

---

# Nozokomiyal Gram Negatif Bakterilerde Genişlemiş Spektrumlu ve Kromozomal Beta-laktamaz Varlığının Saptanması<sup>#</sup>

Çiğdem KUZUCU\*, Mihriban KABAKÇIOĞLU\*, Ayfer ÖZİŞİK\*,  
Figen OSMANOĞLU EZEN\*\*, Nilgün S. ACAR\*

\* Sağlık Bakanlığı Ankara Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı,

\*\* Sağlık Bakanlığı Ankara Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, ANKARA

## ÖZET

Plazmid kontrolünde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz veya kromozomal indüklenebilir beta-laktamaz sentezleyen suşlar hastanelerde yaygındır. Hastane kökenli suşlarda beta-laktamaz yapımının ortaya çıkarılması, tedavide kullanılacak antibiyotiklerin seçiminde yol göstermesi bakımından önemlidir.

Bu çalışma hastanemizde genişlemiş spektrumlu ve kromozomal beta-laktamaz sıklığını saptamak ve rutin incelemeye gerek olup olmadığını incelemek amacıyla yapıldı. Hastanemizde Kasım 1996-Haziran 1997 tarihleri arasında Enfeksiyon Kontrol Komitesi tarafından nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak tanımlanan 138 gram negatif bakteri çalışma kapsamına alındı. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazları (ESBL) saptamak için çift disk sinerji testi, indüklenebilir beta-laktamazları saptamak için direkt indüksiyon testi kullanıldı. ESBL 55 *Klebsiella pneumoniae*'nin 34'ünde (%61.8), 4 *Klebsiella oxytoca*'nın 1'inde, 25 *Escherichia coli*'nin 2'sinde, 26 *Enterobacter* spp.'nin 1'inde ve 5 *Salmonella* spp.'nin 4'ünde saptandı. Kromozomal beta-laktamaz direnci 17 *Pseudomonas* spp.'nin 16'sında (%94.1), 26 *Enterobacter* spp.'nin 20'sinde (%76.9), 55 *K. pneumoniae* suşunun 2'sinde ve 3 *Citrobacter* spp.'nin 2'sinde saptandı. Saptanan kromozomal beta-laktamazlardan 9'u indüklenebilir, 31'i ise konstitütif beta-laktamazdı. İndüklenebilir beta-laktamazların tümü *Pseudomonas* türlerinde saptandı.

Anahtar Kelimeler: Nozokomiyal gram negatif bakteri, Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, Kromozomal beta-laktamaz, Çift disk sinerji testi, Direkt indüksiyon testi

## SUMMARY

### Detection of Extended Spectrum and Chromosomal Beta-lactamases in Nosocomial Gram Negative Bacteria

The gram negative strains which produce plasmid mediated extended spectrum beta-lactamases (ESBL) or inducible beta-lactamases are common at hospitals. To demonstrate the production of beta-lactamases in hospital strains is important in order to choose the proper antibiotics which are going to be used for the treatment of these strains.

<sup>#</sup> Bu çalışma 8. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi'nde sunulmuştur (6-10 Ekim 1997, Antalya).

This study is done for determining the rates of ESBL and inducible beta-lactamases and to establish whether there is any need for the routine examination. One hundred and thirty-eight gram negative bacteria which were defined as nosocomial infection agents by the hospital infection control committee between October 1996-June 1997 were used in the study. Double disk synergy test was used to determine ESBL and direct induction test was used to designate inducible beta-lactamase. ESBL is determined among 34 of 55 *Klebsiella pneumoniae* (61.8%), 1 of 4 *K. oxytoca*, 2 of 25 *Escherichia coli*, 1 of 26 *Enterobacter* spp. and 4 of 5 *Salmonella* spp. strains. Chromosomal beta-lactamase resistance is determined in 16 of 17 *Pseudomonas* spp. (94.1%), 20 of 26 *Enterobacter* spp. (76.9%), 2 of 55 *K. pneumoniae* and 2 of 3 *Citrobacter* spp. strains. Nine of chromosomal beta-lactamases were inducible and 31 were constitutive. All inducible beta-lactamases were determined at *Pseudomonas* species.

**Key Words:** Nosocomial gram negative bacteria, Extended spectrum beta-lactamases, Chromosomal beta-lactamase, Double disk synergy test, Direct induction test

Beta-laktamazlar beta-laktam antibiyotiklere karşı bakteriyel direncin en yaygın nedenidirler. Yeni enzimler ve eski enzimlerin yeni şekilleri *Enterobacteriaceae* ailesine karşı etkili genişlemiş spektrumlu sefalosporinlerin tedavi değerini tehdit etmektedir. Beta-laktamazlar ilk olarak 1970 yılında Richmond ve Jack tarafından sınıflandırılmış ve 1973'de bu sınıflandırma Richmond ve Sykes tarafından genişletilmiştir. 1989'da Bush tarafından yeniden organizasyonu yapılmış ve 1995'de güncelleştirilmiştir<sup>[1]</sup>.

Kromozomal beta-laktamazlar *Salmonella* cinsi bakteriler hariç tüm *Enterobacteriaceae* ailesinde bulunmaktadır. Miktarı, üretim şekli ve dirence katkısı değişkendir. *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp., *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri* ve *Pseudomonas aeruginosa* indüklenebilir beta-laktamaza sahiptir. Beta-laktamazlar beta-laktam antibiyotiklerin yokluğunda düşük miktarda sentezlenirken, beta-laktam antibiyotik varlığında geçici olarak enzim sentezi artmaktadır. Sürekli üretim (konstitütif, derepresyon veya stabil derepresyon) mutasyonla artabilir<sup>[1]</sup>.

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (extended spectrum beta lactamase = ESBL) ilk olarak Almanya ve Fransa'da tanımlanmış, daha sonra tüm dünyada rapor edilmiştir. ESBL'nin üretim ve yayılımını düzenleyen mekanizmalar nedeniyle sayılarında hızlı bir artış olmuştur<sup>[2]</sup>.

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlara ait genler plazmidlerde veya kromozomlarda yerleşmiş olabilir. Bu enzimlere sahip bakteriler epidemik hastalık oluşabilen bölümlerde özellikle yoğun bakım ünitelerinde saptanmaktadır. Dirençli türlerin oluşmasındaki risk faktörleri hastanede kalış süresinin uzaması ve invaziv girişimlerin sıklığı olarak bulunmuştur<sup>[3]</sup>.

Plazmid kontrolünde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve kromozomal indüklenebilir beta-laktamaz sentezleyen suşlar hastanelerde yaygındır. Hastane kökenli suşlarda beta-laktamaz yapımının ortaya çıkarılması tedavide kullanılacak antibiyotiklerin seçiminde yol göstermesi bakımından önemlidir.

Çoğu kez direnç genlerini taşıyan nozokomiyal suşlarda indüklenebilir kromozomal beta-laktamazlar ile ESBL'lere bağlı direnç rutin antibiyotik duyarlılık testlerinde tanınmadığından bu tip beta-laktamazlara sahip bakterilerde direnci tam olarak saptayabilmek amacıyla antibiyogramda özel testlerin yapılması ve yorumlamayı sağlayacak şekilde disk diziliminin uygulanması önerilmektedir<sup>[4]</sup>.

Bu çalışma hastanemizde gram negatif bakterilerde ESBL ve kromozomal beta-laktamaz oranlarını saptamak ve rutin incelemeye gerek olup olmadığını irdelemek amacıyla yapıldı.

## MATERYAL ve METOD

Çalışma Kasım 1996-Haziran 1997 tarihleri arasında Sağlık Bakanlığı Ankara Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yapıldı. Hastanemiz İnfeksiyon Kontrol Komitesi tarafından nozokomiyal infeksiyon etkeni olarak 152 gram negatif bakteri tanımlandı. Bunlardan 14 *Acinetobacter* izolatı değerlendirmeye alınmadı. Kalan 138 gram negatif bakteri çalışma kapsamına alındı. Mikroorganizmaların identifikasyonunda konvansiyonel yöntemler kullanıldı. Antibiyotik duyarlılık testleri için kullanılan sefotaksim (CTX 30 µg), seftizoksim (ZOX 30 µg), amoksisilin/klavulonat (AMC 20 µg/10 µg), seftazidim (CAZ 30 µg), seftriakson (CRO 30 µg), aztreonam (ATM 30 µg), sefoperazon (CFP 75 µg) ve sefoksitin (FOX 30 µg) diskleri Difco'dan temin edildi. Antibiyotik duyarlılık testleri "National Committee for Clinical Laboratory Stan-

dards (NCCLS)” protokolünün önerdiği şekilde yapıldı<sup>[5]</sup>. ESBL’yi saptamak için çift disk sinerji yöntemi kullanıldı<sup>[2]</sup>. 37°C’de bir gecelik inkübasyondan sonra amoksisilin/klavulonat diskine doğru sefotaksim, seftizoksim, seftazidim, seftriakson veya aztreonam inhibisyon zon çapının genişlemesi ESBL olduğunu gösterdi. Sinerji görülmemesine rağmen geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli, beta-laktamaz inhibitörlerine ve sefoksitine duyarlı olan suşlar ESBL pozitif kabul edildi.

İndüklenebilir beta-laktamazları saptamak için direkt indüksiyon testi yapıldı<sup>[1]</sup>. 37°C’de bir gecelik inkübasyondan sonra sefotaksim, sefoperazon veya seftazidim disklerinin çevresindeki inhibisyon zonu nun indükleyici ajan sefoksitine yakın kenarda düzleşme göstermesi pozitif olarak kabul edildi. Direkt indüksiyon testi dışında mikroorganizmanın sefoksitin ve amoksisilin/klavulonata dirençli olması indüklenebilir beta-laktamaz yönünden pozitif olarak kabul edildi<sup>[4]</sup>. Ayrıca geniş spektrumlu sefalosporinler, aztreonam, sefoksitin ve beta-laktamaz inhibitörlerine dirençli, imipeneme duyarlı bakteriler konstitütif kromozomal beta-laktamaz varlığı pozitif olarak değerlendirildi<sup>[4]</sup>. Çalışma her iki yöntem içinde disk mesafesi 30 mm ve 20 mm olacak şekilde her bir suş için dört plak kullanılarak yapıldı.

### BULGULAR

Nozokomiyal 138 gram negatif bakterinin 40’ında kromozomal beta-laktamaz, 42’sinde ESBL saptandı. ESBL ve kromozomal beta-laktamaz dağılımı Tablo 1’de gösterilmiştir.

Kromozomal beta-laktamazların 9’u indüklenebilir beta-laktamazdı. Bunlardan 7’si direkt indüksiyon testi ile saptandı ve tümü *Pseudomonas* türlerinde görüldü.

ESBL’nin hepsi çift disk sinerji yöntemiyle saptandı. Bu dönemde izole edilen *Aeromonas* spp., *Morganella* spp. ve *Serratia* spp.’de ESBL ve kromozomal beta-laktamaz saptanmadı. *Acinetobacter*’lerdeki beta-laktam antibiyotiklere direnç ile beta-laktamaz üretimi arasındaki ilişki henüz tam olarak aydınlatılmadığından nozokomiyal infeksiyon etkeni olarak izole edilen 14 *Acinetobacter* suşu çalışma dışı bırakıldı<sup>[1]</sup>.

İki *K. pneumoniae* izolatında konstitütif kromozomal beta-laktamaz varlığı saptandı.

*Enterobacter* spp. izolatlarının bir tanesinde ESBL varlığı tespit edildi.

Diskler arası mesafe 20 mm olduğunda 42 suşta ESBL üretimi saptanırken, disk mesafesi 30 mm olduğunda ESBL saptanan suşların sadece dokuzunda sinerji testi pozitif olarak değerlendirildi.

Diskler arası mesafe 20 mm olduğunda yedi *Pseudomonas* suşunda direkt indüksiyon testi pozitifken, disk mesafesi 30 mm olduğunda beş suşta indüksiyon saptanabildi.

### TARTIŞMA

Beta-laktamazlar, penisilinler, sefalosporinler ve benzeri beta-laktam antibiyotikleri hidrolize eden ve bu antibiyotiklere direnç gelişimine neden olan enzimlerdir. Bu enzimlerin üretimi, başta *Enterobacte-*

**Tablo 1. Nozokomiyal gram negatif bakterilerde ESBL ve kromozomal beta-laktamazların dağılımı**

Bakteriler	Toplam	Kromozomal beta-laktamaz		ESBL
		İndüklenebilir	Konstitütif	
• <i>K. pneumoniae</i>	55	-	2	34
• <i>K. oxytoca</i>	4	-	-	1
• <i>E. coli</i>	25	-	-	2
• <i>Enterobacter</i> spp.	26	-	20	1
• <i>Salmonella</i> spp.	5	-	-	4
• <i>Pseudomonas</i> spp.	17	9	7	-
• <i>Citrobacter</i> spp.	3	-	2	-
• <i>Aeromonas</i> spp.	1	-	-	-
• <i>Morganella</i> spp.	1	-	-	-
• <i>Serratia</i> spp.	1	-	-	-
• Toplam	138	9	31	42

riaceae üyeleri olmak üzere bir çok bakteri türünün beta-laktam antibiyotiklere direncindeki en önemli mekanizmadır<sup>[1,6]</sup>.

Bir *Enterobacteriaceae* üyesi geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli, fakat beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarına, sefoksitine duyarlı ise muhtemelen ESBL mevcuttur. Ancak suşların çoğu geniş spektrumlu sefalosporinlere duyarlı görünebilir. Bu nedenle bu enzimleri üreten bakterileri saptamada çift disk sinerji testi tavsiye edilmektedir<sup>[4]</sup>. Bu grubun en önemli özelliği kolay yayılabilir olması ve hastane infeksiyonlarında sorun oluşturmasıdır<sup>[7,8]</sup>. ESBL'ler dünyanın her tarafında pek çok hastanede patojenik gram negatif bakterilerin çoğunda saptanırken, özellikle *Klebsiella* izolatlarında sıktır<sup>[8]</sup>. *K. pneumoniae* en sık ESBL üreten mikroorganizmadır<sup>[2]</sup>.

Çalışmamızda 55 *K. pneumoniae*'nin 34'ünde (%61.8) ve 4 *K. oxytoca*'nın 1'inde, 25 *E. coli*'nin 2'sinde, 26 *Enterobacter* spp.'nin 1'inde ve 5 *Salmonella* spp.'nin 4'ünde çift disk sinerji yöntemi ile ESBL saptandı. *K. pneumoniae*'da Gülay ve arkadaşları %88.6, Akata ve arkadaşları %44 oranında ESBL saptamışlardır<sup>[9,10]</sup>. Avrupa'da *Klebsiella*'ların %20-25'inde, Fransa'da %30-40'ında ESBL saptanmıştır<sup>[1]</sup>. ESBL üreten organizmalara bağlı gelişen iyi tanımlanmış epidemilerin çoğu Avrupa'da oluşmuştur. Bununla birlikte Amerika'da son bir kaç yıl içinde en az beş epidemiyi tanımlanmıştır. Meyer ve arkadaşları New York'da bir hastanede iki yıllık bir periyotta oluşan geniş bir epidemiyi tanımlamışlardır (155 hastadan 432 izolat)<sup>[8]</sup>.

*Klebsiella*'lar genellikle kromozomal sınıf A beta-laktamaz enzimlerine sahiptirler. *K. pneumoniae* izolatlarının çoğu kromozomal SHV-1 beta-laktamazlara sahiptir, bu beta-laktamazlarının hepsi konstitütiftir ve genellikle düşük seviyelerde üretilirler ancak SHV-1 enzimi plazmid geçişli olduğu zaman yüksek seviyelerde üretilir<sup>[1]</sup>. Çalışmamızda iki *K. pneumoniae* izolatında konstitütif kromozomal beta-laktamaz varlığı pozitif olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda ESBL saptanan 34 *K. pneumoniae*'nin 18'i (%52.9) hastanemiz yenidoğan servisinde aynı dönemde yatan hastalarda oluşan bir epidemiyi sırasında kan kültürlerinden izole edilmiştir. Tüm bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar ülkeler ve hastaneler arasında ESBL sıklığının değişken olduğu görüşünü desteklemektedir.

Gaitadan izole ettiğimiz üç *S. paratyphi* B ve bir *S. typhimurium* suşunda ESBL saptanması özellikle epidemiyolojik bir sorun olan *Salmonella* infeksi-

yonlarında direnç gelişiminin izlenmesi açısından önemli bulunmuştur.

*E. cloacae* gibi ESBL'ye ilave olarak aşırı miktarda sefalosporinaz üreten türlerde sefotaksim, seftazidim ve aztreonama direncin yüksek seviyeleri yalnızca negatif sinerji testinden sorumludur.

Sinerji, diskler arasındaki uzaklık 30 mm olduğu zaman saptanamadığında, uzaklık 20 mm'ye indirilerek saptanabilir<sup>[2]</sup>. Çalışmamızda çift disk sinerji testinde disklerin merkezden uzaklıkları 30 mm olduğunda ESBL üreten 42 suşun 9'unda (%21.4), disk uzaklıkları 20 mm olduğunda 42 suşun tamamında (%100) ESBL saptanmış ve disk mesafesinin sonuçları önemli oranda etkilediği görülmüştür. Gülay ve arkadaşları 44 *K. pneumoniae* suşunun disk mesafesi 30 mm olduğunda %56.8'inde, 20 mm olduğunda %88.6'sında ESBL saptamışlardır<sup>[11]</sup>. Bu nedenle disk mesafesi 30 mm olduğunda ESBL saptanamadığında mesafenin 20 mm'ye indirilerek yapılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.

Kromozomal beta-laktamazlar gram negatif bakterilerin bir çoğunda yaygın olarak bulunmaktadır. Türlerle bağlı olarak indüklenebilir, yüksek düzeyde konstitütif veya düşük düzeyde konstitütif olabilir. *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *Citrobacter* spp., *M. morgani*, *Serratia* spp., *Providencia* spp., *P. aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türlerindeki kromozomal beta-laktamazlar indüklenebilir özelliğe sahiptir<sup>[1]</sup>. Beta-laktamaz dereprese mutantlar, indüklenebilen beta-laktamaz sentezleyen bakteri toplumlarında labil zayıf indükleyciler ile tedavi sırasında ortaya çıkmaktadırlar. Bunun nedeni, bu bileşiklerin indüklenebilen hücreleri öldürmesi, buna karşın  $10^{-5}$  sıklıkla ortaya çıkan dereprese mutantların seleksiyonuna yol açmasıdır<sup>[12]</sup>. Stabil dereprese mutantlar yüksek oranda *E. cloacae* klinik izolatlarında görülür<sup>[13]</sup>.

Çalışmamızda 26 *Enterobacter* spp.'nin 20'sinde (%76.9), 17 *Pseudomonas* spp.'nin 16'sında (%94.1) ve 3 *Citrobacter* spp.'nin 2'sinde kromozomal beta-laktamaz saptandı. Bunlardan sadece 9 *Pseudomonas* suşu (%56.2) indüklenebilir özellikteydi. Akata ve arkadaşları *Pseudomonas*'larda %41.2, *Enterobacter* spp.'de %22 oranında kromozomal beta-laktamaz saptamışlardır<sup>[9]</sup>. Yapılan bir çalışmada *E. cloacae*'de %70-90 arasında dereprese görülmüştür<sup>[1]</sup>. Çalışmamızda stabil dereprese mutant olarak bulunan 20 *E. cloacae* suşunun 13'ü hastanemizde yenidoğan servisinde çıkan bir epidemiyi sırasında kan kültürlerinden izole edilmiştir.

Yapılan çalışmalar normal koşullarda yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde ESBL yapan bakterile-

rin hemen yarısının tanınmadığını ve yanlış olarak 3. kuşak sefalosporinlere ve monobaktamlara duyarlı bulduklarını göstermektedir<sup>[7]</sup>. Çalışmamızda 31 nozokomiyal gram negatif bakteri özel disk dizilimi olmadan yapılan rutin antibiyogramda hatalı olarak duyarlı bulunmuştur.

Sonuç olarak hastanemizde ESBL'nin çok yüksek oranlarda saptanması nedeni ile tüm nozokomiyal infeksiyonlarda özel disk dizilimi ile rutin olarak test edilmesinin gerekli olduğu düşünülmüştür. İndüklenebilir beta-laktamazları saptayan testlerin duyarlılığı %80 civarında olduğundan bakterilerin tür düzeyinde saptanması yeterli olarak görülmektedir<sup>[1]</sup>. Bununla birlikte laboratuvarımızda tür düzeyinde identifikasyon yapıldığından ve antibiyogramlarda ek bir maliyet getirmedeğinden önerilen disk dizilimi ile indüklenebilir beta-laktamazların test edilmesinin uygun olduğu düşünülmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microb Rev 1995;8:557-84.
2. Sirot J. Detection of extended spectrum plasmid mediated beta lactamases by disk diffusion. Clin Microbiol and Infection 1996;2(suppl 11):35-9.
3. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 5<sup>th</sup> ed, Philadelphia: JB Lippincott Company, 1997:831.
4. Akata F. Gram negatif bakterilerde beta-laktamaz tipleri ve antibiyogramdan beta-laktamaz tipini tahmin etmede kullanılabilir yöntemler. İnfek Derg 1997;11:303-9.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 6<sup>th</sup> ed, Approved Standard NCCLS Document M2 A6, 1997.

6. Yuluğ N. Beta-laktamazlar ve klinik açıdan önemi. Ankem Derg 1997;11:205-7.
7. Vahaboğlu H. Antibiyotik direnç mekanizmaları. Klimik Derg 1993;6:6.
8. Quinn JP. Clinical significance of extended spectrum beta lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect dis 1994;13 (Suppl 1):39-42.
9. Akata F, Otkun M, Teker B ve ark. Nozokomiyal Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu ve kromozomal beta-laktamaz sıklığı. İnfek Derg 1997;11:255-9.
10. Gülay Z, Amyes SGB, Yuluğ N. Hastane infeksiyonlarından soyutlanan *Klebsiella pneumoniae* suşlarının beta-laktam antibiyotiklere duyarlılığının ve beta-laktamaz tiplerinin incelenmesi. Mikrobiyoloji Bül 1996;330:1-11.
11. Gülay Z, Abacıoğlu HY, Yuluğ N. Çift disk sinerji yönteminde diskler arası uzaklığın sonuca etkisi. İnfek Derg 1995;9(1-2):89-92.
12. Gür D. Beta-laktamazlar. Flora 1997;2(Ek 3):3-15.
13. Mederios A. Recent increases in resistance: Mechanisms and organisms, Evolution and dissemination of beta lactamases accelerated by generations of beta lactam antibiotics. Clin Infect Dis 1997;24(suppl 1):19-45.

#### Yazışma Adresi:

Uzm. Dr. Çiğdem KUZUCU

Sağlık Bakanlığı Ankara Hastanesi

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü

ANKARA

Makalenin Geliş Tarihi: 24.12.1998

Kabul Tarihi: 01.04.1999