

Üropatojen Klebsiella Suşlarının Serotiplendirilmesi, Siderofor Sentezi, Serum Direnci ve Genişlemiş Spektrum Beta-Laktamaz Tayini

Mine ANĞ-KÜÇÜKER(*), Ömer KÜÇÜKBASMACI (**), Mehmet TEKİN (**), Didem AKBULUT (*), Özden BÜYÜKBABA-BORAL (*), Özdem ANĞ (*)

ÖZET

Bu çalışmada üriner sistem infeksiyonlu hastalardan izole edilen Klebsiella suşlarında (20 Klebsiella pneumoniae, 6 Klebsiella oxytoca) kapsül serotipleri, siderofor üretimi, genişlemiş spektrum beta laktamaz (GSBL) aktivitesi ve seruma dirençlilik özellikleri araştırılmıştır. 26 suştan 25'i serotiplendirilmiş ve K69 en sık görülen serotip olmuştur. Tüm Klebsiella suşlarında siderofor üretimi pozitif olarak bulunmuştur. Suşların %54'ü enterobaktin, %8'i aerobaktin üretmektedir. İki suşta GSBL aktivitesi saptanmıştır. Suşların çoğunluğu seruma dirençli bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, genişlemiş spektrumlu betalaktamaz, siderofor, serotiplendirme, enterobaktin, aerobaktin

SUMMARY

Serotyping, Siderophore Synthesis, Serum Resistance and Extended Spectrum Beta-Lactamase Activity of Uropathogen Klebsiella Strains

In this study, we investigated the capsular serotypes, siderophore, extended spectrum betalactamase (ESBL) activity and serum resistance properties of Klebsiella strains (20 Klebsiella pneumoniae, 6 Klebsiella oxytoca) isolated from patients with urinary tract infection. Of the 26 isolates, 25 could be serotyped and serotype K69 was the most common. All Klebsiella strains expressed siderophore. %54 and 8% of the isolates express enterobactin and aerobactin, respectively. ESBL activity was detected in two of the strains. The majority of the strains were highly serum resistant.

Keywords: Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, extended spectrum beta-lactamase, siderophore, serotyping, enterobactin, aerobactin.

GİRİŞ

Klebsiella türleri insanda sıklıkla üriner sistem infeksiyon etkeni olarak saptanan bakteriler arasındadır. Bu bakteriler aynı zamanda nozokomiyal infeksiyonların da önemli etkenidirler (1,2). Üroloji kliniklerinde epidemilere yol açtıkları bilinmektedir.

Klebsiella cinsi bakterilerde polisakkarit yapısındaki kapsül önemli virulans faktörlerindedir (3). Günümüze kadar 82 değişik kapsül antijeni bildirilmiş, ayrıca belirli bölgelerdeki infeksiyon ile bazı kapsül tipleri arasında ilişki olabileceği gösterilmiştir (4,5). Klebsiella türlerinin patojenitelelerinde etkili olabilen diğer önemli özellikleri ise si-

derofor üretimi ve seruma dirençleridir. Serum direncine klinik örneklerde daha sıklıkla rastlanırken, çevresel ve dışkı örneklerinden izole edilen suşlarda daha az oranda rastlanılmaktadır (6,7).

1982 yılından beri Klebsiella suşlarında geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı, plazmid kaynaklı direnç saptanmaktadır (8-10). Bu direnç genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) olarak adlandırılmıştır. GSBL oluşturan suşlar hastane infeksiyonu epidemilerine neden olabilmeleri, taşıdıkları direnç plazmidleri türler arasında da transfer edilebildiğinden daha da önem kazanmaktadır (4).

Bu çalışmada üriner sistem infeksiyonu etkeni olarak izole edilen Klebsiella suşlarında kapsül serotipleri, siderofor üretme yetenekleri, serum dirençleri ve enterobaktin, aerobaktin, GSBL üre-

(*) İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

(**) İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma enstitüsü

timi, özelliklerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakteri: İdrar örneklerinden izole edilen 20 *Klebsiella pneumoniae* ve 6 *Klebsiella oxytoca* olmak üzere toplam 26 suş incelenmiştir. Suşların identifikasyonları konvansiyonel yöntemlerle yapılmıştır.

Kapsül tiplendirilmesi: Suşlar Ullmann (11) tarafından tarif edilen kapsül şişme reaksiyonu yöntemine göre Kiel Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji ve Viroloji Enstitüsü, Almanya'da tiplendirilmiştir.

Siderofor tayini: Siderofor üretiminin saptanması için Schwyn ve Neilands'ın krom azurol S (CAS) agarı kullanılmıştır (12). Enterobaktin ve aerobaktin üreten suşların saptanması için Hantke'nin çapraz beslenme yöntemi uygulanmıştır (13). Siderofor tip tayininde enterobaktin indikatör suşu olarak *E.coli* H1939, aerobaktin indikatör suşu olarak *E.coli* LG1522 kullanılmıştır.

Serum direnci: Bakterilerin insan serumuna duyarlılıkları Podschun'un tarif ettiği yöntemle saptanmıştır (7). Bakterilerin insan serumunun bakterisidal etkisine karşı cevapları incelenmiş ve duyarlı (1. ve 2. derece), orta duyarlı (3 ve 4) ve dirençli (5 ve 6) olmak üzere 6 derece ayırtedilmiştir. Orta duyarlı ve dirençli olanlar serumun bakterisidal aktivitesine dirençli kabul edilmişlerdir.

Antibiyotiklere duyarlılık: Antibiyotiklere duyarlılık NCCLS standartlarına uygun olarak disk difüzyon yöntemi uyarınca belirlenmiştir (14).

GSBL saptanması: Mueller-Hinton agar yüzeyine, çevreye disk difüzyon yönteminde kullanılan antibiyotik diskleri ve ortaya amoksisilin-klavulanik asit diskleri yerleştirilmiştir. Ortadaki disk ile çevredeki diskler arasındaki uzaklık 3 cm olacak şekilde ayarlanmıştır. 18-20 saat inkübasyondan sonra aztreonam, seftazidim ve sefotaksime ait inhibisyon zonlarının klavulanik asit diski karşısında bozularak en az 4 mm genişlemesi ya da iki inhibisyon zonu arasındaki bakteri üreyen alanda üreme olmayan bir bölgenin görülmesi, suşun

GSBL oluşturması olarak değerlendirilmiştir (15,16).

BULGULAR

Serotipler: 26 suştan 25'i serotiplendirilmiş ve 11 değişik serotip belirlenmiştir. K69 (%34) en sık görülen serotip olurken bu serotipi K33 (%15) ve K62 (%15) izlemektedir. Suşlar arasında serotiplerin dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

Siderofor: Tüm *Klebsiella* suşlarında siderofor üretimi pozitif olarak belirlenmiştir. Suşların %54'ü enterobaktin, %8'i aerobaktin üretmektedir.

Tablo 1. Suşlar arasında serotip dağılımı

Kapsül Tipi	n (%)
K69	9 (34)
K33, K62	4 (15)
K14,K17,K18,K23,K26,K38, K39,K70,n.t	1 (4)

n.t: Tiplendirilemeyen

dir. Aerobaktin üreten suşların tümü *K.pneumoniae*'dir. (Tablo 2).

Serum direnci, GSBL ve antibiyotik duyarlılığı: Suşların çoğunluğu (%53) serumun bakterisidal aktivitesine yüksek derecede dirençli bulunur-

Tablo 2. Suşlar arasında siderofor üretiminin dağılımı

	Enterobaktin		Aerobaktin	
	n	%	n	%
<i>K.pneumoniae</i> (20)	11	55	2	10
<i>K.oxytoca</i> (6)	3	50	-	-
Toplam (26)	14	54	2	8

ken, *K.pneumoniae* suşlarının %77'si, *K.oxytoca* suşlarının yarısı serumla dirençli bulunmuşlardır (Tablo 3).

TARTIŞMA

Hastane infeksiyonlarında etken olarak izole edilen *Klebsiella* suşları geniş kapsül tipi dağılımı

Tablo 3. Suşlar arasında serum direncinin dağılımı

	Serum Direnci Dereceleri					
	1 (n)	2 (n)	3 (n)	4 (n)	5 (n)	6 (n)
<i>K.pneumoniae</i> (20)	-	3	5	-	3	9
<i>K.oxytoca</i> (6)	1	2	1	-	-	2
Toplam (26)	1	5	6	-	3	11

Tablo 4. İncelenen Klebsiella suşlarında antibiyotiklere dirençli olanların sayı ve yüzdeleri*

Klebsiella pneumoniae (n=20)	Klebsiella oxytoca (n=6)	Toplam (n=26)	%
AMC	7	9	(34)
SAM	8	10	(38)
FOX	0	0	
CRO	2	4	(15)
CTX	2	4	(15)
CAZ	2	4	(15)
CDZ	2	4	(15)
75/30	1	1	(4)
FEP	0	0	
MEM	0	0	
IMP	0	0	
ATM	2	3	(11)
GN	0	1	(4)
TOB	1	3	(11)
NET	0	0	
AK	0	0	
SXT	3	4	(15)
CIP	0	0	

* Orta duyarlı suşlar dirençli olarak sınıflandırılmıştır

*Bir K.pneumoniae, bir K.oxytoca olmak üzere iki suşta GSBL saptanmıştır. Klebsiella suşlarının antibiyotik duyarlılıkları Tablo 4'te verilmiştir.

*AMC: Amoksisilin-klavulanat, SAM: Ampisilin-sulbaktam, FOX: Sefoksitin, CRO: Seftriakson, CTX: Sefotaksim, CAZ: Sefotazidim, CDZ: Sefodizim, 75/30: Sefaperazon-sulbaktam, FEP: Sefepim, MEM: Meropenem, IMP: İmipenem, ATM: Aztreonam, GN: Gentamisin, TOB: Tobramisin, NET: Netilmisin, AK: Amikasin, SXT: Trimethoprim-sulfametaksazol, CIP: Siprofloksasin

göstermektedirler (17,18). Bazı epidemiyolojik çalışmalar serotiplerin infeksiyon bölgesine göre homojenlik gösterebileceği gibi tamamen heterojen olabileceğini de göstermektedir. K2 serotipi klinik örneklerden en sık izole edilen serotiptir (19-21). K2 serotipinin üriner sistem infeksiyonu epidemiyolojisinde ek avantajlara sahip olduğu açıktır. İdrar örneklerinde K2 dışında, K8, K9, K10 ve K21 diğer sık görülen serotiplerdir. Bu çalışmada ise K69, K33 ve K62 baskın serotip olarak bulunmuştur. En sık bulunan K69 serotipinin K2 serotipi ile çapraz reaksiyon verebildiği bilinmektedir. Serotiplendirmenin en zayıf yönü olarak tipler arasındaki çapraz reaksiyonlar gösterilmektedir (19,22).

İnsan serumunun bakterisidal etkisine karşı gösterilen serum direnci önemli ve virulans faktörü olarak tanımlanmaktadır. Kommensal veya invaziv olmayan suşlar genellikle seruma duyarlı bulunurken, patojen suşların dirençli olduğu gösterilmiştir (19). İdrar örneklerinden izole edilen suşların serum dirençleri semptomların şiddetine ve izolasyon bölgelerine göre değişkenlik göstermektedir (19,23). Bu çalışmada suşlar çoğunlukla yüksek dirençli bulunurken (%53), sadece %23'ü serum duyarlı bulunmuştur. K.pneumoniae suşlarının %77'si dirençli bulunurken, K.oxytoca suşlarının %50'si serum dirençli bulunmuştur. Diğer çalışmalarla uyumlu olarak K.pneumoniae suşlarının K.oxytoca suşlarına kıyasla serum direncine daha çok sahip olduğu saptanmıştır. Şüphesiz tanımlanmış veya tanımlanamayan birçok virulans faktörü ve konak savunmasındaki değişkenlikler sonuçları etkileyebilmektedir. Genel olarak K.pneumoniae'nin K.oxytoca'ya göre daha virulan olması, daha fazla virulans faktörüne sahip olmasından kaynaklanmaktadır.

Kısıtlı demir içeriği ile üriner sistem, bakteriyel patojenlerin ancak demir bağlayan bileşikler olarak bilinen siderofor üretmek yaşamlarını sürdürdürebildiği bir bölgedir. Enterobacteriaceae ailesinin temel sideroforu olan enterobaktinin etkileri tam olarak bilinmemektedir (6,19). Bununla beraber aerobaktinin virulansa katkısı açıkça gösterilmiştir (24). Bu çalışmada tüm suşların siderofor üretimi pozitif bulunmuştur. Suşlar %54 oranında enterobaktin ve %8 oranında aerobaktin üretmektedir. K.pneumoniae suşlarının %50'si, K.oxytoca suşlarının %66'sı enterobaktin üretmektedir. Bu sonuçlar diğer çalışmalarla kıyaslandığında daha düşük orandadır (6,25). Aerobaktin üretimi ise K.pneumoniae'nin virulansı ile doğrudan ilişkilidir. Enterik bakteriler daha sık enterobaktin üretirken, aerobaktin üretimi daha sınırlı kalmaktadır. Bu çalışmada aerobaktin üretimi diğer çalışmalarla uyumlu olarak düşük bulunmuştur (6,26).

Bu çalışmada 3. kuşak sefalosporinlerin dördüne (seftriakson, sefotaksim, seftazidim, sefodizim) aynı oranda (%15) direnç saptanırken, 4. kuşak sefalosporinlere, karbapenemlere, sefoksitin ve siprofloksasine direnç saptanmamıştır. Aminoglikozid grubu antibiyotikler içerisinde en etkili ne-

tilmisin ve amikasin bulunurken, en yüksek direnç tobramisine karşı bulunmuştur (%11.5).

Enterobacteriaceae ailesindeki birçok bakteri cinsinin GSBL oluşturduğu, en sık GSBL üreten türün *K.pneumoniae* olduğu saptanmıştır. ABD’de yapılan bir çalışmada *Klebsiella* suşlarının %5’nin GSBL oluşturduğu saptanırken, bu oran Avrupa’da %14-16’lara kadar çıkabilmektedir. Bazı özel bölgeler ve hastanelerde %40’lara varan oranlarda bildirilmektedir (4). Bu çalışmada incelenen *K.pneumoniae* suşlarının %8’nin GSBL oluşturduğu saptanmıştır. Ülkemizdeki çeşitli merkezlerde yapılan çalışmalarda, GSBL üreten suşların oranı genellikle yüksek bulunmaktadır. Abacıoğlu ve ark. (27)’nin bir çalışmasında nozokomiyal salgın döneminde yenidoğan ünitesindeki 34 hastadan izole edilen *K.pneumoniae* suşlarının tümünün GSBL ürettiği gösterilmiştir. Aynı merkezde yapılan bir diğer çalışmada 24 *K.pneumoniae* suşunun %62’sinde GSBL üretimi belirlenmiştir (28). Vahaboğlu ve ark. (29) hastane kaynaklı gram negatif çomaklarda GSBL oranını %24 olarak belirlemişlerdir. Aradaki farklılık lokal epidemiyolojik faktörlere, genel infeksiyon kontrol önlemlerine ve antibiyotik kullanım politikalarına bağlanabilir.

Bu çalışmada az sayıda suş incelenmekle beraber, bu araştırma yapılması planlanan epidemiyolojik çalışmanın ön çalışması olarak düşünülmüştür. Üriner sistem infeksiyonlarına yol açan *Klebsiella*’ların ampirik tedavisi için bu suşların direnç özelliklerinin ve epidemiyolojisinin bilinmesi önemlidir. Çoğul dirençli suşların yayılmaması için antibiyotik kullanımının sınırlandırılması, infeksiyon kontrol ilkelerine sadık kalınması şarttır. Bakterilerin bazı özel ürovirulans faktörlerine sahip olmasının yanında, diyabet, immün sistemin baskılanması, yapısal bozukluklar gibi konağa ait faktörlerin de infeksiyon derecesini ve sıklığını etkileyebileceği unutulmamalıdır.

KAYNAKLAR

- 1.Christensen SC, Korner B: An endemic caused multiresistant *Klebsiella* in an urologic ward, Scand J Urol Nephrol 6: 232 (1972).
- 2.Montgomerie JZ: Epidemiology of *Klebsiella* and

hospital associated infections, Rev Infect Dis 1: 736 (1979).

3.Simoons-Smit AM, Verweij-van Vught AMJJ, MacLaren DM: The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*, J Med Microbiol 21: 133 (1986).

4.Podschun R, Ullmann U: *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors, Clin Microbiol Rev 11: 589 (1998).

5.Riser E, Noone : *Klebsiella* capsular types versus site of isolation, J Clin Pathol 34: 552 (1981).

6.Podschun R, Fischer A, Ullmann U: Siderophore production of *Klebsiella* species isolated from different sources, Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis 276: 481 (1992).

7.Podschun R, Teske E, Ullmann U: Serum resistance properties of *Klebsiella pneumoniae* and *K.oxytoca* isolated from different sources, Zentralbl Hyg Umweltmed 192:279 (1991).

8.Bauernfeind AE, Rosenthal E, Eberlein E, Holley M, Schweighart S: Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamase among hospitalized patients, Infection 21:18 (1993).

9.Brun-Buisson C, Legrand P, Phillippon A, Montravers F, Barhelemy M, Labia R: A novel extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamase not derived from TEM- or SHV- class enzymes, J Antimicrob Chemother 29:590 (1992).

10. De Champs C, Rouby D, Guelon D, Sirot J, Sirot D, Beytout D, Gourgand JM: A casecontrol study of an outbreak of infections caused by *Klebsiella pneumoniae* strains producing CTX-1 (TEM-3) beta lactamase, J Hosp Infect 18:5 (1991).

11.Ullmann U: The distribution of *Klebsiella pneumoniae* serotypes from different sources and their sensitivity to cephalosporins, Infection 11 (suppl 1): 28 (1983).

12.Schwyn B, Neilands JB: Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores, Analyst Biochem 160: 47 (1987).

13.Hantke K: Dihydrobenzoylserine- a siderophore for *E.coli*, FEMS Microbiol Lett 67:5 (1990).

14.National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Tentative standard M2-A4, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova (1990).

15.Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Phillippon A: Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns, Rev Infect Dis 10:867 (1988).

16.Nordmann P, Ronco E, Naas T, Dupont C, Yvon MB, Labia R: Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*, Antimicrob Agents Chemother 37:962 (1993).

17.Rennie RP, Duncan IBR: Combined biochemical and serological typing of clinical isolates of *Klebsiella*, Appl Microbiol 28: 534 (1974).

18.Simoons-Smit AM, Verweij-van Vught AMJJ, Kanis IYR, MacLaren DM: Biochemical and serological investigations on clinical isolates of Klebsiella, J Hyg 95: 265 (1985).

19.Podschun R, Sievers D, Fischer A, Ullmann U: Serotypes, hemagglutins, siderophore synthesis, and serum resistance of Klebsiella isolates causing human urinary tract infections, J Infect Dis 168: 1415 (1993).

20.Casewell M, Talsania HG: Predominance of certain Klebsiella capsular types in hospitals in the United Kingdom, J Infect 1: 77 (1979).

21.Smith SM, Digori JT, Eng RHK: Epidemiology of Klebsiella antibiotic resistance and serotypes, J Clin Microbiol 16: 868 (1982).

22.Orskov I, Orskov F: Serotyping of Klebsiella, Methods in Microbiol 14: 150 (1984).

23.Gower PE, Taylor PW, Koutsaimanis KG, Roberts AP: Serum bactericidal activity in patients with upper and lower urinary tract infections, Clin Sci 43: 13 (1972).

24.De Lorenzo V, Martinez JL: Aerobactin production as a virulence factor: a re-evaluation, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 7: 621 (1988).

25.Williams PH, Chart H, Griffiths E, Stevenson P: Expression of high affinity iron uptake systems by clinical isolates of Klebsiella, FEMS Microbiol Lett 44: 407 (1987).

26.Martinez JL, Cercenada JL, Baquero F, Perez Diaz JC: Incidence of aerobactin production in gram-negative hospital isolates, FEMS Microbiol Lett 43: 351 (1987).

27.Abacıoğlu YH, Aslani Mehr M, Gülay Z, İnan S, Yuluđ N: Resistotyping and plasmid profile analysis of multiply resistant Klebsiella pneumoniae strains isolated during a nosocomial outbreak, İnfek Derg 9:63 (1995).

28.Abacıoğlu YH, Yücesoy M, Gülay Z, Yuluđ N: "Extended spectrum beta-lactamase" saptanmasında E testi ile çift disk sinerji yöntemlerinin karşılaştırılması, İnfek Derg 9:93 (1995).

29.Vahaboğlu MH, Mülazımoğlu L, Erdem İ, Yıldırım İ, Taşer B, Avkan V: Taksim Hastanesi'nde beta-laktam antibiyotiklere karşı gelişen direncin sürveyansı, Klinik Derg 6:79 (1993).