

Hastane İnfeksiyonu Etkeni Gram-Negatif Bakterilerde Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Varlığının Saptanması#

Dr. Murat DİZBAY*, Dr. Resul KARAKUŞ**,
Dr. Dilek ARMAN**

* Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı,
** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyojisi ve
İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Hastane infeksiyonu etkeni *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. ve daha az sıklıkta *Pseudomonas aeruginosa* izolatları arasında beta-laktam ilaçlara direncin en sık nedeni olan genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) varlığı, çift disk sinerji (ÇDS) yöntemi ile araştırılmış ve bu mikroorganizmalarda sırasıyla %12, %33 ve %17 oranında GSBL saptanmıştır. *P. aeruginosa* suşlarının 6/8'inde, substrat olarak kullanılan beta-laktam ajanlardan sadece sefepim ile gösterilen GSBL varlığı saptanmıştır. Bu durum, test duyarlılığının kullanılan enzim substrat profiline ve diskler arası mesafeye göre değiştiği ÇDS yönteminde sefepimin kullanılmasının GSBL varlığının saptanmasında duyarlılığı arttırabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Nozokomiyal İnfeksiyon, GSBL, Çift Disk Sinerji, Sefepim.

SUMMARY

Investigation of Extended Spectrum Beta-Lactamase Production Among Nosocomial Gram-Negative Microorganisms

Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production which is an important cause of beta-lactam resistance

among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. and less frequently *Pseudomonas aeruginosa* isolates, were found 12%, 33% and 17% respectively using double disk synergy (DDS) method. ESBL was detected only when cefepime was used as a substrate in 6/8 of *P. aeruginosa* isolates. Since sensitivity of DDS method may differ according to enzyme substrate profiles and the distance between discs, using cefepime as a substrate in DDS method may increase the sensitivity of the detection of ESBL.

Key Words: Nosocomial Infection, ESBL, Double Disk Synergy, Cefepime.

Bu çalışma, 15. Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL), hastane infeksiyonu etkeni gram-negatif bakteriler arasında geniş spektrumlu sefalosporinlere direncin en önemli nedenidir. Sıklıkla *Klebsiella* spp. ve *Escherichia coli* suşlarında saptanmakla birlikte *Pseudomonas*, *Proteus*, *Acinetobacter* türlerinde ve Enterobacteriaceae ailesinin diğer üyelerinde de görülmektedir.

Klinikte GSBL üreten suşlarla oluşan infeksiyonların tedavisi sorun oluşturabilmektedir. Bu suşlarla oluşan infeksiyonların tedavisinde penisilinler, üçüncü kuşak sefalosporinler ve monobaktamlar kullanılamamakta, karbapenemler, kısmen beta-laktamaz inhibitörlü kombinasyon-

lar ve sefamisinler tedavide yer almaktadırlar. Önceleri, dördüncü kuşak bir sefalosporin olan sefepimin GSBL ile hidrolize olmadığı ve bu suşlarla oluşan enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilirdiği belirtilirken, artık "National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)" tarafından sefamisinler hariç penisilin veya sefalosporin grubu antibiyotiklerin kullanılmaması önerilmektedir (1-5).

GSBL üretiminin gösterilmesi amacıyla değişik yöntemler uygulanabilmektedir. En yaygın olarak kullanılan çift disk sinerji (ÇDS) yöntemi- dir (6).

Gram-negatif bakterilerdeki GSBL üretim sıklığı ülkeler, şehirler, hatta aynı şehirdeki hastaneler arasında farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle her merkezin kendi direnç durumunu saptaması gerekmektedir.

Biz çalışmamızda, hastanemizdeki yatan hastalardan izole edilen gram-negatif bakterilerdeki GSBL sıklığını ÇDS yöntemiyle araştırmayı amaçladık.

MATERYAL ve METOD

Çalışmaya Ocak 1999-Haziran 1999 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde izole edilen nozokomiyal enfeksiyon etkeni olan *Klebsiella* türleri, *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşları alındı. Çalışma kapsamına alınan mikroorganizmalarla oluşan nozokomiyal enfeksiyonların tanısında "Centers for Disease Control and Prevention (CDC)" tanımlamaları kullanıldı (7). Mikroorganizmaların izole edildiği klinik örnekler Tablo 1'de sunulmuştur.

Bakterilerin identifikasyonu için klasik yöntemlerin yanı sıra BBL-Crystal Identification (Enteric/Non fermenter ID kit) sistemi kullanılarak tanımlanmış 47 *P. aeruginosa*, 33 *Klebsiella* (16 *K. pneumoniae*, 17 *K. oxytoca*), 74 *E. coli* suşu çalışmaya alındı. Bakterilerin antimikrobiyal duyarlılığı NCCLS kriterlerine göre disk difüzyon yöntemi ile, GSBL varlığı ise ÇDS yöntemi ile aztreonam (ATM), seftazidim (CAZ), sefotaksim (CTX), sefepim (FEP) ve sinerji için amoksisilin-klavulanik asit (AMC) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Mueller Hinton Agar (Oxoid) besiyerine, McFarland 0.5 bulanıklıkta hazırlanan bakteri süspansiyonundan ekim yapıldı. Besiyerinin merkezine amoksisilin + klavulanik asit (20 + 10 µg) diski ve çevresine de disk merkezleri arasındaki uzaklık 30 mm olacak şekilde (*P. aeruginosa* için 20 mm) seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg), aztreonam (30 µg) ve sefepim (30 µg) diskleri (Oxoid) yerleştirildi. 35°C'de bir gece inkübe edildikten sonra oluşan inhibisyon zonunun amoksisilin-klavulanik asit yönünde genişlemesi veya arada üreme olmamış zon bulunması, GSBL pozitifliği olarak değerlendirildi (Resim 1).

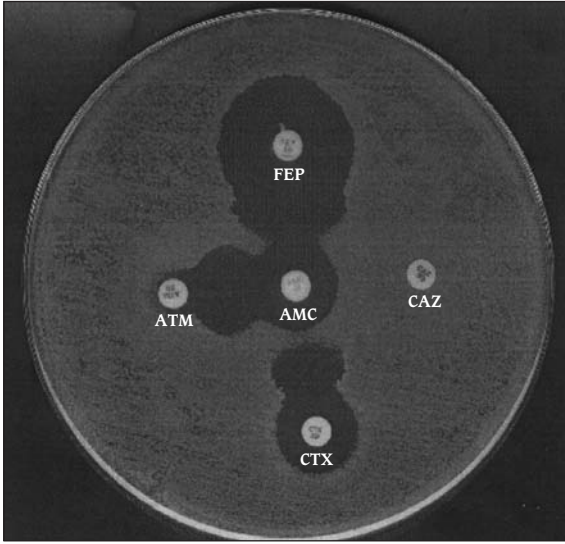
BULGULAR

ÇDS testi ile 47 *P. aeruginosa*'nın 8 (%17)'inde, 33 *Klebsiella* (16'sı *K. pneumoniae*, 17'si *K. oxytoca*)'nın 11 (6'sı *K. pneumoniae*, 5'i *K. oxytoca*)'nde (%33.3) ve 74 *E. coli* suşunun 9 (%12)'unda GSBL pozitif olarak saptandı. Sekiz *P. aeruginosa*'nın sekizinde FEP, ikisinde FEP'e ek olarak CTX, CAZ ve ATM ile GSBL pozitif olarak saptandı. GSBL pozitif olan suşların yedisinde NCCLS kriterleri-

Tablo 1. Mikroorganizmaların İzole Edildiği Klinik Örnekler.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
İdrar	53	28	10
Trakeal aspirat	4	-	23
Yara	15	3	7
Dren	-	-	2
Balgam	1	-	2
BOS	-	-	1
Kan	1	1	2
Plevra sıvısı	-	1	-
Toplam	74	33	47

BOS: Beyin omurilik sıvısı.



Resim 1. GSBL Pozitif Olarak Değerlendirilen Bir *K. pneumoniae* Suşu.

ne göre in vitro olarak bütün antibiyotiklere direnç varken, biri bütün antibiyotiklere duyarlı idi.

Onbir *Klebsiella* suşunun (6'sı *K. pneumoniae*, 5'i *K. oxytoca*) 11'inde FEP, sekizinde CTX ve ATM, üçünde CAZ ile GSBL pozitifliği saptandı. Bu suşların in vitro duyarlılık testinde yedisi FEP'e, iki tanesi ATM'ye, birer tanesinde CTX ve AMC'ye duyarlı idi. Hepsi CAZ'a dirençli idi.

Dokuz *E. coli* suşunun sekizinde FEP ve CTX ile yedisinde CAZ ve ATM ile GSBL pozitif olarak saptandı. Bu suşların in vitro duyarlılık testinde hepsi FEP'e, yedisi CTX ve ATM'ye, altısı CAZ'a üçüde AMC'ye duyarlı idi.

Toplam 28 suşun 27'sinde FEP ile GSBL pozitifliği saptanırken, 14 suşta CAZ ile GSBL pozitif idi.

GSBL üreten suşlarda GSBL aktivitesinin saptandığı antibiyotikler ve suşların bu antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. GSBL Üreten Suşlarda, GSBL Aktivitesinin Saptandığı Antibiyotikler ve Suşların Bu Antibiyotiklere İn Vitro Duyarlılıkları.

	GSBL pozitifliği (n)				İn vitro duyarlılık (n)				
	FEP	CTX	ATM	CAZ	FEP	CTX	ATM	CAZ	AMC
<i>E. coli</i> (n= 9)	8	8	7	7	9	7	7	6	3
<i>Klebsiella</i> (n= 11)	11	8	8	3	7	1	2	-	1
<i>P. aeruginosa</i> (n= 8)	8	2	2	2	1	1	1	1	1
Toplam (n= 28)	27	18	17	12	17	9	10	7	5

FEP: Sefepim, CTX: Sefotaksim, ATM: Aztreonam, CAZ: Seftazidim, AMC: Amoksisilin-klavulanik asit.

TARTIŞMA

Nozokomiyal infeksiyon etkeni gram-negatif bakteriler arasında giderek artan direnç, önemli bir problem olmaya devam etmektedir. Bu nedenle, bu bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının ve direnç profillerinin izlenmesi, direncin engellenmesi için önlem alınabilmesi, uygun ve etkili tedavilerin uygulanabilmesi yönünden önemlidir.

GSBL üretimi klinikte beta-laktamlara dirençin başlıca sebebidir. GSBL sıklığı, antibiyotik kullanım politikalarına bağlı olarak ülkeler, hastaneler ve hatta hastanelerin farklı klinikleri arasında değişiklik gösterebilmektedir. Genel olarak GSBL üretiminin *Klebsiella* türlerinde daha yaygın olduğu, diğer gram-negatif enterik basillerde bu oranın daha düşük olduğu bildirilmektedir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda GSBL sıklığı *Klebsiella* türlerinde %14.9-47, *E. coli*'de %0-57.8 arasında bildirilmiştir (8-11). Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde "National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS)"de test edilen *K. pneumoniae* suşlarının %5'inin GSBL ürettiği; Avrupa'da ise bu oranın daha yüksek olduğu, Fransa ve İngiltere'de GSBL üretiminin klinik *Klebsiella* izolatları arasında %14-16 oranında olduğu hatta bazı bölgelerde veya hastanelerde bu oranın %40'lara ulaştığı belirtilmiştir (12). 1998-2000 yılları arasında Tayvan'da GSBL üretimi *K. pneumoniae* klinik izolatları arasında %8-30, *E. coli* izolatları arasında ise %1.6-6.7 olarak rapor edilmiştir (13). Vatopoulos ve arkadaşlarının Yunanistan'da yaptıkları bir çalışmada ise *E. coli* suşlarının %4'ünün GSBL ürettiği saptanmıştır (14). Bizim çalışmamızda GSBL sıklığı *Klebsiella* türlerinde %33, *E. coli*'de %12, *P. aeruginosa*'da %17 olarak bulunmuştur. Sonuçlarımız, genel olarak Avrupa ve ABD'de saptanan oranlardan yüksek olmakla

birlikte, ülkemizde yapılan diğer çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

P. aeruginosa'da direnç durumu biraz farklılık göstermektedir. Bu bakterilerde, indüklenebilir kromozomal AmpC beta-laktamaz üretimi nedeniyle, karbapenemler ve dördüncü kuşak sefalosporinler hariç diğer beta-laktam ilaçlara direnç vardır. Son yıllarda ise OXA-tip (oksasilinaz), PER-1, TEM-42 ve SHV-2a gibi GSBL'lerin üretimi gösterilmiştir (15-17). *Pseudomonas* türleri arasındaki GSBL sıklığı hakkında çalışma sayısı sınırlıdır. Ülkemizde Derbentli ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *Pseudomonas* türlerinde GSBL oluşturma oranı %37 olarak bildirilmiştir (18). Vahaboğlu ve arkadaşlarının ülkemizde yaptıkları bir çalışmada, hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının %11'inde PER-1 tipi GSBL varlığı saptanmıştır (19).

ÇDS yöntemi, GSBL varlığının araştırılmasında en sık kullanılan yöntemlerden biridir (20). Bu yöntemde, klavulanik asit içeren disk geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonam içeren disklerle yakın olarak yerleştirilir ve beta-laktamaz aktivitesi, klavulanik asit tarafından inhibe edilen test suşlarını göstermek amacıyla kullanılır. Ancak bu yöntemin duyarlılığı da enzimin substrat profiline, diskler arası mesafeye ve değerlendiricinin deneyimine göre değişmektedir (6). Jacoby ve Han'ın çalışmasında GSBL üretiminin gösterilmesi için standart 30 µg'lık diskler yerine 5 µg'lık seftazidim diskleri kullanılması önerilmiştir (21). NCCLS tarafından yayınlanan kriterlere uygun olarak çalışıldığında dahi GSBL varlığı her zaman saptanamayabilir (22). Farklı GSBL tipleri için optimal substrat profili farklı olabileceğinden, rutinde tek bir beta-laktam ajanla test uygulanması bu enzimleri saptamada yetersiz kalmaktadır. GSBL üreten suşlarla yapılan, GSBL üretiminin ÇDS yöntemi ile araştırıldığı bir çalışmada, seftazidim diski ile %79, aztreonam diski ile %95 oranında pozitiflik saptandığı rapor edilmiştir (23). Özellikle indüklenebilir AmpC kromozomal beta-laktamazını yüksek düzeyde sentezleyen (dereprese mutant) *Enterobacteriaceae* suşlarında, inhibisyon zonu oluşmaması veya küçük inhibisyon zonu oluşması nedeniyle sinerji testi negatif sonuç verebilmektedir. Böyle durumlarda diskler arası mesafenin 20 mm tutulması veya kromozomal beta-laktamazlardan çok az etkilenen sefepim veya sefpi-

rom disklerinin kullanılarak deneyin tekrarlanması önerilmektedir (24). Bizim çalışmamızın sonuçları bu öneriyi destekler niteliktedir. Çalışmamızda, hastane enfeksiyonu etkeni gram-negatif mikroorganizmalar arasında sefepim ile gösterilebilen GSBL varlığı yüksek sıklıkta gözlemlendi. Mevcut kriterler ile *P. aeruginosa*'da 1/8, *Klebsiella*'da 7/11, *E. coli*'de 9/9 suş, in vitro NCCLS kriterlerine göre sefepime duyarlılık göstermekle birlikte GSBL pozitifliği göstermektedir. Özellikle *P. aeruginosa*'da GSBL sıklığının nispeten yüksek saptanması sadece sefepim ile görülebilen beta-laktamaz varlığı ile ilişkili olabilir. Çünkü *P. aeruginosa*, *Enterobacter*, *Serratia* türleri gibi AmpC kromozomal beta-laktamazları içeren türlerde, sefepim bu enzimlerden seftazidim, seftaksim ve aztreonama göre daha az etkilendiği için, GSBL üretiminin gösterilmesi açısından daha uygun bir indikatör olarak değerlendirilmektedir (24,25). Bu durum, 1998 yılı öncesinde üçüncü kuşak sefalosporinler için olduğu gibi sefepim için GSBL varlığı söz konusu olduğunda da duyarlı sonuç eldesine yol açmayacak yeni duyarlılık kriterlerinin gerekliliğini gösterebileceği gibi; GSBL pozitif suşlar ile meydana gelen enfeksiyonlarda gözlenebilen sefepim klinik başarısını da göz önüne alarak, klinikte ihmal edilebilir bir durum olduğu fikrini verebilir. Tayvan'da yapılan bir çalışmada *K. pneumoniae* suşları arasında CTX-M tipi GSBL varlığının saptanmasında sefepimin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerine bakılmasının prediktif değeri olduğu belirtilmiştir (26). Buna göre MİK 8 µg/mL ise CTX-M tipi beta-laktamaz varlığını, ≤ 1 µg/mL ise enzim olmadığını göstermektedir. Arada kalan değerlerde ise seftazidimin MİK değerlerine göre karar verilmesi önerilmektedir. Sonuç olarak, sefepimin fenotipik olarak CTX-M tipi GSBL varlığı düşünülen *K. pneumoniae* suşlarına karşı alternatif bir tedavi olduğu ve bunun da klinikte karbapenemlere dirençli suşların gelişimini azaltacağı belirtilmiştir (26).

Çalışmamızda *P. aeruginosa* suşları arasında GSBL oluşturma sıklığının yüksek oranda olması pek sık gözlenen bir bulgu değildir. Bunun nedeni olarak, çalışmamızda substrat olarak FEP'in kullanılmış olmasının testin/araştırmanın duyarlılığını arttırdığı, ÇDS yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda mutlaka FEP'in indikatör olarak kullanılması gerektiği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Gould IM. Do we need fourth-generation cephalosporins? Clin Microbiol Infect 1999;5:1-5.
2. Struelens MJ, Byl B, Vincent JL. Antibiotic policy: A tool for controlling resistance of hospital pathogens. Clin Microbiol Infect 1999;5:19-24.
3. Demey HE, Jansens H, Van Laer F, Ieven M, Goossens H, Bossaert LL. Strategies for selecting antibiotics in intensive care units. Clin Microbiol Infect 1999;5:29-34.
4. Powers JH, Scheld WM. Cefepime: A new beta-lactamase-resistant broad spectrum cephalosporin. Resident & Staff Physician 1996;42:46-52.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards 2000. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Tenth informational supplement (aerobic dilution) M100-S10. NCCLS, Wayne PA.
6. Gülay Z, Küçükgüven Biçmen M, Yuluğ N. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığının saptanmasında kullanılan çeşitli yöntemlerin değerlendirilmesi. ANKEM Dergisi 1998;12:514-21.
7. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. Am J Infect Control 1988;16:128-40.
8. Kaleli İ, Özen N, Şengül M, Cevahir N, Akşit F. Gram-negatif bakterilerde genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazların çift disk sinerji yöntemi ile belirlenmesi. ANKEM Dergisi 1998;12:442-6.
9. Akyıldız R, Altunay H, Özsoy MF, Koçak N, Çavuşlu Ş, Yenen OŞ. K. pneumoniae suşlarında çift disk sinerji testi ve üç boyutlu test ile ESBL sıklığının araştırılması. 3. Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik-Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler (16-22 Mayıs 1997, Kuşadası) Kongre Kitabı. 1997:335.
10. Büyükbaba Ö, Aydın D, Ağı Ö. İdrar yolu infeksiyonu etkeni gram-negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların çift disk sinerji yöntemi ile belirlenmesi. KLİMİK Dergisi 1996;9:27.
11. Evrensel N, Koç AN, Sümerkan B. Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen gram-negatif basillerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığının saptanması. Flora 1997;2:105.
12. Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998;11:589-603.
13. Hsueh PR, Liu CY, Luh KT. Current status of antimicrobial resistance in Taiwan. Emerg Infect Dis 2002;8:132-7.
14. Vatopoulos A, Philippon A, Tzoubelekis LS, Kominou Z, Legakis NJ. Prevalance of a transferable SHV-5 type beta-lactamase in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in Greece. J Antimicrob Chemother 1990;26:635-48.
15. Pechere JC, Köhler T. Patterns and modes of beta-lactam resistance in P. aeruginosa. Clin Microbiol Infect 1999;5:15-8.
16. Mugnier D, Dubrous P, Casin I, Arlet G, Collatz E. A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:2488-93.
17. Danel F, Hall LMC, Gür D, Livermore DM. OXA-16, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, from two Pseudomonas aeruginosa isolates. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:3117-22.
18. Derbentli S, Katrancı H, Nakipoğlu Y. Gram-negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların belirlenmesinde üç boyutlu yöntem ve çift disk sinerji yönteminin karşılaştırılması. ANKEM Dergisi 1996;10:1-3.
19. Vahaboğlu H, Öztürk R, Aygun G, et al. Widespread detection of PER-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial Acinetobacter and Pseudomonas aeruginosa isolates in Turkey: A nationwide multicenter study. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:2265-9.
20. Jarlier V, Nicolas H, Fournier G, Philippon A. Extended broad spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: Hospital prevalence susceptibility patterns. Rev Infect Dis 1988;10:867-78.
21. Jacoby GA, Han P. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. J Clin Microbiol 1996;34:908-11.
22. Tenover FC, Mohammad MJ, Gorton TS, Dembek ZF. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: Survey of laboratories in Connecticut. J Clin Microbiol 1999; 37:4065-70.
23. Coudron PE, Moland ES, Sander CC. Occurrence and detection of extended spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae at a Veterans Medical Center; seek and you may find. J Clin Microbiol 1997;35:2593.
24. Sirot D. Detection of extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases by disc diffusion. Clin Microbiol Infect 1996;2(Suppl 1):35-9.
25. 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 extended-spectrum beta-lactamase detection methods. J Clin Microbiol 2001;39:2864-72.
26. Yu WL, Pfaller MA, Winokur PL, Jone RN. Cefepime MIC as a predictor of the extended spectrum beta-lactamase type in Klebsiella pneumoniae, Taiwan. Emerg Infect Dis 2002;8:522-4.

YAZIŞMA ADRESİ

Uzm. Dr. Murat DİZBAY

Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı

Sıhhiye - ANKARA

Makalenin Geliş Tarihi: 05.09.2002 Kabul Tarihi: 14.08.2003