

# ENTERİK BAKTERİLERDE ESBL PREVALANSI\*

## ESBL PREVALANCE IN ENTEROBACTERIA

Osman AKTAŞ, Mustafa ERTEK, Selim GÖRGÜN, Selahattin ÇELEBİ, Recep KEŞLİ

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji (OA, SG, SÇ, RK) ve Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları (ME) Anabilim Dalları, Erzurum

\* 13. ANKEM Kongresi'nde (1-5 Haziran 1998, Antalya-Manavgat) sunulmuştur.

### Özet

Çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterik bakterilerde ESBL prevalansının araştırılması amaçlanmıştır. Bakterilerde ESBL varlığı Mueller-Hinton agarda "çift disk sinerji"; antibiyotik duyarlılıkları "disk difüzyon" yöntemleri ile araştırılmıştır. Örneklerden 58 *E.coli*, 27 *Enterobacter* spp., 18 *Pseudomonas aeruginosa*, 14 *Citrobacter* spp., 11 *Proteus* spp. ve 11 *Klebsiella* spp. olmak üzere toplam 139 izolat soyutlanmış ve 21 (%15)'inde ESBL olumluluğu saptanmıştır. ESBL varlığı, en yüksek olarak *Klebsiella* (% 27) ve *Enterobacter* (% 22); daha düşük olarak da *Pseudomonas aeruginosa* (%17), *Citrobacter* (%14) ve *E. coli* (%12) suşlarında gösterilmiş; *Proteus*larda gösterilememiştir. ESBL olumlu suşlar; meropeneme % 100, imipeneme % 95, ofloksasine % 90, norfloksasine % 76, sefotaksime % 71, seftazidim, seftriakson ve amikasine % 57; netilmisine % 62, gentamisine % 19, aztreonama % 38 ve ampisilin + sulbaktama % 10 oranlarında duyarlı bulunmuşlardır. Sonuç olarak, ESBL olumlu suşlar üçüncü kuşak sefalosporin ve aztreonam gibi  $\beta$ -laktamlara dirençli oldukları halde klasik disk difüzyon yönteminde duyarlı gibi görülebileceğinden, çift disk sinerji yönteminin rutin olarak uygulanması gerektiği bir kez daha vurgulanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, ESBL, Enterik bakteriler*

### Summary

The aim of this study was to investigate extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) prevalence in enteric bacteria isolated from several clinical samples. The ESBL presence in bacteria is studied with "double disk synergy", antimicrobial sensitivities with "disk diffusion" in Mueller-Hinton agar. One hundred thirty nine species in samples were isolated, including 58 *E. coli*, 27 *Enterobacter* spp., 18 *Pseudomonas aeruginosa*, 14 *Citrobacter* spp., 11 *proteus* spp., and 11 *Klebsiella* spp., and in 21 (15 %) ESBL positivity was determined. ESBL presence was shown in *Klebsiella* (27 %) and *Enterobacter* (22 %) highest and *Pseudomonas aeruginosa* (17 %), *E. coli* (12 %) lower, and not shown in *Proteus*. ESBL positive ones were found sensitive to meropenem 100 %, imipenem 95 %, ofloxacin 90 %, norfloxacin 76 %, cefotaxime 71 %, ceftazidime, ceftriaxone and amikacin 57 %, netilmicin 62 %, gentamycin 19 %, aztreonam 38 % and ampicillin-sulbactam 10 % of rates. In conclusion, since ESBL positive ones were resistant to  $\beta$ -lactams including 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins and aztreonam and it was shown sensitive with classic disk diffusion, using double disk synergy method in routine was impressed once again.

**Key words:** *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, ESBL, Enteric bacteria*

**Tablo 1. İzolatlarda ESBL Saptanma Oranları**

bakteri	n		ESBL olumlu %
	+	n	
<i>E.coli</i>	58	7	12.1
<i>enterobacter spp.</i>	27	6	22.2
<i>pseudomonas aeruginosa</i>	18	3	16.7
<i>citrobacter spp.</i>	14	2	14.3
<i>proteus spp.</i>	11	-	-
<i>klebsiella spp.</i>	11	3	27.3
toplam suş	139	21	14.4

## Giriş

$\beta$ -laktamaz inhibitörleri,  $\beta$ -laktamaz enzimlerinin etkinliğini inhibe eden ya da ortadan kaldıran proteinler olup tek başlarına antimikrobiyal özelliklerinin az olması nedeniyle bir  $\beta$ -laktam antibiyotikle kombine edilirler. Bu kombinasyonlar; antibiyotiğin, beta-laktamaz enzimleriyle yıkıma uğramaksızın kendi görevini görmesine olanak tanır. Ancak, geniş spektrumlu  $\beta$ -laktam antibiyotiklerinin yaygın kullanımının sonucu, yeni  $\beta$ -laktamazları üreten ve bu antibiyotik grubuna dirençli olan Gram olumsuz patojenlerin sayısı da artmıştır (1-5). Bu direnç plazmid aracılığıyla aynı türler arasında taşınabildiği gibi farklı tür ve cinsten bakteriler arasında da taşınabilmektedir (6, 7). ESBL üreten suşlar, antibiyotik kullanımının yoğun olduğu çevrelerde sık olarak bulunurlar. Suşların seleksiyonu ve yayılımı yönünden önemli risk faktörlerinin başında; antibiyotiğe -özellikle birden fazla sefalosporine- maruz kalma, cerrahi operasyon geçirme, kateter ve benzeri enstrümantasyon uygulamaları, yoğun bakım ünitesine giriş ve hastanede kalış süresinin uzaması gelmektedir (8). Extended-spectrum  $\beta$ -laktamase (ESBL) üreten

*Enterobacteriaceae* ailesi bakterilerinin neden olduğu hastane enfeksiyonlarının son yıllarda belirgin bir şekilde arttığı gözlenmektedir. Buna paralel olarak da plazmid aracılığıyla taşınan yeni  $\beta$ -laktamazlarla meydana gelen direncin klinik ve laboratuvar özelliklerini açıklayan araştırmalar yoğunluk kazanmıştır. Yöremizde de, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde sıklıkla kullanılan ve bilinçsiz tüketildiğine inanılan antimikrobiklere karşı bakterilerin kendi savaşımını verdiği mutlak bir gerçektir. Enfeksiyonlardan izole edilen bakterilerde ESBL üretiminin ve bunlarda antimikrobiklere direncin yüksek oranlarda olabileceği düşüncesiyle, hastanede yatarak tedavi gören hastalardan alınan çeşitli klinik örneklerden izole edilen Gram olumsuz enterik bakterilerde, ESBL prevalansı ve ESBL olumlu suşların antibiyotik duyarlılıkları araştırılmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Çeşitli kliniklerde yatan hastalardan alınan örneklerden rutin yöntemlerle izole edilen ve tanımlanan Gram olumsuz bakterilerde ESBL varlığı "çift disk sinerji"; antibiyotik duyarlılıkları "disk difüzyon" yöntemleri ile Mueller-Hinton agarda araştırılmıştır. Çift Disk sinerji yönteminde; 0.5 McFarland bulanıklıktaki bakteri süspansiyonları Müeller-Hinton agarda yayılarak besiyeri merkezine amoksisilin/kulavulonat (20/10  $\mu$ gr) ve çevresine de 25 mm aralıklarla aztreonam, seftriakson, sefotaksim ve seftazidim diskleri konulmuş, bir günlük (20  $\pm$  4 saatlik) inkübasyonlar sonunda, Amoksisilin kulavulanat diskine doğru 2 mm ve daha fazla olan inhibisyon zonlarında genişleme görülmesi durumunda incelenen bakteri ESBL olumlu olarak kabul edilmiştir. Disk difüzyon yöntemi ise; NCCLS Document M2-A4'de tanımlandığı gibi Mueller-Hinton Agar besiyerinde gerçekleştirilmiş ve değerlendirilmiştir (9).

**Tablo 2. ESBL Üreten Bakterilerde Antibiyotiklere Duyarlı Bulunan Suş Sayıları**

bakteri	AM	NET	CN	OFL	NOR	SAM	AZT	CAZ	CRO	CTX	IMP	MEP
<i>E.coli</i> (58/7)	5	5	4	7	6	2	3	3	4	5	7	7
<i>enterobacter spp.</i> (27/6)	2	3	-	5	5	-	2	3	3	4	5	6
<i>P. aeruginosa</i> (18/3)	2	2	-	2	1	-	1	2	1	2	3	3
<i>citrobacter spp.</i> (14/2)	2	2	-	2	2	-	2	2	2	2	2	2
<i>klebsiella spp.</i> (11/3)	1	1	-	3	2	-	-	2	2	2	3	3

AM: amikasin, NET: netilmisin, CN: gentamisin, OFL: ofloksasin, NOR: norfloksasin, SAM: ampisilin+sulbaktam, AZT: Aztreonam, CAZ: seftazidim, CRO: seftriakson, CTX: sefotaksim, IMP: imipenem, MEP: meropenem

**Tablo 3. ESBL Saptanamayan Bakterilerde Antibiyotiklere Duyarlı Bulunan Suş Sayıları**

bakteri	AM	NET	CN	OFL	NOR	SAM	AZT	CAZ	CRO	CTX	IMP	MEP
<i>E.coli</i> (58/51)	43	40	35	48	49	28	39	45	46	48	51	50
<i>enterobacter spp</i> (27/21)	8	7	7	19	17	2	7	9	8	11	21	21
<i>P. aeruginosa</i> (18/15)	12	10	8	11	11	-	6	12	10	11	13	13
<i>citrobacter spp</i> (14/12)	7	5	5	11	11	6	7	4	4	7	11	11
<i>proteus spp</i> (11/11)	11	11	11	11	11	7	10	9	11	11	10	10
<i>klebsiella spp.</i> (11/8)	4	2	2	8	7	-	2	2	2	3	8	8

AM: amikasin, NET: netilmisin, CN: gentamisin, OFL: ofloksasin, NOR: norfloksasin, SAM: ampisilin+sulbaktam, AZT: Aztreonam, CAZ: seftazidim, CRO: seftriakson, CTX: seftotaksim, IMP: imipenem, MEP: meropenem

## Bulgular

Klinik örneklerden 58 *E.coli*, 27 *Enterobacter spp.*, 18 *Pseudomonas aeruginosa*, 14 *Citrobacter spp.*, 11 *Proteus spp.* ve 11 *Klebsiella spp.* olmak üzere toplam 139 izolat soyutlanmış ve 21 (%15) 'inde ESBL olumluluğu saptanmıştır (Tablo 1). ESBL olumlu suşlar; meropeneme % 100, imipeneme % 95, ofloksasine % 90, norfloksasine % 76, seftotaksime % 71, seftazidim, seftriakson ve amikasine % 57; netilmisine % 62, gentamisine % 19, aztreonama % 38 ve ampisilin + sulbaktama % 10 oranlarında duyarlı bulunmuşlardır. Söz konusu antimikrobiklere duyarlı bulunan ESBL olumlu suşların sayıları Tablo 2'de; ESBL olumsuz suşların sayıları da Tablo 3'de verilmiştir. ESBL ürettikleri halde suşların büyük bir kısmının CTX, CAZ, CRO ve AZT'a disk difüzyon testinde duyarlı oldukları gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4'de özetlenmiştir.

**Tablo 4. ESBL Olumlu Bakterilerin CTX, CAZ, CRO Ve ATM'a Duyarlı Bulunan Suş Sayıları**

bakteri	n	CTX	CAZ	CRO	AZT
<i>E.coli</i>	7	5	3	4	3
<i>enterobacter spp.</i>	6	4	3	3	2
<i>pseudomonas aeruginosa</i>	3	2	2	1	1
<i>citrobacter spp.</i>	2	2	2	2	2
<i>klebsiella spp.</i>	3	2	2	2	-

## Tartışma

Penisilin, sefalosporin, klavam, sefamiksine ve karbapenemleri kapsayan  $\beta$ -laktam antibiyotik ailesi, bir  $\beta$ -laktam halkasıyla karakterizedir. Peptidoglikan sentezinin son çapraz bağlanma reaksiyonlarını katalizleyen transpeptidaz etkinliğinin gerçekleşmesi için  $\beta$ -laktam halkasının bütünlüğü gereklidir. Penisilin bağlayan proteinlerin modifikasyonu ya da hücrel permeabiliteyle sonuçlanan mutasyonel olaylar bakterilerin  $\beta$ -laktamlara direnç kazanmasına yol açabilmektedir. Ancak, klinik örneklerden izole edilen bakterilerde bu dirençten, öncelikle, bakterinin

sahip olduğu ve antibiyotiğin hidrolizine neden olan  $\beta$ -laktamaz enzimi sorumlu tutulmaktadır (7). Yöremizde en sık izole edilen bakterilerde ESBL varlığı  $\beta$ -laktam direncinden ne kadar sorumluydu? Bu amaçla, çeşitli kliniklerde yatmakta olan hastalardan alınan örneklerden sıklıkla izole edilen Gram olumsuz enterik bakterilerde ve *P. aeruginosa* suşlarında ESBL üretimi araştırılmıştır. Örneklerden toplam 139 izolat soyutlanmış ve %15'inde ESBL olumluluğu saptanmıştır. Bu enzimin, en yüksek olarak *Klebsiella spp* (% 27) ve *Enterobacter spp* (% 22); daha düşük olarak da *Pseudomonas aeruginosa* (%17), *Citrobacter spp* (%14) ve *E. coli* (%12) suşları tarafından sentezlendiği gösterilmiş; *Proteus spp* suşlarında ESBL olumluluğu gösterilememiştir (Tablo 1). Tablo 2'de verilen rakamların toplam değerleri göz önüne alınacak olursa, ESBL olumlu suşların; meropeneme % 100, imipeneme % 95, ofloksasine % 90, norfloksasine % 76, seftotaksime % 71, seftazidim, seftriakson ve amikasine % 57; netilmisine % 62, gentamisine % 19, aztreonama % 38 ve ampisilin+sulbaktama % 10 oranlarında duyarlı oldukları görülür. Enterobacteriaceae üyeleri, birbirleri arasında kolayca taşınabilen çoklu direnç plazmidleri içermesi nedeniyle ESBL üreten organizmaların çeşitli antibiyotik sınıflarına dirençli oldukları ifade edilmektedir (7). Elde ettiğimiz yüksek direnç oranlarını bu ifade ile açıklamak olasıdır. ESBL üretmeyen bakterilerin toplamı ele alındığında, IMP, MEP, OFL ve NOR'e % 90'ların üzerinde; CTX ve AM'e % 70'li oranlarda; CAZ, CRO, NET ve AZT'a % 60-69 oranlarında ve CN ile SAM'a % 60'ları altında duyarlılık saptanmıştır. *Proteus spp.* suşlarında % 64 oranında etkin olan SAM dışında hemen tüm antimikrobiklerin oldukça etkin (% 82-100) oldukları görülmüştür. *Klebsiella spp.* suşları; IMP, MRP ve OFL'e % 100 duyarlı, NOR'e % 87 duyarlı iken; çalışmamızda diğer antimikrobiklere en dirençli bulunan bakteri olmuştur (Tablo 2). Gram olumsuz patojenlerin tedavisinde yeni geniş spektrumlu  $\beta$ -laktam antibiyotiklerinin yoğun kullanımının bir sonucu olarak yeni  $\beta$ -laktamazların

sayılarının artması nedeniyle, ESBL üreten patojenlerle meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde sorunlar yaşanabilmektedir. Florokinolon, sefamisin ve imipenem dirençli olan *P. aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae* suşları bildirilmektedir (1, 10). *Pseudomonas aeruginosa*'nın seftazidim direnci ise ilk kez yurdumuzdan izole edilen suşlarda bildirilmiştir (6). Durmaz ve ark (11), ESBL üreten Gram olumsuz bakterilerden en fazla oranda *K. pneumoniae*; daha az oranlarda da *E. aerogenes* ve *E. coli* izole etmişler ve imipenem dirençli sadece 1 *K. pneumoniae* suşu tespit etmişlerken meropenem direncine rastlamamışlardır. Bermudas ve ark (4), bir Fransız üniversite hastanesinden haziran 1992-1993'ü kapsayan bir yıllık süreç içerisinde izole ettikleri ESBL üreten 128 enterik bakteriden 123'ü *Klebsiella pneumoniae* ve geri kalan 5 bakterinin *E. coli*, *E. aerogenes* ve *Citrobacter diversus* olduğunu rapor etmişlerdir. Emery ve Weymouth (12), çift disk sinerji yöntemiyle, altı aylık bir süreçte hastaların % 1.2'sinden soyutlanan *Enterobacteriaceae* familyası izolatlarının yaklaşık olarak % 1.5'inin ESBL ürettiklerini bildirmişlerdir.

ESBL olumlu ve olumsuz suşların antimikrobiklere olan duyarlılık oranları karşılaştırıldığında (Tablo 2 ve 3), ESBL olumlu *Klebsiella* suşlarının ESBL olumsuz suşlara oranla IMP, MEP ve OFL dışında diğer antimikrobiklere nispeten dirençli oldukları görülmüş; ESBL üreten 2 *Citrobacter* suşu CN ve SAM dışında tüm antimikrobiklere duyarlı iken ESBL üretmeyen suşlarda bazı antibiyotiklere % 60'ları aşan oranlarda direnç saptanmıştır. Diğer bakterilerle elde edilen sonuçlar, ESBL yapımının antibakteriyel direnç üzerinde çarpıcı bir etkisini ortaya koymamaktadır. Çalışmamızda, ESBL sentezleyen mikroorganizmaların 1/3 ile 2/3 kadarının klasik disk difüzyon yöntemi ile üçüncü kuşak sefalosporinler ve aztreonam duyarlı oldukları saptanmıştır (Tablo 4). ESBL üreten suşların karbapenemlere duyarlılığı yüksek olsa da bu grup antibiyotiklere direnç gelişimini önlemek açısından bu suşlara etkili bulunan aminoglikozid ve kinolonlar gibi antibiyotiklerin tedavide daha öncelikli tercih edilmesi gerekmektedir. Sonuç olarak, ESBL salgılayan suşlar

üçüncü kuşak sefalosporin ve aztreonam gibi  $\beta$ -laktamlara dirençli oldukları halde klasik disk difüzyon yönteminde duyarlı gibi görülebileceğinden, çift disk sinerji yönteminin rutin olarak uygulanması gerektiği bir kez daha vurgulanmıştır.

## Kaynaklar

1. Minami S, Akama M, Watanabe Y, Narita H, Iyobe S, Mitsuhashi S. Imipenem and cephem resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying plasmids coding for class B [beta]-lactamase. J Antimicrob Chem 1996; 37: 433-444
2. Livermore DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 557-584
3. Marchese A, Arlet G, Schito G C, Lagrange P H, Philippon A. Detection of SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Italy. Eur-J-Clin-Microbiol-Infect-Dis, 1996; 15: 245-8
4. Bermudes H, Arpin C, Jude F, el-Harrif Z, Bebear C, Quentin C. Molecular epidemiology of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteria in a French hospital. Eur J Clin-Microbiol-Infect-Dis, 1997; 16: 523-9
5. Gniadkowski M, Schneider I, Jungwirth R, Hryniewicz W, Bauernfeind. A Ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from three Polish hospitals: identification of three novel TEM- and SHV-5-type extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 514-520
6. Danel F, Hall LMC, Gur D, and Livermore DM. OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2  $\beta$ -lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41: 785-790
7. Bush K. Is It important to identify extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing isolates? Eur J Clin Microbiol Inf Dis 1996; 15: 361-364
8. Pena C, Pujol M, Ricart A, et al. Risk factors for fecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum  $\beta$ -lactamase in the intensive care unit. J Hosp Infect 1997; 35:916
9. Waitz JA, Doern GV, Finegrod SM. Performance standarts for antimicrobial disc susceptibility tests. NCCLS 4<sup>th</sup> ed, 1990; 10:7
10. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. Antimicrob. Agents Chemother 1997; 41:563-569
11. Durmaz G, Aydın A, Yıldız Ü, Akgün Y. Aminoglikozidlere dirençli ve geniş spektrumlu beta laktamaz-pozitif gram-negatif bakterilerde meropenem ve imipenem etkinliği. İnfeksiyon Dergisi 1997; 11: 19-22
12. Emery CL, Weymouth LA. Detection and clinical significance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in a tertiary-care medical center. J Clin Microbiol 1997; 35: 2061-2067

## Yazışma Adresi:

Doç.Dr.Osman AKTAŞ

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum