

***KLEBSIELLA PNEUMONIAE* VE *KLEBSIELLA OXYTOCA* BAKTERİLERİNDE KOMBİNE DİSK YÖNTEMİ İLE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZIN BELİRLENMESİ**

Ebru YILMAZ, Güven URAZ

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Teknikokullar Ankara
beyzi@gazi.edu.tr

ÖZET

Geniş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) gram negatif basillerde sefalosporinlere (seftazidim,seftriakson, sefotaksim) ve aztreonama dirençten sorumludurlar. Geniş spektrumlu beta laktamaz üreten *Klebsiella* bakterileri klinisyenler açısından büyük bir problemdir. Bu enzimler özellikle çocuk hastalar ile tıbbi ve cerrahi birimlerde tedavide başarısızlık nedenidir. Araştırmada geniş spektrumlu beta laktamaz varlığı kombine disk yöntemi ile çalışılmıştır. Çalışmada çeşitli klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarından 128 *Klebsiella* bakterisi toplanmıştır. Bu bakteriler manuel yöntemlerle ve API 20E test kiti ile adlandırılmıştır. İdentifikasyon sonucu 103 *K. pneumoniae*, 25 *K. oxytoca* elde edilmiştir. Kombine disk yöntemiyle *Klebsiella* şuşlarının %59,37'sinin GSBL pozitif olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler :*Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, genişlemiş spektrumlu beta laktamaz, kombine disk yöntemi

DETECTION OF EXTENDED-SPECTRUM BETA LACTAMASE IN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AND *KLEBSIELLA OXYTOCA* BACTERIA WITH COMBINED DISC METHOD

Ebru YILMAZ, Güven URAZ

Gazi University Faculty of Science Department of Biology Teknikokullar Ankara
beyzi@gazi.edu.tr

ABSTRACT

Extended-spectrum beta lactamases (ESBLs) are responsible for resistance to cephalosporins (ceftazidime, ceftriaxone, and cefotaxime) and aztreonam in gram-negative bacilli. ESBL producing *Klebsiella* bacteria are a major problem for clinicians, ESBLs increase are cause of failure in treatment particularly paediatric patients and also in medical and surgical units. In this research ESBL was investigated by combined disc method. In this research, 128 clinical isolates of *Klebsiella* ssp. were collected from different microbiology laboratories in Ankara. All isolates were identified with classical methods and API 20E. According to the results of identification, 103 *K. pneumoniae*, 25 *K. oxytoca* were obtained. ESBL has been detected 59,37% in *Klebsiella* bacteria by combined disc method.

Key Words :*Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, Extended spectrum beta lactamase, combined disc method.

GİRİŞ

Antibiyotikler mikroorganizmalar üzerine mikrobisit veya mikrobiyostatik etki gösteren ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan maddelerdir [1]. Antibiyotikler sayesinde günümüzde bir çok enfeksiyon hastalığı tedavi edilmektedir. Ancak bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmeleri sayesinde normalde etkili olması gereken birçok antibiyotik tedavide başarısız sonuç verebilmektedir. Beta-laktam antibiyotikler yan etkilerinin azlığı ve bakterisid olmaları nedeniyle günümüzde en sık kullanılan antibiyotiklerdir. Beta-laktam antibiyotikler bakterilerin peptidoglikan tabakasının sentezini bozarak etki ederler. Bakterilerin hücre duvarında yer alan peptidoglikan (mürein) tabakası mikroorganizmanın yapısını ve bütünlüğünü sağlar. Hücre duvar yapısı bozulan bakteride ozmotik direnç kaybı ve ölüm meydana gelmektedir [2,3]. Beta laktam antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hale getiren beta laktamaz enzim üretimi, birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından birisidir. Beta laktamaz enzimi antibiyotik hedef bölgesine ulaşmadan, beta laktam halkasını hidrolize ederek antibiyotiği etkisiz hale getirirler [4,5]. Bugüne kadar 350'ye yakın beta laktamaz enzimi tanımlanmıştır [6]. Bunların yaklaşık 150'si genişlemiş spektrumlu beta laktamazlardır (GSBL) [7,8]. GSBL'ler gram-negatif basillerde bulunan, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama karşı dirençten sorumlu olan enzimlerdir [9]. Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar, geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere direnç göstermeleri sebebiyle enfeksiyonların tedavisinde ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Özellikle *Klebsiella* türlerinde GSBL üretimi ve bu enzimin patojen bakteriler arasında hızla yayılması ciddi sorunlar oluşturmaktadır [10]. Son yıllarda klinik örneklerden izole edilen *Klebsiella* bakterilerinde Dünya'da ve Türkiye'de değişen oranlarda genişlemiş spektrumlu beta laktamaz ürettiği bildirilmiştir. Kore'de yapılan bir çalışmada 3 hastaneden 53 GSBL üreten *K. pneumoniae* elde edilmiştir [11]. 1998 yılında yayınlanan bir çalışmada farklı şehirlerde bulunan üç Polonya hastanesinden GSBL pozitif olan 11 *K. pneumoniae* ve 1 *E. coli* izolatu belirlenmiştir [12]. Türkiye'de 1994-1996 yılları arasında GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesinde çeşitli klinik örneklerden 67 *K. pneumoniae* suşu izole edilmiş, bu izolatların 10'unda GSBL varlığı saptanmıştır [13]. Yine Türkiye'de yapılan bir çalışmada çeşitli klinik örneklerden 94 *E. coli* ve 58 *K. pneumoniae* izole edilmiş ve bu izolatlarda GSBL olumluluğu sırasıyla %39 ve %66 oranında saptanmıştır [14].

Araştırmamızda, farklı hastanelerin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına gelen hasta materyalleri toplanarak bu hasta materyalleri spesifik besiyerinde kültüre edildikten sonra *Klebsiella* türlerinin isimlendirmesi yapılmıştır.

Klebsiella patojenite açısından çok önemli bir *Enterobacteriaceae* üyesidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar *Klebsiella* bakterilerinde GSBL varlığının her geçen gün artmakta olduğunu göstermiştir. Araştırmada klinik önemi olan *Klebsiella* bakterilerinde GSBL enzim varlığı Kombine disk yöntemi (Klavulonik asit içeren kombinasyon disklerinin kullanımı) belirlenmiştir.

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Örnek Toplama

Araştırmada, iki farklı hastanenin (Gazi Mustafa Kemal Devlet Hastanesi, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi) klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına gelen hasta materyalleri çalışılmıştır. Hasta materyalleri ilk aşamada EMB agara ekilmiştir.

2.2. Örneklerin Seçilmesi

İdrardan, kandan, yara yerinden, trakeal aspirattan, aspirasyon sıvısından ve balgamdan alınan örnekler, EMB (Oxoid CM0069) agara ekildikten sonra 37°C'lik etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. EMB (Oxoid CM0069) agarda gri kahverengi merkezli mukoid koloniler *Klebsiella* oldukları şüphesiyle biyokimyasal testlere alınmıştır. Gram boyamaları yapılmış gram-negatif basil oldukları görülmüştür.

2.3. İdentifikasyon

Şüpheli koloniler tek koloni oluşturmaları için EMB (Oxoid CM0069) agara pasajlanmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra saf kültürlerle ilk olarak gram boyama yapılmıştır. Gram boyama sonucu gram-negatif olan kültürler oksidaz testine tabi tutulmuştur. Oksidaz negatif olan kültürler sırasıyla IMVIC testine alınmışlardır. Daha sonra üreli agara (Christensen agar base, Oxoid CM0053), Lysine Decarboxylase besiyerine, TSI besiyerine ve Mio medium'a ekilerek adlandırılmışlardır. Klasik biyoşimi testleriyle adlandırılan *Klebsiella* bakterileri doğrulama amacıyla API 20E (bio-Merieux) ticari test kitleri kullanılarak da adlandırılmışlardır. İsimlendirme sonucu sonucu 103 *K. pneumoniae*, 25 *K. oxytoca* elde edilmiştir.

2.4. Klavulonik asit içeren kombinasyon disklerinin kullanımı yöntemiyle GSBL enziminin belirlenmesi

Bakterilerin 0,5 McFarland eşeline uygun süspansiyonları hazırlanmıştır. MHA'a ekilmişlerdir. Seftazidim, seftazidim/klavulonik asit, sefotaksim ve sefotaksim/klavulonik asit diskleri yerleştirilmiştir. 37°C'lik etüvde 24 saat bekletildikten sonra oluşan zonlar ölçülmüş, Kombinasyon diskleri etrafındaki zon, klavulonik asit

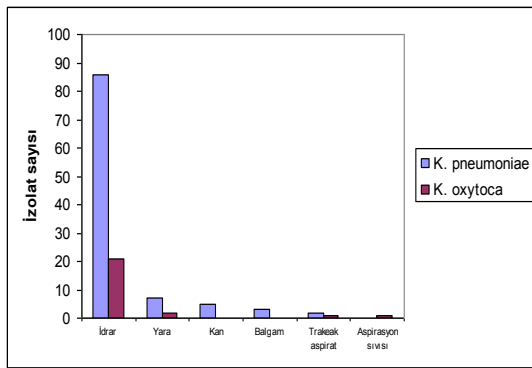
içermeyen disk etrafındaki zona kıyasla ≥ 5 mm daha genişse GSBL pozitif olarak değerlendirilmiştir [15-19].

3. BULGULAR

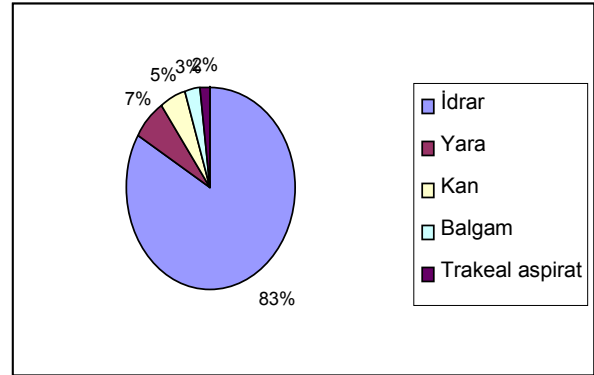
Araştırmada, farklı hastanelerin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına gelen 128 hasta materyali çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan 128 hasta materyalinin 107 (%83,6)'si idrar, 9 (%7,03)'u yara, 5 (%3,9)'i kan, 3 (%2,34)'ü balgam, 3 (%2,34)'ü trakeal aspirat, 1 (%0,78)'i aspirasyon sıvısı'dır. Bu hasta materyalleri EMB agar'da kültüre edildikten sonra klasik biyoşimi testleri ile isimlendirilmiş, ardından API 20E identifikasyon kiti ile isimlendirilmeleri doğrulanmıştır. 128 *Klebsiella* bakterisinin identifikasyonu sonucu 103 *K. pneumoniae*, 25 *K. oxytoca* elde edilmiştir. Hasta materyallerinin *Klebsiella* türlerine göre dağılımı Çizelge 3.1 ve Şekil 3.1'de verilmiştir. Hasta materyallerinin tür bazında dağılımı yapıldığında 103 *K. pneumoniae* 'nin 86 (%83)'sı idrar, 7 (%7)'si yara, 5 (%5)'i kan, 3 (%3)'ü balgam, 2 (%2)'si trakeal aspirat kültürlerinden izole edilmiştir. 25 *K. oxytoca*'nın 21 (%84)'i idrar, 2 (%8)'si yara, 1 (%4)'i trakeal aspirattan, 1 (%4)'i aspirasyon sıvısı kültürlerinden izole edilmiştir. Hasta materyallerinin 103 *K. pneumoniae* ve 25 *K. oxytoca* türlerine göre dağılımı Şekil 3.2 ve Şekil 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. 128 Hasta materyalinin *Klebsiella* türlerine göre dağılımı

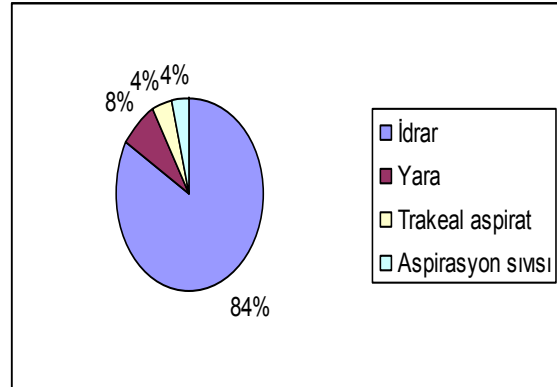
Klinik örnekler	<i>Klebsiella</i> türleri		Toplam
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	
İdrar	86	21	107
Yara	7	2	9
Kan	5	-	5
balgam	3	-	3
Trakeal aspirat	2	1	3
Aspirasyon sıvısı	-	1	1
Toplam	103	25	128



Şekil 3.1. 128 Hasta materyalinin *Klebsiella* türlerine göre dağılımı



Şekil 3.2. 103 *K. pneumoniae* bakterisinin hasta materyallerine göre % dağılımı

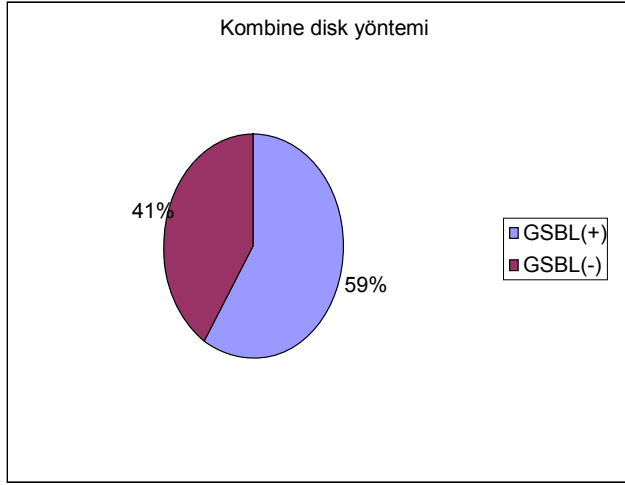


Şekil 3.3. 25 *K. oxytoca* bakterisinin hasta materyallerine göre % dağılımı

Kombine disk yöntemine göre GSBL varlığı tespitinde 128 *Klebsiella* bakterisinin 76 (%59,37)'sında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimi varlığı tespit edilirken 52 (%40,62)'sinde bu enzim saptanamamıştır. Çizelge 3.2'de Kombine disk kullanımı ile GSBL enzimi üreten 128 *Klebsiella* bakterisinin tür dağılımı, Şekil 3.4'de ise Kombine disk yöntemi ile GSBL enzimi üreten 128 *Klebsiella* bakterisinin % dağılımı gösterilmiştir. Kombine disk yöntemi ile 103 *K. pneumoniae* izolatının 64 (%62)'ünde GSBL tespit edilirken 39 (%38)'unda bu enzim belirlenememiştir. 25 *K. oxytoca* bakterisinin 12 (%48)'sinde GSBL tespit edilirken 13 (%52)'ünde belirlenememiştir.

Çizelge 3.2. Kombine disk yöntemiyle GSBL üreten *Klebsiella* bakterile

<i>Klebsiella</i> türleri	GSBL üreten ve üretmeyen suşların sayısı		Toplam
	GSBL (+)	GSBL (-)	
<i>K. pneumoniae</i>	64	39	103
<i>K. oxytoca</i>	12	13	25
Toplam	76	52	128



Şekil 3.4. Kombine disk yöntemine göre GSBL üreten *Klebsiella* bakterilerinin % dağılımı

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar, oksiminio sefalosporinleri hidrolize edebilen, klavulonik asit tarafından inhibe olabilen enzimlerdir [7]. GSBL üreten bakterileri tespit etmek için birçok yöntem ortaya konulmuştur. Bunun için kullanılan testler, çift disk sinerji testi, üç boyutlu test, E testi, seftazidim direncine bakma, daha yüksek bakteri yoğunluğunu kullanma, kombine disk yöntemi, daha dar direnç sınırları uygulanması yanı sıra bunlara göre seyrek başvurulan yöntemler olarak da klavulonik asitli besiyerinde disk difüzyon, klavulonik asit kombinasyonlu minimal inhibitör konsantrasyon, ve otomatize Vitek sistemi gibi yöntemlerdir.

Bu çalışmada *Klebsiella* bakterilerinde GSBL varlığı klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemiyle araştırıldı. Çalışmada kombine disk yöntemiyle 128 *Klebsiella* bakterisinin %59,37'si GSBL (+) pozitif bulunmuştur.

Ülkemizde ve Dünya'da kombine disk yöntemiyle GSBL sıklığını araştıran çalışmalar bulunmaktadır.

Ak ve arkadaşları 143 *Klebsiella* spp. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) varlığını çift disk sinerji ve kombine disk yöntemi (seftazidim / seftazidimklavulonik asit veya seftaksim / seftaksim-klavulonik asit) ile araştırmışlar. 143 *Klebsiella* bakterisinin 40(%27.9)'unda geniş spektrumlu beta laktamaz enzimi belirlemişlerdir [20]. Tayland'da kan örneklerinden izole edilen 31 *K. pneumoniae* bakterisiyle yapılan çalışmada klavulonik asit kombinasyonu içeren disklerin kullanımı yöntemiyle geniş spektrumlu beta laktamaz pozitif tespit edilmiştir [21].

Akman tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada 194 *Klebsiella* izolatında GSBL varlığı klavulonik asit kombinasyonu içeren disklerin kullanımı yöntemiyle çalışılmıştır. Bu yöntemle %53 oranında GSBL pozitiflik gözlemlenmiştir [22].

Nogueira ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Klavulanik asit kombinasyonu içeren disk test yöntemiyle yaptıkları çalışmada *Klebsiella pneumoniae*'de %57,4, *K. oxytoca*'da %21,4 oranında GSBL pozitiflik saptamışlardır [23].

Ülkemizde ve Dünya'da yapılan çalışmaların GSBL oranlarını kıyasladığımızda birbirinden farklı sonuçlar karşımıza çıkmaktadır. Geniş spektrumlu beta laktamaz varlığına ilişkin veriler yıldan yıla, ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kontrolsüz ve sık kullanılmalarından, hastaların özelliklerindeki farklılıklardan ve değişik tedavi yöntemlerden kaynaklanabilir.

Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar, geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere direnç göstermeleri sebebiyle enfeksiyonların tedavisinde ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotikler bakterisid etkili olması ve yan etkilerinin az olması nedeniyle tedavide oldukça sık kullanılan antibiyotiklerdir. Ancak bu ilaçların klinikteki kullanımı arttıkça bu antibiyotiklere karşı özellikle beta-laktamazlara bağlı direnç de artmaya başlamıştır [24]. Bu nedenle bakterilerin beta-laktamaz üretimlerinin araştırılması ve antibiyotik direnç durumlarının izlenip klinisyenlere bildirilmesi bu mikroorganizmalarla oluşmuş enfeksiyonların erken ve etkili antibiyotik tedavisinde önemlidir. Bir bakterinin GSBL ürettiği saptandığında in vitro duyarlılık sonucu ne olursa olsun, tüm sefalosporinler, penisilin türevleri ve monobaktamlara dirençli olarak rapor edilmelidir [17]. Sonuç olarak; GSBL üreten bakterilerin fenotipik yöntemlerle belirlenmesi ve klinisyenlere bildirilmesi enfeksiyonun tedavisi açısından oldukça önemlidir.

5- KAYNAKLAR

1. Walsh, C., "Antibiotics", First ed., ASM Pres, Washington, (2003).
2. Gür, D., "Hastane infeksiyonlarında önem kazanan gram-negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları", Hastane İnfek. Derg., 1: 38-45 (1997).
3. Opal, S, M., Medeiros, A. A., "Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Mandell G L, Bennett J E, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases", Sixth edition, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone Inc, 253-70 (2005).
4. Tanır, G., Göl, N., "Antibiyotik Direnci", Klimik Derg., 12(2):47-54 (1999).
5. Samaha-Kfoury, J.N., Araj, G.F., "Recent development in B-lactamases and extended spectrum beta lactamases", British J Med., 327:1209-1213 (2003).
6. Akçam, F.Z., Gönen, İ., Kaya, O., Yaylı, G. "Hastane infeksiyonu etkeni enterobakterilerde beta-laktam antibiyotiklere duyarlılık ve ESBL sıklığının araştırılması", Klimik Derg., 17(1): 47-9 (2004).
7. Bradford, P.A., "Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century. Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat", Clin. Micro.Rev., 14: 933-51 (2001).
8. Bush, K., "New beta-lactamases in gram negative bacteria. Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy", Clin. Inf. Dis., 32: 1085-1089 (2001).
9. Steward, C.D., Rasheed, J.K., Hubetr, S.K. ve ark., "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 Microbial., 39(8):2864-72 (2001).
10. Sanders, C.C., Sanders. W.E.J.R., "Beta-lactam resistance in gram negative bacteria: global trends and clinical impact", Clin Inf Dis, 15: 829-39 (1992).
11. Kim, J., Kwon, Y., Pai, H., Kim, J-W., Cho, D-T., "Survey of K. pneumoniae Strains Producing Extended-Spectrum β -lactamases: Prevalence of SHV-12 and Shv-2a in Korea", J. Clin. Microbiol., 36(5): 1446-1449 (1998).
12. 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 β -lactamases", Antimic. Agents Chemother., 42(3): 514-520 (1998).
13. Akyıldız, R., Özsoy, M.F., Altunay; H., Koçak, N., Çavuşlu, Ş., Yenen, O.Ş., "K. pneumoniae Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Sıklığı ve Beta

- Laktam Antibiyotik Direncinin Araştırılması", Klimik Derg., 11(2): 53-58 (1998).
14. Özkan, Ç., Oldacay, M., Erdem, G., "Hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen E. coli ve K. pneumoniae suşlarında genişlemiş spektrumlu Beta Laktamaz Sıklığı", ANKEM Dergisi, 16(1):65-68 (2002).
15. Gülay, Z., "Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta laktamlara ve Karbapenemlere direnç", Hastane İnfek. Derg., (5): 210-229 (2001).
16. Sturenburg, E., Mack, D., "Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control", J. Infect., 47(4): 273-295 (2003).
17. National committee for clinical laboratory standards. Antibiyotik disk duyarlılık yöntemleri için uygulama standartları, Onaylanmış standart , Disk difüzyon için ek Çizelgeler. 8. basım Villanova, Pa. (2003).
18. Gür, D., "GSBL'lerin Genel Özellikleri ve GSBL Tipleri, Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar", Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 5-12 (2004).
19. Colodner, R., "Extended-spectrum beta-lactamases: a challenge for clinical microbiologists and infection control specialists", Am J Infect Control 33(2): 104-107 (2005).
20. Ak, Ö., Batırel, A., Özer, S., Çolakoğlu, S., Arıkan, Z. "Yoğun bakım ünitesinden izole edilen bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıkları" Türk Mikrobiyol Cem Derg., 38 (2) : 71-76 (2008).
21. Niumsup, P. R., Tansawai, U., Boonkerd, N., Polwichai, P., Dejsirilert, S. "Dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in Thai hospitals", J Infect Chemother., 14:404-408 (2008).
22. Akman, S., "Klinik Örneklerden İzole Edilen Klebsiella Bakterilerinin identifikasyonu ve Enzimatik Aktivitesi", Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (2008).
23. Nogueira Kda, S., Higuti, I.H., Nascimento, A.J., Terasawa, L.B., Olivera, S., Matos, A.P., Souza, H.A., Cogo, L.L., Dalla Costa, L.M., "Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil", Braz J Infect Dis., 10(6):390-395 (Dec 2006).
24. David M., Livermore D.M., "Beta Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance". Clinical Microbiology