

HASTANEDE YATAN HASTALARDAN VE POLİKLİNİK HASTALARINDAN İZOLE EDİLEN KLEBSIELLA PNEUMONIAE, ESCHERICHIA COLI VE ENTEROBACTER SUŞLARINDA GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ ARAŞTIRILMASI VE ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERE DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

Esragül AKINCI, Mehmet KARAHAN, Nihal KARABİBER, Hasan KILIÇ

ÖZET

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların (ESBL) neden olduğu geniş spektrumlu beta-laktam direnci tüm dünyada gittikçe artan bir problemdir.

Bu çalışmada hastanede yatan hastalardan ve poliklinik hastalarından izole edilen 459 *Escherichia coli*, 141 *Klebsiella pneumoniae* ve 55 *Enterobacter* suşunda çift disk sinerji yöntemi ile ESBL araştırılmıştır. Poliklinik ve yatan hasta grubunda *K.pneumoniae* suşlarında ESBL sırasıyla % 22 ve % 30 oranlarında bulunmuştur. *E.coli* ve *Enterobacter* suşlarında, poliklinik grubunda ESBL tespit edilmezken, yatan hasta grubunda ESBL pozitifliği sırasıyla % 9 ve % 15 oranlarında saptanmıştır.

Antibiyotik duyarlılık testleri disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. ESBL üreten suşların tümü karbapenemlere duyarlı bulunmuştur. Fluorokinolon, aminoglikozid ve trimetoprim-sulfametoksazol direnci ise yüksek oranda tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın sonucunda, hastanemizde yatan hastalarda ve poliklinik hastalarında, ESBL üreten çoklu dirençli *K.pneumoniae* suşlarının sorun olduğu görülmüştür.

SUMMARY

Detection of extended spectrum beta-lactamases in Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli and Enterobacter strains isolated from inpatients and outpatients and their susceptibility to various antibiotics.

Resistance to broad-spectrum beta-lactams, mediated by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) enzymes, is an increasing problem worldwide.

The ratio of ESBL in 459 *Escherichia coli*, 141 *Klebsiella pneumoniae* and 55 *Enterobacter* strains isolated from inpatients and outpatients was determined by double disk synergy method. ESBL production rates in *K.pneumoniae* strains isolated from outpatients and inpatients were found as 22% and 30%, respectively. While *E.coli* and *Enterobacter* strains were not ESBL producers in outpatient group, in inpatient group they were detected as ESBL producers at a ratio of 9% and 15%, respectively.

Antibiotic susceptibility tests were performed by disk diffusion method. All of the ESBL producing strains were susceptible to carbapenems. However resistance to fluoroquinolones, aminoglycosides and trimethoprim-sulfamethoxazole was high.

In conclusion, it was demonstrated that ESBL producing multiple resistant *K.pneumoniae* strains have created problems in both inpatients and outpatients in our hospital.

GİRİŞ

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (extended-spectrum beta-lactamase=ESBL) Bush sınıflamasında grup 2be'de yer almaktadır (15). Aztreonam, sefotaksim, seftazidim gibi oksimino beta-laktamları, penisilinleri ve sefalosporinleri hidroliz eden enzimlerdir (8). Bu enzimlerin çoğu TEM-1, -2 ve SHV-1 enzimlerini kodlayan genlerin mutasyonu sonucu oluşmaktadır (12). Bu mutasyon enzimin aktif bölgesine yakın aminoasitleri değiştirerek oksimino beta-laktamlara karşı afinite ve hidrolitik etkiyi arttırmaktadır (8,12). Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazları kodlayan genler transfer olabilen plazmidler üzerinde taşınmaktadır ve bu plazmidler üzerinde genellikle diğer antibiyotik direnç genleri de bulunmaktadır (6). Bazı genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar tüm oksimino beta-laktamlara yüksek düzeyde direnç sağlarken, bazılarında direnç düşük düzeyde olmakta ya da selektif olarak belli beta-laktamlara karşı gelişmektedir (8). Bu durum klinik laboratuvarlarda düşük aktivitede ESBL sentezleyen suşların tespitinde güçlük yaratmakta, bu suşlar kolaylıkla gözden kaçabilmektedir (8,10). Laboratuvarlarda ESBL üreten suşların in-vitro tanımlanabilmesi için bazı yöntemler önerilmektedir. Bunlar; antibiyotik duyarlılık testlerinde daha yüksek bakteri inokulumu kullanılması, geniş spektrumlu sefalosporinler ya da aztreonamın duyarlılığında azalma gözlenmesi, çift disk sinerji testi, üç boyutlu test, E testi gibi yöntemlerdir (1,14,15).

Bu çalışmada yaklaşık 11 aylık bir süre içerisinde hastanemizde yatan hastalardan ve poliklinik hastalarından izole edilen *K.pneumoniae*, *E.coli* ve *Enterobacter* suşlarında ESBL oranlarının tespit edilmesi ve ESBL pozitif bulunan suşların çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kasım 1998 - Eylül 1999 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden (kan, idrar, yara, abse, safra, trakeal aspirat, balgam) izole edilen 459 *E.coli*, 141 *K.pneumoniae* ve 55 *Enterobacter* suşunda çift disk sinerji testi ile ESBL araştırılmıştır. Suşların izole edildikleri hasta grubuna göre dağılımı tablo 1'de gösterilmiştir. Çalışma prospektif olarak yapılmış ve aynı hastaya ait aynı tür suşlar tekrar çalışmaya alınmamıştır. Bakteriler konvansiyonel biyokimyasal yöntemlerle tanımlanmıştır. Bakteri süspansiyonları 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanarak Mueller-Hinton agar yüzeyine yayılmıştır. Çift disk sinerji testi için, ortaya amoksisilin-klavulanat diski (AMC, 20/10 mcg), çevreye ise merkezden merkeze uzaklığı 20 mm olacak şekilde seftazidim (CAZ, 30 mcg), sefotaksim (CTX, 30 mcg) ve aztreonam (ATM, 30 mcg) diskleri konulmuştur (1). Plaklar 35 derecede 1 gece inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir. Seftazidim, sefotaksim ya da aztreonam disklerinden herhangi birinin zonunda amoksisilin-klavulanat diskine doğru belirgin genişleme olması ESBL pozitifliği olarak kabul edilmiştir (1). ESBL pozitif bulunan suşlarda disk difüzyon yöntemi ile imipenem, meropenem, siprofloksasin, ofloksasin, amikasin, gentamisin ve trimetoprim-sulfametoksazol duyarlılıklarına bakılmış ve zon çapları NCCLS kriterlerine göre değerlendirilmiştir (13).

Tablo 1. Suşların izole edildikleri hasta gruplarına göre dağılımı.

| Hasta grubu | K.pneumoniae | Enterobacter spp. | E.coli | Toplam |
|---------------------|--------------|-------------------|--------|--------|
| Poliklinik suşları | 64 | 9 | 310 | 383 |
| Yatan hasta suşları | 77 | 46 | 149 | 272 |
| Servis | 42 | 16 | 100 | 158 |
| Yoğun bakım | 35 | 30 | 49 | 114 |
| Toplam | 141 | 55 | 459 | 655 |

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi ki-kare ve Fisher'in kesin ki-kare testleri ile yapılmıştır.

BULGULAR

Çalışmada poliklinik suşlarında % 4, yatan hasta suşlarında % 16 oranında ESBL pozitifliği tespit edilmiştir. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Sonuçlar tür düzeyinde incelendiğinde, *K.pneumoniae* ve *Enterobacter* suşlarında, poliklinik ve yatan hasta grubu arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$). *E.coli* suşlarında ise aradaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

Servis ve yoğun bakım suşlarında ESBL oranları birbirine yakın tespit edilmiştir ve arada önemli bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$). Sonuçlar tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. ESBL üreten suşların izole edildikleri hasta gruplarına göre dağılımı [n (%)].

| Hasta grubu | K.pneumoniae | Enterobacter spp. | E.coli | Toplam |
|---------------------|--------------|-------------------|--------|---------|
| Poliklinik suşları | 14 (22) | 0 | 0 | 14 (4) |
| Yatan hasta suşları | 23 (30) | 7 (15) | 14 (9) | 44 (16) |
| Servis | 12 (29) | 3 (19) | 8 (8) | 23 (15) |
| Yoğun bakım | 11 (31) | 4 (13) | 6 (12) | 21 (18) |
| Toplam | 37 (26) | 7 (13) | 14 (3) | 58 (9) |

ESBL pozitif bulunan suşların 26'sı idrar, 10'u kan, dokuzu safra, biri yara, ikişer tanesi trakeal aspirat ve balgam, biri de abse kültüründen üretilmiştir. ESBL saptanan poliklinik suşlarının tamamı üroloji polikliniğinden gelen idrar kültürlerinden izole edilmiştir.

ESBL üreten suşların, disk difüzyon yöntemi ile belirlenen, çeşitli antibiyotiklere direnç oranları tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. ESBL üreten suşların çeşitli antibiyotiklere direnç oranları (%).

| Antibiyotik | Poliklinik suşları (n: 14) | Yatan hasta suşları (n: 44) |
|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Karbapenem grubu* | 0 | 0 |
| Amikasin | 21 | 20 |
| Gentamisin | 64 | 61 |
| Kinolon grubu** | 71 | 64 |
| Trimetoprim-sulfametoksazol | 100 | 98 |

*Imipenem, meropenem, **Siprofloksasin, ofloksasin.

Antimikrobiyal direnç yönünden poliklinik ve yatan hasta suşları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

TARTIŞMA

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar ilk kez 1983 yılında Almanya'da gösterilmiş ve günümüze kadar 30'un üzerinde ESBL tanımlanmıştır (12). Çoğunlukla *K.pneumoniae* suşlarında saptanan ESBL üretimi diğer Gram negatif enterik bakterilerde de gözlenmektedir (7).

Yeni kuşak sefalosporinleri etkisiz kılan ESBL'lara giderek artan oranlarda rastlanmaktadır. Ülkemizde bu konu ile ilgili olarak çeşitli merkezlerde yapılan çalışmalarda ESBL oranları yüksek bulunmuştur. Yoğun bakım hastalarından izole edilen *Klebsiella* suşlarında ESBL oranını Ankara'dan Çokça ve Tekeli (4) % 44, Kayseri'den Evrensel ve ark. (5) % 34 olarak tespit etmişlerdir. Evrensel ve ark. (5)'in araştırmalarında *E.coli*'de % 57.8, *Enterobacter spp*'de % 14.2 oranında ESBL saptanmıştır. Denizli'den Kaleli ve ark. (9) servis ve yoğun bakım hastalarından izole ettikleri *K.pneumoniae* suşlarında % 47, *Enterobacter spp*'de % 22 oranında ESBL gösterirken *E.coli* suşlarında ESBL tespit edememişlerdir. Çalışmamızda ESBL oranları biraz daha düşük bulunmuştur: Servis ve yoğun bakım suşlarında sırasıyla *K.pneumoniae*'de % 29 ve 31, *E.coli*'de % 8 ve 12, *Enterobacter spp*'de % 19 ve 13 oranlarında ESBL gösterilmiştir. Arada önemli bir fark saptanmıştır ($p>0.05$).

Avrupa ülkelerini kapsayan çok merkezli bir araştırmada yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Klebsiella* suşlarında ESBL araştırılmış, Türkiye'den gönderilen suşların % 59'unda (37/63) ESBL saptanmıştır (12).

Çalışmamızda yatan hasta suşlarında ESBL pozitifliği poliklinik suşlarından anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Sonuçlar tür düzeyinde incelendiğinde, poliklinik grubunda *K.pneumoniae* suşlarında ESBL pozitifliğinin (% 22) yüksek olduğu görülmüştür. Bu grupta *E.coli* ve *Enterobacter* suşlarında ESBL tespit edilmemiştir. Genel olarak ESBL üreten suşların hastanede yatan hastalarda tespit edilmesine rağmen poliklinik suşlarında da ESBL saptayan araştırmalar vardır. Ankara'dan Yetkin ve Arman (16) hastane dışı *Klebsiella* suşlarında % 10.8 oranında ESBL tespit etmişlerdir. İstanbul'dan Kaygusuz ve ark. (11) poliklinik hastalarından izole edilen *E.coli* ve *Enterobacter spp*'de ESBL tespit edemezken *K.pneumoniae* suşlarında % 7, *K.oxytoca* suşlarında % 18 oranında ESBL saptamışlardır. Yine İstanbul'dan Büyükbaba ve ark. (2) üriner sistem infeksiyonu etkeni olarak poliklinik hastalarından izole ettikleri *K.pneumoniae* suşlarında % 43.2, *Enterobacter spp*'de % 17.6 oranında ESBL tespit etmişler, *E.coli* suşlarında ESBL saptanmadığını bildirmişlerdir.

Yapılan epidemiyolojik araştırmalar ESBL üreten suşların ortaya çıkmasında uzun süre hospitalizasyon, yoğun bakım ya da onkoloji ünitesinde yatma, cerrahi işlem geçirme, üriner sistem kateterizasyonu, geniş spektrumlu sefalosporinleri kullanma gibi faktörlerin rol oynadığını göstermektedir (6). Bu çalışmada, ESBL pozitif bulunan poliklinik suşlarının izole edildiği hastalar hakkında yeterli bilgi edinilememiştir. Bu hastaların yakın zamanda hastaneye yatıp yatmadıkları, cerrahi işlem geçirip geçirmediikleri ve antibiyotik kullanıp kullanmadıkları bilinmemektedir. Bu nedenle bu grupta risk faktörleri tespit edi-

lememiştir. Aynı şekilde yatan hasta suşlarının da infeksiyon etkeni olup olmadıkları hakkında bilgi edinilememiştir.

ESBL genleri transfer olabilen plazmidler üzerindedir ve bu plazmidlerde sıklıkla diğer antibiyotik direnç genleri de bulunmaktadır (6). Bununla birlikte karbapenemler ve sefamisinler ESBL'lara dayanıklıdır (7). Bu çalışmada ESBL saptanan suşların tamamı imipenem ve meropeneme duyarlı bulunmuştur. Kinolon direnci ise yüksek oranda tespit edilmiştir. Suşların tamamına yakını trimetoprim-sulfametoksazole dirençli olarak saptanmıştır. Çoğu suş amikasinine duyarlı bulunurken gentamisin direnç oranı yüksek çıkmıştır. Fransa'dan Chanal ve ark. (3)'ün araştırmalarında ise, ESBL pozitif olan suşların % 74.3'ü gentamisinine duyarlı bulunurken sadece % 2.8'i amikasinine duyarlı tespit edilmiştir. Kinolon direnci % 75'in üzerinde saptanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışma, özellikle ESBL üreten *Klebsiella* suşlarının hastanemizde sorun olduğunu göstermektedir. Çoklu dirençli olan bu suşlar, yatan hastalarda olduğu gibi poliklinik hastalarının tedavisinde de güçlükler yaratmaktadır. Bu nedenle laboratuvarlarda poliklinik suşlarında da rutin olarak ESBL araştırılması, pozitif bulunduğu klinisyenin tedavi hakkında bilgilendirilmesi ve bu hastaların risk faktörleri yönünden incelenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Bal Ç: Beta-laktamaz testleri ve rutinde kullanımları, *Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı*, Özet kitabı s. 101, İstanbul (1997).
- 2- Büyükbaba Ö, Aydın D, Anđ Ö: İdrar yolu infeksiyonu etkeni Gram negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların çift disk sinerji yöntemi ile belirlenmesi, *Klinik Derg* 9:27 (1996).
- 3- Chanal C, Sirot D, Romaszko J: Survey of prevalence of extended spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae, *J Antimicrob Chemother* 38:127 (1996).
- 4- Çokça F, Tekeli E: Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarında geniş spektrumlu beta-laktamazların araştırılması, *Mikrobiyol Bült* 32:1 (1998).
- 5- Evrensel N, Koç AN, Sümerkan B: Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen Gram negatif basilelerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz saptanması, *Flora* 2:105 (1997).
- 6- Gold HS, Moellering RC: Antimicrobial drug resistance, *N Engl J Med* 335:1445 (1996).
- 7- Gür D: Beta-laktamazlar, *Flora* 2 (Ek 3):3 (1997).
- 8- Jacoby GA, Han P: Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, *J Clin Microbiol* 34:908 (1996).
- 9- Kaleli I, Özen N, Şengül M, Cevahir N, Akşit F: Gram negatif bakterilerde genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazların çift disk sinerji yöntemi ile belirlenmesi, *ANKEM Derg* 12:442 (1998).
- 10- Katsanis GP, Spargo J, Ferraro MJ: Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases, *J Clin Microbiol* 32:691 (1994).
- 11- Kaygusuz A, Öngen B, Gürler N, Töreci K: Çocuk hastalardan izole edilen Enterobacteriaceae suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı, *ANKEM Derg* 4:432 (1997).

- 12- Livermore DM, Yuan M: Antibiotic resistance and production of extended-spectrum beta-lactamases amongst *Klebsiella* spp. from intensive care units in Europe, *J Antimicrob Chemother* 38:409 (1996).
- 13- NCCLS: *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*-Sixth Edition; Approved Standard. NCCLS document M2-A6, Wayne (1997).
- 14- Thomson KS, Sanders CC: Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: Comparison of the double-disk and three-dimensional tests, *Antimicrob Agents Chemother* 36:1877 (1992).
- 15- Vahabođlu H: Beta-laktamaz tanı testlerinin rutin kullanımı ve klinik önemi, *Flora* 3:73 (1998).
- 16- Yetkin A, Arman D: *Klebsiella* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı, 8. *Türk Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi*, Kongre kitabı s. 683, Antalya (1997).