

Çeşitli Nozokomiyal Enfeksiyonlara Neden Olan *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz Enzimlerinin Sıklığının Moleküler Yöntemlerle Araştırılması

Erdener BALIKÇI, Canan KESKİN

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Hastane enfeksiyonu etkenleri arasında rastlanan yüksek antibiyotik direnci önemli bir sorundur. Özellikle genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) türü direnç hastane ortamında hızla yayılmakta ve klinik sorunlara neden olmaktadır. Bu çalışmada Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında izole edilen hastane enfeksiyonu etkeni *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* izolatları arasında GSBL türü enzimlerin varlığı araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Tüm izolatların disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıklarına bakıldı ve çift disk sinerji testiyle (ÇDST) GSBL enzim varlığı araştırıldı. GSBL pozitif olup, seftazidim duyarlı fakat sefotaksim dirençli sekiz *E. coli* ile sekiz *K. pneumoniae* izolatının izoelektrik odaklama çalışması yapıldı. İzoelektrik odaklama yapılan izolatlar ile *E. coli* J-53-2 arasında transkonjügasyon denendi.

Bulgular: Yüz doksan dokuz *E. coli* izolatının 52'sinde (% 26,1), 111 *K. pneumoniae* izolatının 33'ünde (% 29,7) GSBL pozitifliği saptandı ve genel GSBL oranı % 27,4 olarak bulundu. Sekiz *E. coli* izolatının yedisinde ve sekiz *K. pneumoniae* izolatının altısında CTX-M türü beta-laktamazlarla uyumlu olduğu düşünülen enzim bantları saptandı. Bu izolatlardan yedi *E. coli* ve altı *K. pneumoniae* olmak üzere toplam 13 transkonjügat elde edildi. ÇDST ile bu 13 transkonjügatın GSBL yaptığı doğrulandı. Transkonjügatlara da izoelektrik odaklama çalışması ve plazmit izolasyonu yapıldı. Transkonjügatların hepsinde CTX-M türü beta-laktamazlarla uyumlu olduğu düşünülen enzim bantları saptandı. Plazmit izolasyonunda çoğunlukla farklı plazmit bantları saptandı.

Sonuç: GSBL pozitif bakteriler, tedavisi pahalı ve güç hastane enfeksiyonlarına neden olduklarından sıklıklarının sürekli izlenmesi ve ortaya çıkmalarının ve yayılmalarının önlenmesi için geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerin dikkatli kullanılması gerekir.

Anahtar kelimeler: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, çift disk sinerji testi, beta-laktam antibiyotikler

SUMMARY

The Molecular Investigation of Extended Spectrum Beta-lactamase Enzymes of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Strains Isolated from Various Nosocomial Infections

Objective: Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) mediated antibiotic resistance is a common problem among the causative agents of nosocomial infections both in terms of treatment failure and nosocomial spread. In this study, we investigated the presence of ESBL enzymes in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated in Microbiology Laboratory of Kocaeli University Medical School.

Materials and Methods: The antibiotic susceptibilities of the isolates were determined by the disc diffusion method and the presence of the ESBL enzymes was investigated by double disc synergy test. Isoelectric focusing was performed for ESBL positive eight *E. coli* and eight *K. pneumoniae* isolates which were susceptible to ceftazidime and resistant to cefotaxime. Transconjugation experiments were performed between these eight positive isolates and the recipient *E. coli* J-53-2.

Results: ESBL positivity was detected in 52 (26.1 %) out of 199 *E. coli* and 33 (29.7 %) out of 111 *K. pneumoniae* isolates. The presence of ESBLs was confirmed by isoelectric focusing. Enzyme bands consistent with CTX-M type beta-lactamases were determined in isoelectric focusing in seven *E. coli* and six *K. pneumoniae* isolates. Plasmid isolations done in these transconjugates revealed presence of different kinds of plasmids.

Conclusion: Since the treatment of infections due to ESBL positive bacteria is costly and problematic, the surveillance of ESBL positive bacteria is of critical importance in the nosocomial setting.

Key words: Extended spectrum beta-lactamase, double disk synergy, beta-lactam antibiotics

Alındığı tarih: 23.06.2010

Kabul tarihi: 25.01.2011

Yazışma adresi: Erdener Balıkçı, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Umut Tepe Kampüsü, 41200 Kocaeli
e-posta: erdener-b@hotmail.com

GİRİŞ

Hastane enfeksiyonuna neden olan bakterilerin antibiyotiklere olan direnci tedaviyi zorlaştırmaktadır. Sık kullanıldığından beta laktam antibiyotiklere karşı direnç daha fazla görülmektedir. *Klebsiella* türleri ve *Escherichia coli* izolatlarının beta-laktam direncinden genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) adı verilen enzimler sorumludur. Bu enzimler en sık plazmidler üzerinde kodlanır ve yayılırlar ⁽¹⁾. GSBL üreten *Klebsiella* türleri ve *E. coli*, bazen enzimin az miktarda üretilmesi dolayısı ile rutin duyarlılık testlerinde beta-laktam antibiyotiklere duyarlı bulunabilirler. Bu özelliğe sahip izolatların tedavisinde dikkatli olunması önerilmektedir ^(2,3).

GSBL üreten klinik izolatların çoğunluğunu, hastanede yatan hastalardan izole edilen ve en çok nozokomiyal salgın nedeni olan *K. pneumoniae* ve daha az olarak *E. coli* ve diğer *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri oluşturmaktadır. GSBL türü enzim kodlayan direnç plazmidleri beta-laktam antibiyotiklerin yoğun olarak kullanılması sonucu oluşan baskı altında kolaylıkla yayılmakta ve dirençli klonlar seçilerek artmaktadır. Bu izolatlarla olan salgınlardan en fazla hastanede uzun süre kalanlar, operasyon geçirenler, damar içi ve üriner katateri olanlar ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalar etkilenmektedir. GSBL taşıyan bakterilerin yoğun bakımda yatan hastalarda geliştirdikleri enfeksiyonlarda mortalite % 30-50 arasında değişir ⁽⁴⁾.

Plazmid kaynaklı dar spektrumlu beta-laktamazlar birinci kuşak sefalosporinlere karşı zayıf aktivite gösteren TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleridir. Bu enzimler üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinleri, aztreonam ve karbapenemleri parçalayamazlar. Özellikle seftazidim, sefotaksim gibi üçüncü kuşak sefalosporinlerin kullanımında son yıllarda büyük bir artış olmuştur. Ancak, 1980'lerin ortalarından sonra yaygınlaşmaya başlayan mutant enzimler üçüncü kuşak sefalosporinleri ve aztreonamı da etkisiz hale getirmeye başlamışlardır. Bu enzimlere sahip mutant bakteriler sefotaksim, seftazidim ve diğer geniş spektrumlu sefalosporinlere ve aztreonama değişik derecelerde direnç özelliği kazanırlar. Sefamisinlere ve karbapenemlere karşı duyarlıdırlar. Bu enzimler

çok geniş bir substrat profiline sahip olduğundan GSBL olarak isimlendirilmiştir ⁽⁵⁾. Günümüzde TEM ve SHV mutantları dışında sefotaksimi hidroliz eden CTX-M türü enzimler ve GES türü enzimler gibi yeni GSBL türü enzimler saptanmıştır ^(5,6).

GSBL ilk olarak 1983 yılında Almanya'dan ve daha sonra 1987 yılında Fransa'dan bildirilmiştir. GSBL'ler 1991 yılından itibaren bütün dünyada bildirilmeye başlanmıştır. Pek çok sayıda ve çeşitli GSBL enzimi ve bunların üretimini düzenleyen mekanizmalar saptanmıştır. GSBL üreten izolatların sayısı bütün dünyada hızlı bir şekilde artmaktadır ⁽⁷⁾.

GSBL enzimlerinin yayılımı hakkında birçok epidemiyolojik çalışma vardır. Bu çalışmalar başlıca İngiltere, İspanya, Portekiz, İtalya, Yunanistan, ABD, Kuzey Afrika, Güney Amerika ve Çin'den bildirilmiştir ⁽⁸⁾. Baskın tipler coğrafi olarak değişiklikler gösterir. SHV-2 ve SHV-5 Almanya'da, SHV-3, SHV-4 ve TEM-3 Fransa'da, SHV-5 ise Yunanistan ve Türkiye'de en yaygın olan GSBL enzimleridir ⁽⁷⁾. Son yıllarda Türkiye'de CTX-M türü GSBL'ler de bildirilmektedir ⁽⁹⁾.

GSBL türü direnç hızla yayılmakta ve klinik sorunlara neden olmaktadır. Bu çalışmanın amacı Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen nozokomiyal enfeksiyon etkeni *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatları arasında GSBL türü enzimlerin sıklığını araştırmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatlar: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na 2003-2004 yılları arasında gelen çeşitli klinik örneklerden, hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilmiş her biri ayrı bir hastaya ait 199 *E. coli*, 111 *K. pneumoniae* olmak üzere toplam 310 izolat çalışmaya alındı. İzolatların 200'ü (% 64.5) yoğun bakımdan geri kalan 110 izolat (% 35.5) serviste yatan hastalardan izole edildi.

Bakterilerin tanımlanması: İncelenecek bakteriler koyun kanlı agar ve EMB besiyerine ekildi ve

37°C'da 18 saatlik inkübasyondan sonra oluşan koloniler incelendi. Saf olarak üreyen bakterilere Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri yapıldı. Katalaz pozitif ve oksidaz negatif olanlar için biyokimyasal tanımlama testleri uygulandı⁽¹⁰⁾.

Çift disk sinerji testi (ÇDST) ile GSBL yapımının araştırılması: ÇDST, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) verilerine uyularak yapıldı⁽¹¹⁾. Her izolat için 9 cm çaplı plağa dökülmüş Mueller-Hinton agar kullanıldı. Plakların ortasına 20 µg amoksisilin-klavulanik asit (AMC) diski çevresine merkezler arası uzaklıkları 23 mm olacak şekilde 30 µg sefotaksim (CTX), seftazidim (CAZ), aztreonam (ATM) ve seftriakson (CRO) diskleri steril bir pens ile yerleştirildi ve plaklar 18-20 saat 35°C'da inkübe edildi^(12,13). ATM, CAZ, CRO ve CTX'e ait inhibisyon zonlarının AMC diski karşısında bozularak genişlemesi ya da iki inhibisyon zonu arasındaki bakteri üreyen alanda üreme olmayan bir bölgenin görülmesi, diğer bir deyimle klavulanik asidin antibiyotiği güçlendirmesi durumunda o izolatin GSBL ürettiğine karar verildi^(12,13). ÇDST ile aynı zamanda bakterilerin AMC, CTX, CAZ, CRO ve ATM antibiyotiklerine olan duyarlılıkları da araştırıldı.

Enzim İzolasyonu ve İzoelektrik Noktanın Saptanması: Mikrosantrifüj tüplerine 250 µl 0.1 M fosfat tamponu (pH:7.0) dağıtıldı. Kanlı agarda üreyen bakteri kolonilerinden 3-4 koloni eküvyonla alınarak fosfat tampon içinde süspanse edildi. Mikrosantrifüj tüpleri kuru buzda 15 dakika, 37°C'lık su banyosunda 10 dakika bekletildi. Bu döngü 10 kez yineleni ve hücre duvarının parçalanması sağlandı. Daha sonra 12.000 g'de 15 dakika santrifüj edilerek üst kısım yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve izole edilen enzimler -20°C'da saklandı⁽¹⁴⁾. Beta-laktamazların tiplendirilmesi izoelektrik focusing (IEF) yöntemi ile yapıldı. Bu amaçla amfolit (pH: 3-10, Sigma Chem Co) içeren poliakrilamid jel döküldükten sonra beta-laktamaz içeren bakteri sonikatlarından 25 µL alındı, 5 µL % 50'lik gliserol ile karıştırıldı ve bu karışımlardan 20 µL jeldeki çukurlara damlatıldı. Her jele ayrıca referans enzim olarak izoelektrik noktaları bilinen TEM-1 (pI:5.4), OXA-1 (pI:7.4), SHV-1 (pI:7.6) ve

IEF standart belirtecinden 5'er µL damlatıldı. Poliakrilamid jel IEF cihazında (111 Mini IEF, Bio-Rad) üretici firmanın önerileri doğrultusunda 1,5 saat yürütüldü. Elektroforez işlemi bittikten sonra beta-laktamaz bantlarını görünür hale getirmek için jelin üzerine nitrosefin çözeltisi damlatıldı ve bagetle yayıldı. Kırmızı bantlar olarak belirginleşen beta-laktamaz bantlarının anoda olan uzaklıkları milimetrik kağıda işaretlendi ve fotoğrafları çekildi⁽¹⁴⁾.

Transkonjugasyon: Sefotaksime dirençli verici bakteriler ve rifampisine dirençli alıcı bakteri (*E. coli* J-53-2) ayrı ayrı triptic soy brotha ekildi ve 18-20 saat 35°C'da inkübe edildi. Daha sonra *E. coli* J-53-2'den 1 ml verici bakterilerden 3 ml alınıp karıştırıldı ve karışım 35°C'da dört saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra karışım 10 dakika 2.000 g'de santrifüj edilip dipte oluşan çökelek Mueller Hinton agara ekildi ve 18-20 saat 35°C'de inkübe edildi. Ertesi sabah üreyen karışık bakterilerden alınarak sefotaksim (4 mg/ml) ve rifampisin (100 mg/ml) antibiyotiklerini içeren Mueller Hinton agara tek koloni düşecek şekilde ekilerek bir gece inkübe edildi. Rifampisin ve sefotaksim içeren besiyerinde rifampisinden dolayı *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşları, sefotaksimden dolayı *E. coli* J-53-2 suşu üremeyeceği ve yalnızca sefotaksim direncini alan ve kendisi zaten rifampisine dirençli olan *E. coli* üreyeceğinden transkonjugasyonla sefotaksime dirençli hale gelen *E. coli* suşları ayrıldı⁽¹⁴⁾.

Plazmid izolasyonu (Alkali Lizis Metodu): Sıvı besiyerinde üretilmiş bakteri (8 µg/ml sefotaksimli Muller Hinton broth) mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 12.000 g'de 30 sn 4°C'da santrifüj edildi. Bakteri çökeltisi 100 ml soğuk solüsyon I (Glukoz/Tris/EDTA (GTE) Solüsyonu: 50 mM glukoz, 25 mM Tris Cl, 10 mM EDTA, pH: 8.0) ile resüspanse edildi ve vortekslenip oda ısısında 5 dakika bekletildi. Daha sonra 200 ml solüsyon II (NaOH/SDS Solüsyonu: 0.2 M NaOH, % 1 (w/v) SDS) eklendi ve beş kez baş aşağı edilip tüp 5 dakika buzda bekletildi. Soğuk solüsyon III'den (5 M Potasyum Asetat Solüsyonu ve pH) 150 ml eklendi ve birçok kez baş aşağı edildi. Tüp 5 dakika buzda bekletildi, 12.000 g'de 4°C'da 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Eşit miktar fenol-kloroform

eklenerek vortekslenildi ve 12.000 g'de 4°C'da 2 dakika santrifüjlendi ve süpernatant temiz bir tüpe alındı. Eşit miktarda kloroform izoamil alkol eklenerek vortekslenildi, 12.000 g'de 2 dakika santrifüjlendi ve süpernatant temiz bir tüpe alındı. Çift zincirli DNA % 95 etanol ile oda ısısında çöktürülerek, vortekslenildi ve 2 dakika oda ısısında bekletildi. Santrifüjden (12.000 g'de 4°C'da 5 dakika) sonra süpernatant atıldı. Etanol (% 70) 1 ml konularak 5 dakika santrifüjlendi ve üst kısım atıldı. Pelet kurutuldu ve 50 µl Tris-EDTA (pH=8) solüsyonunda çözüldü. DNase içermeyen pankreatik RNase 20 µl konup, vortekslenildi ve -20°C'da saklandı⁽¹⁵⁾.

BULGULAR

Yüz doksan dokuz *E. coli* ve 111 *K. pneumoniae* suşlarının disk difüzyon yöntemi ile tespit edilen duyarlılıkları Tablo 1'de sunulmuştur.

Çift disk sinerji yöntemi ile 199 *E. coli* izolatının 52'si (% 26.1), 111 *K. pneumoniae* izolatının 33'ünde (% 29.7) GSBL pozitif bulundu. *E. coli*'lerde GSBL pozitif CTX duyarlı izolat bulunmadı; GSBL negatif bir izolat CTX'e dirençli bulundu. GSBL pozitif 13 izolat CAZ duyarlı ve negatif bir izolat ise CAZ dirençli bulundu. GSBL pozitif ATM duyarlı izolat bulunmadı ve negatif bir izolat ATM'a dirençli bulundu. GSBL pozitif CRO duyarlı izolat bulunmadı. GSBL negatif bir izolat CRO'a dirençli bulundu. *K. pneumoniae* izolatlarında GSBL pozitif AMC dirençli izolat bulunmadı. GSBL negatif AMC dirençli yedi izolat bulundu. GSBL pozitif bir izolat CTX duyarlı ve GSBL negatif bir izolat CTX dirençli bulundu. GSBL pozitif beş izolat CAZ duyarlı ve GSBL negatif bir izolat CAZ dirençli bulundu. GSBL pozitif ATM duyarlı izolat bulunmadı ve GSBL nega-

tif bir izolat ATM dirençli bulundu. GSBL negatif CRO dirençli ve GSBL pozitif CRO duyarlı izolat bulunmadı.

GSBL pozitif bulunan orijinal izolatlardan seftazidime duyarlı, sefotaksime dirençli sekiz *E. coli*, sekiz *K. pneumoniae* seçilerek enzim ekstraksiyonu ve izoelektrik odaklama çalışması yapıldı. İEF enzimlerin (proteinlerin) sürekli bir pH gradiyentinde izoelektrik noktalarına göre ayrışması temeline dayalı bir yöntem olup, GSBL çalışmalarında enzimlerin kabaca pI değerlerine göre tanımlanmasını sağlar.

İzoelektrik odaklama çalışması yapılan sekiz *E. coli* izolatının biri; *K. pneumoniae* izolatında ikisi hariç hepsinde pI 8'in üzerinde enzim bantları saptandı (Tablo 2). GSBL enzimlerinin araştırılmasında İEF yöntemiyle beta laktamaz enzimlerinin izoelektrik odak noktalarına göre gruplandırmasını yapmak yol

Tablo 2. Suşların pI değerleriyle direnç paternleri arasındaki ilişki.

BAKTERİ	SUŞ NO	CAZ	CTX	
<i>E. coli</i>	16	Orta	Dirençli	
	71	Duyarlı	Dirençli	
	119	Orta	Dirençli	
	149	Duyarlı	Orta	
	160	Duyarlı	Orta	
	166	Duyarlı	Orta	
	193	Orta	Dirençli	
	195	Duyarlı	Dirençli	
	<i>K. pneumoniae</i>	6	Duyarlı	Orta
		16	Duyarlı	Orta
61		Duyarlı	Dirençli	
68		Duyarlı	Orta	
73		Duyarlı	Dirençli	
78		Duyarlı	Dirençli	
96		Orta	Dirençli	
97		Duyarlı	Dirençli	

Koyu renkle belirtilen suşlarda pI değerinin 8'in altında olduğunu saptanmıştır.

Tablo 1. *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarının disk difüzyon yöntemi ile tespit edilen duyarlılıkları.

Antibiyotikler	<i>E. coli</i> (199)			<i>K. pneumoniae</i> (111)		
	Duyarlı (%)	OD (%)	Dirençli (%)	Duyarlı (%)	OD (%)	Dirençli (%)
AMC	153 (77)	44 (22)	2 (1)	87 (78)	17 (15)	7 (6)
CTX	144 (72)	6 (3)	49 (25)	74 (67)	8 (7)	29 (26)
CAZ	158 (79)	17 (8)	24 (12)	80 (72)	8 (7)	23 (21)
ATM	145 (73)	9 (4)	45 (23)	75 (68)	10 (9)	26 (23)
CRO	145 (73)	5 (2)	49 (25)	74 (67)	11 (10)	26 (23)

AMC: amoksisilin-klavulanik asit; CTX: sefotaksim; CAZ: seftazidim; ATM: aztreonam; CRO: seftriakson

göstericidir. CTX-M tipi GSBL'ler TEM ve SHV dışında pI 8'in üzerinde odaklanır bu nedenle bu iki enzimin CTX-M türü beta laktamazlarla uyumlu olduğunu düşünüldü.

Sefotaksim dirençli sekiz *E. coli*, sekiz *K. pneumoniae* izolatında *E. coli* J-53-2 ile transkonjugasyon denendi. Yedi *E. coli*, altı *K. pneumoniae* olmak üzere 13 izolattan transkonjugat elde edildi. Çift disk sinerji testi ile 13 transkonjugatın GSBL yaptığı doğrulandı. Transkonjugatlarda CTX direncinin, CAZ direncinden daha fazla olduğu görüldü. Transkonjugatların pI 8 civarında enzim bantları görüldü. CTX-M türü beta-laktamazlarla uyumlu olduğu düşünüldü. Transkonjugatlarda plazmid izolasyonu yapıldı, çoğunda farklı plazmid bantları saptandı.

TARTIŞMA

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiş 199 *E. coli*, 111 *K. pneumoniae* olmak üzere 310 izolat çalışıldı. Disk diffüzyon yöntemi ile 199 *E. coli* izolatında sefotaksime % 25, seftazidime % 12, amoksisilin klavulanik asite % 1, aztreonama % 23, seftriaksona % 25; 111 *K. pneumoniae* izolatında sefotaksime % 26, seftazidime % 21, amoksisilin klavulanik asite % 6, aztreonama % 23, seftriaksona % 23 direnç saptandı. Bu direnç oranları ülkemizde yapılmış çalışmalara göre yüksek değildir. Hacettepe Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yapılmış bir çalışmada *Klebsiella* türleri ve *E. coli*'deki direnç oranlarını sırasıyla seftazidim için % 65 ve % 17, seftriakson için % 60 ve % 19, aztreonam için % 64 ve % 17 bulunmuştur ⁽¹⁶⁾. Günseren ve ark. ⁽¹⁷⁾ sekiz hastanenin yoğun bakım ünitelerinden (YBÜ) izole ettikleri *E. coli*'lerde seftazidim, sefotaksim, seftriakson duyarlılıklarını sırasıyla % 71.4, % 69.6, % 73.6; *K. pneumoniae*'lerde seftazidim, sefotaksim, seftriakson duyarlılıklarını sırasıyla % 14.5, % 3.3 ve % 20 olarak bulmuştur. Hastane kaynaklı *E. coli* izolatlarında, direnç oranları seftazidim % 17, sefotaksim % 12.8, seftriakson % 12.8, aztreonam % 14.9, amoksisilin klavulanik asit % 49 olarak saptanmıştır ⁽¹⁸⁾. Yurt dışında özellikle batı ülkelerinde direnç oranları daha düşük bildirilmektedir. YBÜ'lerinde

izole edilen *Klebsiella* türlerinde seftazidim direnci Fransa'da % 16, Londra'da % 11, Chicago'da % 20, Bangkok'da % 50 bulunmuştur ⁽⁴⁾. Klinik kullanıma 1980'li yıllarda giren genişlemiş spektrumlu sefalosporinlerin özellikle nozokomiyal kökenli gram negatif enfeksiyonlarda yaygın biçimde kullanımı bu antibiyotiklere karşı da bakterilerin etkili enzimler üretmelerine yol açmıştır.

Çalışmamızda *E. coli* ve *K. pneumoniae* arasında GSBL oranı sırası ile % 26.1 ve % 29.7 bulunmuştur. Ülkemizde bu konu ile ilgili olarak çeşitli merkezlerde yapılan çalışmalarda, farklı oranlar elde edilmiştir. Avrupa ülkelerini kapsayan çok merkezli bir araştırmada yoğun bakım ünitelerinden soyutlanan *Klebsiella* izolatlarında GSBL araştırılmış, Türkiye'den elde edilen izolatlarda % 59 oranında GSBL pozitifliği saptanmıştır ⁽³⁾. Livermore ve ark. ⁽¹⁹⁾ ise 1994 ve bunun devamı olarak yapılan 1997-1998 çalışmalarında Batı ve Güney Avrupa'daki 35 yoğun bakım ünitesinde toplanan *Klebsiella* izolatlarındaki GSBL oranlarını ülkelere göre sırasıyla; Fransa % 19 ve 32, İngiltere % 0 ve 9, İtalya % 15 ve 38, İspanya % 1 ve 5.5, Türkiye % 59 ve 61, Almanya % 17 ve 23, Belçika % 31 ve 32, Hollanda % 16 ve 8 olarak bulmuştur. Jan ve ark. ⁽²⁰⁾ 1998-1999 yıllarında Asya Pasifik bölgesi ve Güney Afrika'daki 17 ayrı merkezden izole edilen 1377 *E. coli* ve 678 *K. pneumoniae* izolatlarında GSBL oranını sırasıyla % 10.1 ve % 25.2 olarak bulmuştur. İspanya'da Sabate ve ark. ⁽²¹⁾ 1994-96 yılları arasında *E. coli*'de % 0.14, *K. pneumoniae*'de % 0.17 GSBL pozitifliği; Coque ve ark. ⁽²²⁾ ise 1989-2000 yılları arasında yoğun bakım ve cerrahi ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen *K. pneumoniae* izolatlarında %4.8 GSBL pozitifliği saptamıştır. Winokur ve ark. ⁽²³⁾ yaptıkları bir çalışmada, *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında GSBL oranlarını sırasıyla; Latin Amerika % 45.4 ve % 8.5, Batı Pasifik Bölgesi % 24.6 ve % 7.9, Avrupa % 22.6 ve % 5.3, Amerika % 7.6 ve % 3.3, Kanada % 4.9 ve % 4.2 olarak bulmuştur. Kim YK ve ark. ⁽²⁴⁾ yaptıkları bir çalışmada *E. coli* izolatlarında % 17.9 ve *K. pneumoniae* izolatlarında % 52.9 GSBL saptamıştır.

Bu çalışmada GSBL pozitif bulunan orijinal izolatlardan seftazidim duyarlı sefotaksim dirençli sekiz

E. coli, sekiz *K. pneumoniae* izolatlarında enzim ekstraksiyonu ve izoelektrik odaklama çalışması sonucu *E. coli*'lerin biri, *K. pneumoniae*'ların ikisi hariç hepsinde pI 8'in üzerinde enzim bantları saptandı. Bu enzim bantlarının CTX-M türü beta-laktamazlarla uyumlu olduğunu düşünüldü. Sefotaksim dirençli sekiz *E. coli*, sekiz *K. pneumoniae* izolatlarında transkonjugasyonla yedi *E. coli*, altı *K. pneumoniae* olmak üzere 13 izolatın transkonjugantlarında sefotaksim direncinin seftazidim direncinden fazla olduğu saptandı. İsoelektrik odaklama ile 13 transkonjugatın pI 8 civarında enzim bantları görüldü. CTX-M türü beta-laktamazlarla uyumlu olduğu düşünüldü. Tablo 2'de suşların pI değerleriyle direnç paternleri arasındaki ilişki gösterilmektedir, sonuçların CAZ ile uyumlu olduğu, *E. coli* suşunun pI değeriyle CTX direnç paterninin uyumsuz olduğu görülmektedir. pI değeri 8'in üzerinde olan suşların ise CTX paterniyle uyumlu olduğu görülmektedir.

Transkonjugantlardan plazmid izolasyonunda, çoğunda farklı plazmid bantları saptandı. Son yıllarda özellikle sefotaksimi hidrolizleyen plazmidik bir GSBL grubu olarak CTX-M serisi enzimler ilgi odağı olmuştur. CTX-M tipi beta-laktamazlar en sık *Salmonella typhimurium* ve *E. coli*'de saptanmakla birlikte bunlara *Enterobacteriaceae*'nin diğer türlerinde de rastlanır. CTX-M türü enzimler yakın zamanda ülkemizde de gösterilmiştir⁽⁹⁾. Bizim izolatlarımızda da CTX-M türü enzimlerin olabileceği düşünülmektedir. Kesin tanımlama sekans analizleri ile yapılır, ancak bu çalışmada bu analizler yapılmamıştır.

Sonuç olarak, antibiyotiklerin kısıtlı kullanımı, enfeksiyon kontrol önlemlerinin her hastanede uygulanması, dirençle ilgili surveyans çalışmalarının her merkezde devamlı yapılması antibiyotik kullanımı ile direnç ilişkisinin kesin olarak belirlenmesini sağlayacak çalışmaların yürütülmesi, beta laktamazlara bağlı direnci azaltacak önlemler olarak önerilebilir.

TEŞEKKÜR

E. coli J-53-2 suşu Prof. Dr. Haluk Vahaboğlu'nun koleksiyonundan temin edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. **Philippon A, Arlet G, Jacoby GA.** Plasmid detemid AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1-11. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.1.1-11.2002> PMID:11751104 PMCID:126993
2. **Philippon A, Arlet G, Lagrange PH.** Origin and impact of plasmid mediated extended-spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13(Suppl 1):S17-29. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02390681> PMID:6756909
3. **Livermore DM, Yuan M.** Antibiotic resistance and production of extended spectrum beta-lactamases amongs *Klebsiella* spp from intensive care units in Europe. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38:409-24. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/38.3.409> PMID:8889716
4. **Quinn JP.** Clinical significance of extended-spectrum β -lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13:39-42. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02390683> PMID:6756909
5. **Livermore DM.** Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:557-84. PMID:8665470 PMCID:172876
6. **Gniadkowski M.** Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7:597-608. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1198-743x.2001.00330.x> PMID:11737084
7. **Gür D.** Beta Laktamazlar. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002; 33:102-9.
8. **Jacoby GA, Medeiros AA.** More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1991; 35:1697-1704. PMID:1952834 PMCID:245253
9. **Açıkgöz ZC, Gülay Z, Biçmez M, Göçer S, Gamberzade.** CTX-M3 Extended-spectrum beta-lactamase in a *Shigella sonnei* clinical isolate: First report from Turkey. *Scand J Infect Dis* 2003; 35:503-5. <http://dx.doi.org/10.1080/00365540310013270> PMID:14514153
10. **Anonymous.** *Enterobacteriaceae*. In: Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, eds. *Diagnostic Microbiology*. 12th ed. New York: Mosby 2007; 323-34.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Screening and confirmatory tests for ESBLs in *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca* and *Escherichia coli*. M2. Villanova: NCCLS, 2002.
12. **Bradford PA.** Extended-spectrum β -lactamases in the 21 st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:933-51. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001> PMID:11585791 PMCID:89009
13. **Vahaboğlu H.** Beta-laktamaz tanı testlerinin rutin kullanımı ve klinik önemi. *Flora* 1998; 3:73-9.
14. **Ermertcan Ş, Limoncu MH, Taşlı H.** Kan kültürlerinden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz varlığının araştırılması ve tiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bül* 2008; 42:9-15. PMID:18444558
15. **Haque SF, Ali SZ, Tp M, Khan AU.** Prevalence of plasmid mediated bla(TEM-1) and bla(CTX-M-15) type extended spectrum beta-lactamases in patients with sepsis. *Asian Pac J Trop Med* 2012; 5:98-102. [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60003-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60003-0)
16. **Gür D, Ünal S ve Çalışma Grubu.** Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen gram negatif bakterilerin çeşitli antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları. *Flora* 1996; 3:153-9.
17. **Günseren F, Mamikoğlu L, Öztürk S, et al.** A surveillance study of antimicrobial resistance of gram negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *Journal of Antimicrob Chemother* 1999; 43:373-8. PMID:10223593
18. **Eroğlu C, Günaydın M, Birinci A, Esen Ş, Sümbül M, Leblebicioğlu H.** Üriner sistem enfeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların (GSBL) saptanması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2003; 33:118-21.
19. **Livermore DM, Brown DFJ.** Detection of beta-lactamase mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48(suppl

- 1):S9-64.
http://dx.doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.59
PMid:11420337
20. **Jan MB, John DT, Ana CG, Michael AP, Ronald NJ.** Prevalence of extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-1999). *Diagnostic Microbiol Infect Dis* 2002; 42:193-8.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893\(01\)00353-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(01)00353-4)
21. **Sabate M, Miro E, Navarro F, et al.** Beta lactamases involved resistance to broad spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996 in Barcelona (Spain). *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:989-97.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkf057>
PMid:12039891
22. **Coque TM, Oliver A, Perz-Diaz JC, Baquero F, Canton R.** Genes encoding TEM-4, SHV-2 and CTX-M-10 extended spectrum β -lactamases (ESBLs) are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 500-10.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.2.500-510.2002>
PMid:11796363 PMCID:127031
23. **Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N.** Variations in the prevalence of strains expressing an extended spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the America and the Western Pacific Region. *Clinical Infectious Disease* 2001; 32 (Suppl 2):S94-103.
<http://dx.doi.org/10.1086/320182>
PMid:11320450
24. **Kim YK, Pai H, Lee HJ, et al.** Bloodstream infections by extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children : Epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1481-91.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.5.1481-1491.2002>
PMid:11959586 PMCID:127143