

ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI* VE *KLEBSIELLA TÜRLERİNDE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ ORANLARI*

Nuran DELİALIOĞLU, Nafize Didem ÖCAL, Gürol EMEKDAŞ

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MERSİN

ÖZET

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimleri *Enterobacteriaceae* türleri tarafından üretilirler ve penisilinler, sefalosporinler ve monobaktamların çoğunluğunu inaktive ederler. İzolatların GSBL üretiminin olup olmadığının belirlenmesi hem hastanın antibiyotik tedavisinin planlanması hem de hastane direnç paterninin bilinmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada; hastanede yatan ve poliklinik hastalarından izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* izolatlarının GSBL oluşturma oranları ve GSBL pozitif suşların çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları araştırılmıştır. Laboratuvarımızda izole edilen 514 *E.coli* suşunun 94 (% 18.3)'ünün, 175 *K.pneumoniae* suşunun 52 (% 29.7)'sinin ve 24 *K.oxytoca* suşunun 1 (% 4.2)'inin GSBL oluşturduğu saptanmıştır. GSBL oluşturanın; klinik hastalardan izole edilen *E.coli* suşlarında % 29, *K. pneumoniae*'de % 35.8, *K.oxytoca*'da % 6.7 ve poliklinik hastalarından izole edilen *E.coli* suşlarında % 7.7, *K. pneumoniae*'de % 15.4 oranında pozitif olduğu görülmüştür. Klinikte yatan hastalardan izole edilen suşların daha yüksek oranda GSBL oluşturmaları *E.coli* için de ($p<0.001$), *K.pneumoniae* için de ($p<0.01$) anlamlı bulunmuştur.

GSBL oluşturan izolatlar GSBL oluşturmayanlara göre birçok antibiyotik için anlamlı derecede daha yüksek oranda dirençli bulunmuştur. GSBL oluşturan izolatların diğer antibiyotiklere duyarlılıkları incelendiğinde iki tür için de etkili antibiyotik olarak karbapenemler belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: *E.coli*, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, GSBL, *K.pneumoniae*

SUMMARY

Rates of Extended-spectrum Beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella* Species Isolated from Various Clinical Specimens

Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) enzymes are produced by members of *Enterobacteriaceae* family and inactivate the most of the penicillins, cephalosporins and monobactams. Determination of ESBL production in clinical isolates is important in the planning of antibiotic therapy of patient and the survey of antibiotic resistance pattern within the hospital. In this study, prevalence of ESBL production of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from outpatients and inpatients and, susceptibility of ESBL positive and negative strains to various antibiotics were examined. Ninety-four (18.3 %) strains of 514 *E.coli*, 52 (29.7 %) strains of 175 *K.pneumoniae* and 1 (4.2 %) strain of 24 *K.oxytoca* were found to be ESBL producers. ESBL activity was detected in 29 % of *E.coli*, 35.8 % of *K. pneumoniae* and 6.7 % of *K.oxytoca* strains from inpatients, and in 7.7 % of *E.coli*, 15.4 % of *K.pneumoniae* isolates from outpatients. ESBL production was found significantly higher in clinical isolates of *E.coli* ($p<0.001$) and *K.pneumoniae* ($p<0.01$).

The higher rates of resistance were found in ESBL positive strains than in ESBL negative strains and the difference were significant for most of the antibiotics. When the susceptibility of ESBL producing isolates to various antibiotics were examined, carbapenems were found to be the most effective antibiotics in both species.

Keywords: *E.coli*, ESBL, extended-spectrum beta-lactamase, *K. pneumoniae*

Yazışma adresi: Nuran Delialioğlu, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MERSİN

Tel.: (0324) 337 43 00/1541-1108

e-posta:nurandel@hotmail.com

Alındığı tarih:09.02.2005, revizyon kabulü: 05.04.2005

GİRİŞ

Gram negatif patojenlerde beta-laktam direncinde beta-laktamaz oluşturma en önemli faktördür. Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler beta-laktamaz enzimleri tarafından hidrolize edilerek etkisiz şekle dönüşmektedir. En az 340 farklı beta-laktamaz enzimi tanımlanmıştır ve en önemli enzim grupları plazmidlerle kodlanan sefalosporinaz, metallo-beta-laktamaz ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlardır (GSBL)⁽³⁾. Gram negatif bakterilerin çoğunluğu kromozomal veya plazmidik olarak kodlanan beta-laktamaz enzimleri üretirler. GSBL'lerin büyük bir kısmı TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 grubu enzimlerdir. Geri kalanlar CTX-M tipi enzimler veya OXA'lardan GSBL spektrumuna sahip olanlar veya henüz gruplandırılmayan GSBL enzimleri olarak bilinmektedir. GSBL'ler tüm dünyada yayılmayı sürdürdüğü için antibiyotik tedavilerinin planlanmasında etkenin GSBL pozitif olup olmadığı bilinmelidir⁽²⁾. Bunun için çeşitli testler geliştirilmiştir. GSBL saptama yöntemleri, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) kuralları doğrultusunda tarama ve doğrulama olmak üzere iki aşamalıdır. Tarama testinde zon çapı seftazidim için ≤ 22 mm veya seftotaksim için ≤ 27 mm veya seftriakson için ≤ 25 mm veya aztreonam için ≤ 27 mm veya seftodoksım için ≤ 17 mm bulunursa GSBL kuşkusu duyulur⁽¹¹⁾. GSBL doğrulama testi olarak çift disk sinerji testi, E-test GSBL stripleri (AB Biodisk), kombine disk metodu ve GSBL kartları (Vitek, bioMerieux) kullanılmaktadır. Çift disk sinerji testinde; amoksisilin-klavulanik asit diski ile aztreonam ve geniş spektrumlu sefalosporin içeren diskler (seftazidim, seftotaksim gibi) 20-30 mm aralıkla yerleştirildiğinde amoksisilin-klavulanik asit diskine doğru zon çapının en az 5 mm genişlemesi pozitif olarak değerlendirilir. Bu test ucuz ve kolay bir test olarak kullanılabilir⁽¹⁰⁾. Organizma GSBL oluşturmuşsa tüm geniş spektrumlu sefalosporinlere, penisilinlere ve aztreonama dirençli olarak bildirilmelidir^(3,10). GSBL oluşumu *Escherichia coli* ve *Klebsiella* dışındaki *Enterobacteriaceae* türlerinde nadirdir ve indüklenebilir AmpC kromozomal enzime sahip olanlarda (*Enterobacter*, *Citrobacter* gibi) tesbit edilmesi zordur⁽¹⁰⁾. Moleküler tanı yöntemleri kullanılarak GSBL'ların ayırıcı tanımlanması yapılabilir. Bu teknikler GSBL subtiplerinin tam ayrılması için gerekli olup yalnızca araştırma için kullanılmaktadır⁽⁵⁾.

Bu çalışma hastanede yatan hastalarla poliklinik hastalarından izole edilen *E.coli*, *K.pneumoniae* ve *K.oxytoca* izolatlarının GSBL oluşturma oranını ve GSBL pozitif ve negatif suşların çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarını araştırmak amacıyla yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

1 Şubat 2004 ile 31 Aralık 2004 arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 514 *E.coli* ve 175 *K.pneumoniae* ile 24 *K.oxytoca* suşunun GSBL aktivitesi incelenmiştir. İzolatların identifikasyonu klasik yöntemlerle ve gerektiğinde ID 32GN paneli (bioMerieux) kullanılarak yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılıkları NCCLS'in önerilerine uygun olarak disk difüzyon testi ile yapılmıştır⁽¹¹⁾. GSBL aktivitesi çift disk sinerji yöntemi ile doğrulanmıştır. Bu yöntemde Thomson ve Sanders⁽¹³⁾'in uyguladıkları şekilde amoksisilin-klavulanik asit diskinin etrafına aralarındaki uzaklık 20 mm olacak şekilde seftriakson, seftotaksim, seftipim ve seftazidim diskleri yerleştirilmiştir. Disklerden herhangi birinin inhibisyon zonunda amoksisilin-klavulanik asit diskine bakan kısmında genişleme olması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Laboratuvarında uygun bir şekilde saklanan GSBL pozitif 64, negatif 50 *E.coli* suşunun ve GSBL pozitif 33, negatif 50 *K.pneumoniae* suşunun çeşitli antibiyotiklere duyarlılığı disk difüzyon yöntemi ile denenmiştir. Çalışmada *E.coli* ATCC 25922 suşu kontrol suşu olarak kullanılmıştır. İstatistik değerlendirmeler ki-kare testi ile yapılmıştır.

BULGULAR

Laboratuvarımızda izole edilen 514 *E.coli* suşunun 94 (% 18.3)'ünün, 175 *K.pneumoniae* suşunun 52 (% 29.7)'sinin ve 24 *K.oxytoca* suşunun 1 (% 4.2)'inin GSBL oluşturduğu saptanmıştır. GSBL oluşturmanın; klinikte yatan hastalardan izole edilen *E.coli* suşlarında % 29, *K.pneumoniae* suşlarında % 35.8 ve *K.oxytoca* suşlarında da % 6.7 olduğu; poliklinik hastalarından izole edilen *E.coli* suşlarında % 7.7, *K.pneumoniae* suşlarında % 15.4 oranında olduğu görülmüştür (Tablo 1). Bu farklar *E.coli* için de ($p<0.001$), *K.pneumoniae* için de ($p<0.01$) anlamlı bulunmuştur. *K.oxytoca* suşlarının sayısı bir değerlendirme için uygun değildir. Suşların izole edildiği muayene maddeleri tablo 2'de, GSBL oluşturan ve oluşturmayan *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç oranları tablo 3'de gösterilmiştir. GSBL oluşturan suşlarda her iki tür için amoksisilin-klavulanat, ampicilin-sulbaktam, gentamisin ve tobramisine, *E.coli* suşlarında kinolonlara, *K.pneumoniae* suşlarında netilmisine direnç, GSBL negatif suşlara göre, anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

Tablo 1: İzolatların GSBL oluşturma oranları.

Suşlar	Suş sayısı	GSBL pozitif Sayı	p
E.coli (klinik)	255	74	29
E.coli (poliklinik)	259	20	7.7
E.coli (toplam)	514	94	18.3
K.pneumoniae (klinik)	123	44	35.8
K.pneumoniae (poliklinik)	52	8	15.4
K.pneumoniae (toplam)	175	52	29.7
K.oxytoca (klinik)	15	1	6.7
K.oxytoca (poliklinik)	9	0	0
K.oxytoca (toplam)	24	1	4.2

TARTIŞMA

GSBL ilk olarak Avrupa'dan, daha sonra artan oranda dünyada diğer bölgelerden bildirilmiştir. Bu enzimleri üreten suşlarla oluşan infeksiyonların tedavisi problem olmaktadır. GSBL enzimleri en yüksek oranda *K.pneumoniae* izolatlarında görülmekle beraber *E.coli* ve diğer Gram negatif bakteriler de (*Enterobacter*, *Salmonella*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*) daha az oranda GSBL oluşturmaktadırlar⁽⁷⁾. GSBL pozitif bakterilerle olan infeksiyonlarda birçok antibiyotigin etkisiz kalabilmesi nedeniyle antibiyotik tedavilerinde etkenin GSBL oluşturup oluşturmadığı bilinmelidir⁽²⁾.

Ülkemizde bu konu ile ilgili olarak çeşitli merkezlerde yapılan çalışmalarda farklı oranlar elde edilmiştir. Ancak ortak olan özellik *K.pneumoniae* suşlarında *E.coli* suşlarından daha yüksek oranda GSBL oluşumu saptanmasıdır. Örneğin *K.pneumoniae* ve *E.coli* suşlarında GSBL oluşturma için Bülüç ve ark.⁽⁴⁾ sırasıyla % 48 ve % 14; Tünger ve ark.⁽¹⁴⁾ (nozokomiyal suşlar) % 41.7 ve % 13.4; Kiremitçi ve ark.⁽⁹⁾ % 42 ve % 23.3; Gönüllü ve ark.⁽⁶⁾ % 52 ve % 40 oranlarını bildirmişlerdir. Çalışmamızda da bu iki oran % 29.7 ve % 18.3 olarak bulunmuştur. Yurt dışındaki yayınlar da genelde *K.pneumoniae* suşlarında GSBL oluşumunu *E.coli* suşlarından daha yüksek bildirirken, Datta ve ark.⁽⁵⁾'ninki gibi nadir çalışmalarda ters oranlar da bildirilmiştir (% 12.5 ve % 16.1). GSBL oluşturma hastane suşlarında toplumdaki izole edilen suşlara göre daha yüksek bulunmaktadır. Çalışmamızda yatan ve poliklinik hastalarından izole edilen *K.pneumoniae* suşlarında GSBL pozitiflik oranı sırasıyla % 35.8 ve % 15.4 (p<0.01), *E.coli* suşlarında sırasıyla % 29 ve % 7.7 (p<0.001) bulunmuştur. Bu oranları Aydemir ve ark.⁽¹⁾ *K.pneumoniae* için % 32.8 ve % 20.1, *E.coli* için % 19.9 ve % 8.2; Karavelioğlu ve ark.⁽⁸⁾ *K.pneumoniae* için % 38.9 ve % 4.6; *E.coli* için % 26.1 ve % 2 olarak bulmuştur. Hastanelerde de yoğun bakım ünitesinden izole edilen suşların daha yüksek oranda GSBL oluşturduğu görülmektedir. Örneğin Villegas ve ark.⁽¹⁵⁾ yoğun bakım ve diğer ünitelerden izole edilen *K.pneumoniae* suşlarında sırasıyla % 32.6 ve % 29.8, *E.coli*

Tablo 2: Suşların izole edildiği muayene maddeleri [n (%)].

Muayene maddesi	E.coli			K.pneumoniae			K.oxytoca		
	GSBL +	GSBL -	Toplam	GSBL +	GSBL -	Toplam	GSBL +	GSBL-	Toplam
İdrar	65 (16)	340	405	11 (16)	59	70	0	5	5
Trakeal aspirat	5 (56)	4	9	26 (57)	20	46	0	6	6
Abse	4 (22)	14	18	1	0	1	0	-	-
Yara materyali	17 (30)	40	57	6 (30)	14	20	0	5	5
Kateter kültürü	0	5	5	5 (29)	12	17	0	3	3
Kan	0	4	4	1 (6)	15	16	1	2	3
Vücut sıvıları*	3 (30)	7	10	0	1	1	0	0	0
BAL**	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Diğer	0	6	6	1	2	3	0	2	2
Toplam	94 (18.3)	420	514	52 (29.7)	123	175	1 (4.2)	23	24

*Normalde steril sıvılar, ** Bronkoalveolar lavaj sıvısı. Dokuzdan küçük sayılar için oran verilmemiştir.

Tablo 3: Çeşitli antibiyotiklere denenen GSBL pozitif ve negatif *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında direnç [n (%)].

Suşlar	AMC	SAM	İMP	MER	TZP	AK	GN	NET	TOB	CIP	OFX
GSBL pozitif <i>E.coli</i> (n:64)	48 (75)*	42 (66)*	0	0	3 (5)	0	39 (61)*	2 (3)	27 (42)*	49 (77)*	49 (77)*
GSBL negatif <i>E.coli</i> (n:50)	9 (18)	11 (22)	0	0	1 (2)	0	9 (18)	1 (2)	5 (10)	14 (28)	14 (28)
GSBL pozitif <i>K.pneumoniae</i> (n:33)	18 (55)*	24 (73)*	0	0	0	2(6)	17 (52)*	17 (52)*	16 (48)*	0	0
GSBL negatif <i>K.pneumoniae</i> (n:50)	8 (16)	8 (16)	0	0	0	0	6 (12)	0	1 (2)	2 (4)	2 (4)

AMC: Amoksisilin-klavulanat, SAM: Ampisilin-sulbaktam, IMP: İmipenem, MER: Meropenem, TZP: Piperasilin-tazobaktam, AK: Amikasin, GN: Gentamisin, NET: Netilmisin, TOB: Tobramisin, CIP: Siprofloksasin, OFX: Ofloksasin. GSBL pozitif suşlarda negatif suşlara göre direnç yüksekliği *: p<0.001, diğer farklar p>0.05.

suşlarında % 11.8 ve % 8.4 GSBL pozitifliği bildirmişlerdir. GSBL pozitif suşlarda diğer antibiyotiklere direnç oranı da, çalışmamızda olduğu gibi (Tablo 3), GSBL negatif suşlardakinden genellikle daha yüksek bulunmaktadır. *K.pneumoniae* için kinolonlarda aldığımız tersine sonuç anlamsızdır ($p>0.05$), sayının azlığı nedeniyle değerlendirmeye alınmaz. Yavuzdemir ve ark.⁽¹⁷⁾ da bulgularımızla uyumlu şekilde GSBL pozitif *E.coli* suşlarında karbapenemleri ve amikasinini, Gönüllü ve ark.⁽⁶⁾ *K.pneumoniae* suşlarında kinolonları çok etkili bulmuşlardır. Yakupoğulları ve ark.⁽¹⁶⁾'nın, yurt dışından Spanu ve ark.⁽¹²⁾ ile Villegas ve ark.⁽¹⁵⁾'nin çalışmaları ile bulgularımız arasında ise bazı önemli farklılıklar vardır. Duyarlılık deneyi sonuçlarında ülkelere, bölgelere hatta hastanelere ve hastanelerin çeşitli bölümlerine göre farklılık bulunması beklenen bir durum ise de, *E.coli* suşlarında kinolonlara bulduğumuz yüksek direnç; *K.pneumoniae* suşlarında ise kinolonlara direnç bulunmaması; amoksisilin-klavulanik asite her iki türde bulduğumuz yüksek direnç; *E.coli* suşlarında netilmisine bulduğumuz yüksek duyarlılık daha fazla sayıda suşla yapılacak; direnç mekanizmalarının araştırılacağı ve sonuçların hastanemizdeki çeşitli antibiyotiklerin kullanım miktarları da dikkate alınarak yorumlanacağı daha geniş çalışmalara gereksinim olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak laboratuvarında izole edilen başta *K.pneumoniae* ve *E.coli* olmak üzere bütün *Enterobacteriaceae* suşlarında GSBL oluşturmanın çift disk sinerji testi gibi oldukça kolay bir yöntemle araştırılmasının, GSBL pozitif suşlarla olan infeksiyonların tedavisinde klinisyene yardımcı olunmasının gereği bu çalışma ile de ortaya çıkmıştır.

KAYNAKLAR

1. Aydemir Ş, Uluer S, Akıncı P, Tünger A, Çilli F, Özinel MA: Toplum ve hastane kökenli Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae kökenlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin araştırılması, XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre kitabı s.392, Kuşadası (2004).
2. Bal Ç: Beta-laktamazlar: Güncel durum, Flora 2003;8(2):111-23.
3. Bush K: New beta-lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy, Clin Infect Dis 2001; 32(7):1085-9.
4. Büllüç M, Gürol Y, Bal Ç: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz oranları: 2000-2002, Türk Mikrobiyol Cem Derg 2003;33(1):31-4.
5. Datta P, Thakur A, Mishra B, Gupta V: Prevalence of clinical strains resistant to various beta-lactams in a tertiary care hospital in India, Jpn J Infect Dis 2004;57(4):146-9.
6. Gönüllü N, Aktaş A, Salcıoğlu M, Bal Ç, Anđ Ö: Comparative in vitro activities of five quinolone antibiotics, including gemifloxacin, against clinical isolates, Clin Microbiol Infect 2001; 7(9):499-503.
7. Jacoby GA, Medeiros AA: More extended-spectrum beta-lactamase, Antimicrob Agents Chemother 1991;35(9):1697-704.
8. Karavelioğlu S, Karatuna O, Söyletir G: Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde infeksiyon etkeni olarak saptanan Enterobacteriaceae izolatlarında GSBL bulunma sıklığı, 6. Antimikrobik ve Kemoterapi Günleri, Toplantı kitabı s. 161, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, İstanbul (2004).
9. Kiremitçi A, Durmaz G, Aybey A, Us T, Akgün Y: Escherichia coli ve Klebsiella suşlarında NCCLS tarama ve fenotipik doğrulama yöntemleriyle genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) varlığının araştırılması, XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre kitabı s. 340, Kuşadası (2004).
10. Livermore DM, Brown DFJ: Detection of beta-lactamase-mediated resistance, J Antimicrob Chemother 2001;48(Suppl 1):59-64.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests; Approved Standard-Eighth edition, NCCLS document M2-A8, NCCLS, Wayne, PA (2003).
12. Spanu T, Luzzaro F, Perilli M, Amicosante G, Toniolo A, Fadda G, and The Italian ESBL Study Group: Occurrence of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae in Italy: Implications for resistance to β -lactams and other antimicrobial drugs, Antimicrob Agents Chemother 2002;46(1):196-202.
13. 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 1992; 36(9):1877-82.
14. Tünger Ö, Arısoy AS, Özbakkaloğlu B, Gazi H: Nozokomiyal Gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu ve kromozomal beta-laktamaz varlığının araştırılması, Flora 2001;6(1):37-41.
15. 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.
16. Yakupoğulları Y, Aşçı Toraman Z, Kizirgil A: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten kan izolatu Klebsiella suşlarına karşı beta-laktamaz inhibitörlü antibiyotiklerin in-vitro etkinliği, ANKEM Derg 2004;18(2): 109-12.
17. Yavuzdemir Ş, Aysev AD, Güriz H: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz yapan E. coli suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları, Türk Mikrobiyol Cem Derg 2003;33(2):126-9.