki daralmaların bile değerlendirilmesi gerektiği belirtilmektedir (10). Çalışmamızda, ÇDSY ile ESBL varlığı saptanan suşların % 55 - % 67'si en az bir geniş spektrumlu beta-laktam ajana duyarlı bulunmuştur. Özellikle sefotaksim diskleri ile yüksek oranda yalancı duyarlılık saptanmıştır. Diğer çalışmalarda da benzer bulgular bildirilmektedir (5,10). Ancak duyarlılık paternleri ülkeden ülkeye değişmektedir. Örneğin, ABD'de seftazidim, Fransa'da ise sefotaksim duyarlılıklarının yüksek oranda yanılıya yol açabildiği belirtilmektedir (5,10). Dolayısıyla, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) tarafından bildirilen inhibisyon zonu çaplarının ülkeye göre değerlendirilmesi gereklidir.

Sonuç olarak, rutin laboratuvarlarda ESBL üretimi sadece klavulanat ile değil, diğer beta-laktamaz inhibitörleri varlığında da gösterilebilmektedir. Geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere direnç durumu da ESBL açısından yol gösterici olabilmekle birlikte, inhibisyon zonları ile ilgili kriterlerin gözden geçirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Bush K, Jacoby GA, Mederios AA: A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure, *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1211 (1995).
- 2- Bush K, Macalintal C, Rasmussen BA, Lee VJ, Yang Y: Kinetic interactions of tazobactam with β -lactamases from all major structural classes, *Antimicrob Agents Chemother* 37: 851 (1993).

- 3- Du Bois SK, Marriott MS, Amyes SGB: TEM and SHV derived extended spectrum beta-lactamases; relation between selection, structure and function, *J Antimicrob Chemother* 35: 7 (1995).
- 4- Gülay Z, Abacıoğlu YH, Yuluğ N: Çift disk sinerji yönteminde diskler arası uzaklığın sonuca etkisi, *İnfeksiyon Derg* 9: 89 (1995).
- 5- Jacoby GA, Han P: Detection of extended spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, *J Clin Microbiol* 34: 908 (1996).
- 6- Jarlier V, Nicolas H, Fournier G, Philippon A: Extended broad spectrum beta-lactamase conferring resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae, hospital prevalence and susceptibility patterns, *Rev Infect Dis* 10: 867 (1988).
- 7- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, Standard M2-A5, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa (1993).
- 8- Philippon A, Labia R, Jacoby G: Extended spectrum beta-lactamases, *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1131 (1989).
- 9- Philippon A, Arlet G, La Grange PH: Origin and impact of plasmid mediated extended spectrum beta-lactamases, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13 (Suppl 1): S17 (1994).
- 10- Sirot J: Detection of extended-spectrum plasmid-mediated β -lactamases by disk diffusion, *Clin Microbiol Infect* 2 (Suppl 1): S35 (1996).
- 11- Swenson JM, Hindler JA, Peterson LR: Special tests for detecting antibacterial resistance, "Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 6. baskı" kitabında, s. 1356, ASM Press, Washington DC (1996).
- 12- Quinn J: Clinical significance of extended spectrum beta-lactamases, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13: 539 (1994).