

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* kökenlerinde enzim tiplerinin izoelektrik odaklama yöntemi ile belirlenmesi

Determination of the enzyme types in extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca strains by isoelectric focusing

Özlem Eroğlu, Füsun Beğendik Cömert, Canan Külâh, Elif Aktaş

Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak

İletişim / Correspondence: Özlem Eroğlu Adres / Address: Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kozlu/Zonguldak Tel: 0372 261 01 69/2505 Fax: 0372 261 01 55 E-mail: dreroglu@hotmail.com

ÖZET

Bu çalışmada hastanemizde Ocak 2002-Aralık 2004 tarihleri arasında izole edilen GSBL üreten 56 *Klebsiella* suşunda beta-laktamaz tiplerinin izoelektrik odaklama yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. İncelenen bakterilerin çoğunda (%62.5) izoelektrik odaklama yöntemi ile birden fazla enzim varlığı gözlenmiştir. Her iki *Klebsiella* türünden elde edilen enzimler için en sık belirlenen izoelektrik noktalar (pI) 7.6, 7.2, 8.4 olmuştur. Bunu sırasıyla pI 8.6, 8.2, 5.6, 7.0, 7.8, 8.0, 5.4, 8.3, 8.8, 9.0, 5.9 ve 6.8 izlemiştir. Kökenlerde belirlenen izoelektrik noktalara göre öngörülen SHV enzim tipleri, SHV-3 ve benzeri (pI 7.0), SHV-4 ve benzeri (pI 7.8), CTX-M enzim grubundan ise CTX-M-15 (pI 8.6), CTX-M-20 (pI 8.3) ve CTX-M-5 (pI 8.8) olmuştur. Kökenlerimizde TEM grubu enzimleriyle uyumlu olarak pI 5.4, 5.6 ve 5.9 izoelektrik noktaları belirlenmiştir. Değerlendirilen kökenlerde SHV ve CTX-M enzimlerinin daha sık olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: GSBL, *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, izoelektrik odaklama

SUMMARY

The aim of this study was to determine the types of beta-lactamases by isoelectric focusing in the 56 ESBL producing *Klebsiella* strains isolated in our hospital between January 2002-December 2004. The presence of more than one enzyme (62.5%) was observed by isoelectric focusing in the majority of the analysed bacteria. The most commonly designated pI points for the enzymes obtained from both *Klebsiella* species were 7.6, 7.2 and 8.4. Consecutive pI points were 8.6, 8.2, 5.6, 7.0, 7.8, 8.0, 5.4, 8.3, 8.8, 9.0, 5.9 and 6.8 in order of frequency. With regard to the isoelectric points determined in the strains, the anticipated SHV enzyme types were SHV-3, SHV-3-like enzymes (pI 7.0), SHV-4, SHV-4-like enzymes (pI 7.8) and the CTX-M type enzymes were CTX-M-15 (pI 8.6), CTX-M-20 (pI 8.3) and CTX-M-5 (pI 8.8). The isoelectric points 5.4, 5.6 and 5.9 were determined with concordance to the TEM group enzymes. It is concluded that SHV and CTX-M enzymes were the most common enzymes among the bacteria analysed.

Keywords : ESBL, *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, isoelectric focusing

GİRİŞ

Gram negatif bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere karşı direncinde en önemli mekanizma, beta-laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesidir. Beta-laktamazlar içinde en geniş grubu 'Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL)

oluşturmaktadır. Bu enzimler sefamisinler hariç tüm sefalosporinleri, penisilinleri ve aztreonamı inaktive eden enzimlerdir (1). GSBL'lar en sık *Klebsiella* türlerinden izole edilmektedir.

Klebsiella türleri doğada cansız ortamlarda ve insan normal florasında oldukça yaygın olarak bu-

lunmaktadırlar. Sağlıklı kişilerin derisinde, üst solunum yollarında ve kolonda kommensal olarak yer almaktadırlar (2). Hastanelerde yatan hastalarda kolonizasyon oranı hızla artmaktadır (3). Kolonizasyon hastanede kalma süresi, antibiyotik kullanımı, invaziv girişimlerin ve abdominal cerrahinin uygulanması ile ilişkili bulunmuştur (1). İnsanlardan en sık izole edilen türler olan *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca* lobar pnömoni, idrar yolu infeksiyonu, safra kesesi infeksiyonu, cerrahi alan infeksiyonu, bakteriyemi, çeşitli organ apseleri gibi infeksiyonlarda etken olarak bildirilmektedir (3).

GSBL üreten kökenler tüm dünyada ve ülkemizde yaygındır. Merkezlere göre değişmekle birlikte *K. pneumoniae* kökenlerinin %33-74'ünün GSBL ürettiği gösterilmiştir (4). GSBL üreten bakterilerde enzim tipleri yeryüzünün coğrafi bölgelerine, aynı coğrafi bölgelerde ise değişik merkezlere göre farklılıklar göstermektedir. TEM-10 ve TEM-26 ABD'de, TEM-3 Fransa'da, SHV-5 Yunanistan'da sıktır. SHV-2 ise Türkiye dahil tüm dünyada yaygındır (1,5). Bu nedenle enzim tiplerinin belirlenmesi epidemiyolojik önem taşımaktadır. Ülkemizde GSBL oranlarının yüksekliğine rağmen enzim tiplerine yönelik çalışmaların sayısı oldukça azdır.

İzoelektrik odaklama (IEO), proteinlerin bir pH gradientinde izoelektrik noktalarına göre ayrılması prensibine dayanmaktadır. Bu yöntem beta-laktamazların ayrılmasında ilk kez Matthew ve ark. (6) tarafından kullanılmıştır. Bu yöntem ile enzim tiplerinin özgül izoelektrik noktaları belirlenmekte, sonuçlar antibiyotik duyarlılık profilleri ile birlikte yorumlanarak enzimlerin hangi gruba dahil oldukları tahmin edilebilmektedir (7). TEM enzimlerinin izoelektrik noktaları (pI) 5.5-6.5 arasında yer alırken, SHV ve CTX-M enzimleri sırasıyla 7.0-8.6 ve 7.4-9.0 arasında yer almaktadır (1, 8, 9).

Bu çalışmada Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarında, 2002-2004 yılları arasında çeşitli

örneklerden izole edilen ve GSBL üreten 56 *Klebsiella* türünde beta-laktamaz tiplerinin izoelektrik odaklama yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kökenlerin tanımlanması ve özellikleri. Ocak 2002-Aralık 2004 tarihleri arasında izole edilen ve GSBL üreten 56 *Klebsiella spp.* kökeni araştırılmıştır. Kökenler geleneksel yöntemlerle tiplendirilerek, çalışma gününe kadar Skim Milk besiyeri (Oxoid) içinde -70°C'de saklanmıştır (2).

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Kontrol kökeni olarak *Escherichia coli* ATCC 29212 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır. Sefpodosim zonu ≤ 22 mm, seftazidim zonu ≤ 22 mm, aztreonam zonu ≤ 27 mm, sefotaksim zonu ≤ 27 mm, seftriakson zonu ≤ 25 mm olan kökenler GSBL üretimi yönünden süpheli kökenler olarak değerlendirilmiştir (10).

Agar dilüsyon yöntemi. Tüm kökenlerin sefotaksim, sefoperazon, seftriakson ve aztreonam için minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) agar dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Kontrol kökeni olarak *E. coli* ATCC 29212 ve *S. aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır (11).

GSBL doğrulama testleri. GSBL varlığının gösterilebilmesi için enzim aktivitesinin klavulanik asitle inhibisyon özelliğine dayanan üç farklı yöntem kullanılmıştır.

Çift disk sinerji yöntemi. McFarland 0.5 bulanıklığına eşdeğer hazırlanan bakteri süspansiyonu 4 mm kalınlığındaki Mueller Hinton agar yüzeyine ekilmiştir. Amoksisilin-klavulanik asit (30µg) diskinin etrafına merkezden merkeze uzaklık 25 mm olacak şekilde aztreonam (30µg) (Oxoid), seftriakson (30µg) (Oxoid), seftazidim (30µg) (Oxoid), ve sefotaksim (30µg) (Oxoid) diskleri yerleştirilmiştir. Plaklar bir gece 35°C'de inkübe edilmiştir. Antibiyotik disklerine ait inhibisyon zonları

nin amoksisilin-klavulanik asit yönünde genişleme göstermesi veya diskler arasındaki bölgede bir inhibisyon alanının gözlenmesi GSBL pozitif olarak kabul edilmiştir (12).

Kombine disk yöntemi. McFarland 0.5 bulanıklığına eşdeğer hazırlanan bakteri süspansiyonları 4 mm kalınlığındaki Mueller Hinton agar yüzeyine ekilmiştir. Seftazidim (30µg), seftazidim-klavulanik asit (30/10µg) (Oxoid), seftotaksim (30µg) (Oxoid), seftotaksim-klavulanik asit (30/10µg) (Oxoid), sefpodoksim (10µg) (Oxoid), sefpodoksim-klavulanik asit (30/10µg) (Oxoid) diskleri yerleştirilmiştir. Plaklar bir gece 35°C'de inkübe edilmiştir. Seftazidim, seftotaksim ve sefpodoksim inhibisyon zon çaplarının klavulanik asit ile kombine disklerin inhibisyon zon çaplarından ≤5 mm olması GSBL pozitif olarak kabul edilmiştir (13).

Etest yöntemi. Seftazidim-seftazidim/klavulanik asit ve seftotaksim-seftotaksim/klavulanik asit kullanılmıştır. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda kombinasyon MİK değerlerinde üç kat ve üzeri düşüş saptanması GSBL pozitif olarak kabul edilmiştir (14).

Beta-laktamaz enzimlerinin elde edilmesi. Kanlı agara pasajlanarak canlandırılan bakteriler 10 ml trypticase soya brota (Acumedia) pasajlanarak 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri süspansiyonu 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Süpernatantlar döküldükten sonra çökelti üzerine 2 ml PBS (pH:7) tampon eklenerek karıştırılmıştır. Süspansiyon 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek iki kez yıkanmıştır. Çökelti üzerine 2 ml PBS (pH:7) tampon eklenerek resüspand edilmiştir. Süspansiyon 20 saniyelik sürelerle iki, üç kez, 12 µm amplitüde sonike (Soniprep 150, MSE, Sanyo) edilerek bakteriler parçalanmıştır. Sonikasyon işlemi sırasında ve aralarda buz ile soğutma uygulanarak enzimlerin korunması sağlanmıştır. 13.000 rpm'de +4 °C de 15 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatandan 50 µl alınarak üzerine nitro-

fin çözeltisi (500µg/ml) eklenerek 2 dakika içerisinde renk değişimi gözlenmiştir. Sarıdan kırmızıya renk değişimi enzim varlığı olarak değerlendirilmiştir. Renk değişimi gözlenen süpernatantlar toplanarak -20°C'de saklanmıştır (15,16).

Enzimlerinin izoelektrik noktalarının (İEO)

belirlenmesi. İzoelektrik odaklama poliakrilamid jel elektroforezi ile yapılmıştır. Poliakrilamid jel, Mini IEF Cell (Model 111-Bio-Rad, Fransa) düzeneği yardımıyla üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır. Jelin anot tarafına aplikatör strip yerleştirildikten sonra her örnekten 0.5 µl ve IEF standardından (Bio-Rad1610310) 1.2 µl jele yüklenmiştir. Güç kaynağı olarak Bio-Rad Power Pac 1000 (Bio-Rad, Fransa) kullanılmıştır. Jelde aşırı ısınmayı ve kurumayı önlemek için, 15 dk 100V, 15 dk 200V ve 60 dk 450V olacak şekilde ardışık üç farklı voltajda toplam 90 dakika yürütme işlemi uygulanmıştır. Her elektroforez işleminde izoelektrik noktaları (pI) bilinen OXA-10 (pI=6,1), SHV-3 (pI=7,0), CMY-1 (pI=8,0), CMY-2 (pI=9,0) enzimleri kullanılmıştır. Elektroforez sonlandığında enzim bantlarını görünür hale getirebilmek için jel üzerine nitro-sefin çözeltisi (500 µg/ml) ile ıslatılmış kurutma kağıdı konularak nitro-sefinin jel yüzeyine yayılması sağlanmıştır. Kırmızı bantlar şeklinde görülen enzimlerin buldukları noktalar cam üzerine işaretlendikten sonra milimetrik kağıda aktarılmıştır.

BULGULAR

Kökenlerin genel özellikleri. Çalışmaya dahil edilen 56 kökenin 40'ı (%71,4) *K. pneumoniae*, 16'sı (%28,6) *K. oxytoca* olarak tiplendirilmiştir. Kökenlerin 15'i (%26,7) poliklinik hastalarından, 41'i (%73,3) yatan hastalardan izole edilmiştir. Kökenlerden 33'ü idrar, 12'si yara, dördü kan, biri kateter, biri BOS, biri intraabdominal drenaj sıvısı, biri gastrostomi sıvısı, biri balgam, ikisi trakeal aspirat örneklerinden izole edilmiştir.

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* kökenlerinde enzim tiplerinin izo-elektrik odaklama yöntemi ile belirlenmesi

Antibiyotik duyarlılık test sonuçları. İncelenen kökenlerin disk diffüzyon ve agar dilüsyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik duyarlılıkları sırasıyla Tablo 1 ve Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Kökenlerin disk diffüzyon yöntemi ile antibiyotiklere duyarlılık sonuçları, (sayı (%))

Antibiyotik/Tür	<i>K. pneumoniae</i> (40 köken)			<i>K. oxytoca</i> (16 köken)		
	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Sefotaksim	2 (5.0)	2 (5.0)	36 (90.0)	11 (68.7)	1 (6.2)	4 (25.0)
Sefepim	17 (42.5)	12 (30.0)	11 (27.5)	13 (81.5)	2 (12.5)	1 (6.2)
Azteronam	0	0	40 (100)	1 (6.2)	0	15 (93.8)
Sefoksitin	29 (72.5)	2 (5.0)	9 (22.5)	15 (93.7)	0	1 (6.3)
Sefoperazon	0	1 (2.5)	39 (97.5)	15 (93.7)	0	1 (6.3)
Seftazidim	17 (42.5)	3 (7.5)	20 (50.0)	15 (93.7)	1 (6.2)	0
Sefpodoksim	1 (2.5)	3 (7.5)	36 (90.0)	3 (18.7)	0	13 (81.2)
Seftriakson	1 (2.5)	3 (7.5)	36 (90.0)	3 (18.7)	2 (12.5)	11 (68.7)
Tikarsilin	0	0	40 (100)	8 (50.0)	0	8 (50.0)
Tikarsilin/klavulanik asit	1 (2.5)	9 (22.5)	30 (75.0)	8 (50.0)	0	8 (50.0)
Ampisilin/sulbaktam	1 (2.5)	0	39 (97.5)	0	2 (12.5)	14 (87.5)
Amoksisilin/klavulanik asit	5 (12.5)	16 (40.0)	19 (47.5)	7 (43.7)	5 (31.2)	4 (25.0)
Piperasillin	0	0	40 (100)	0	0	16 (100)
Trimetoprim/sulfometaksazol	11 (27.5)	1 (2.5)	28 (70.0)	14 (87.5)	0	12 (75.0)
Gentamisin	20 (50.0)	0	20 (50.0)	13 (81.2)	0	3 (18.7)
Amikasin	31 (77.5)	3 (7.5)	6 (15.0)	16 (100)	0	0
Siprofloksasin	23 (57.5)	0	17 (42.5)	16 (100)	0	0
Nitrofurantoin (idrar izolatları için)	3 (7.5)	3 (7.5)	18 (45.0)	9 (56.2)	1 (6.2)	2 (12.5)

Tablo 2. Kökenlerin seçilmiş antibiyotikler için agar dilüsyon yöntemi ile belirlenen duyarlılık oranları (sayı %)

Antibiyotik/tür	<i>K. pneumoniae</i> (40 köken)			<i>K. oxytoca</i> (16 köken)		
	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Sefoperazon	1 (2.5)	1 (2.5)	38 (95.0)	0	0	16 (100)
Seftriakson	1 (2.5)	3 (7.5)	36 (90.0)	2 (12.5)	2 (12.5)	12 (75.0)
Sefotaksim	2 (5.0)	2 (5.0)	36 (90.0)	14 (87.5)	1 (6.2)	1 (6.2)
Aztreonam	1 (2.5)	0	39 (97.5)	1 (6.2)	0	15 (93.8)

GSBL doğrulama test sonuçları . Çift disk sinerji yöntemi ile negatif bulunan bir köken CAZ ve CTX kombine diskleri ve Etest yöntemleri ile GSBL pozitif olarak tespit edilmiştir. Çift disk sinerji yöntemi ile pozitif saptanan bir köken ise

diğer yöntemlerle GSBL negatif olarak bulunmuştur. GSBL doğrulama testlerinin duyarlılıklarının karşılaştırılması Tablo 3'de sunulmuştur. Kombine diskler ve Etest yöntemlerinde en iyi belirleyicinin sefotaksim/klavulanik olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 3. GSBL doğrulama testlerinin duyarlılıklarının karşılaştırılması

	Çift disk sinerji	Kombine disk			Etest	
		CAZ	CPD	CTX	CT/CTL	TZ/TZL
Pozitif saptanan	55.0	40.0	47.0	52.0	55.0	45.0
Negatif saptanan	1.0	16.0	9.0	4.0	1.0	11.0
%pozitiflik	98.2	71.4	83.9	92.8	98.2	80.3

CAZ: Seftazidim, CPD:Sefpodoksim, CTX:Sefotaksim, CT/CTL:Sefotaksim/Sefotaksim-klavulanat, TZ/TZL:Seftazidim/seftazidim-klavulanat

IEO sonuçları. Kökenlerin 21'inde (%36) tek enzim, 20'sinde (%36) çift enzim, 14'ünde (%25) üç enzim ve birinde dört enzim belirlenmiştir.

Enzimler için belirlenen izoelektrik noktaları (pI) 5.4, 5.6, 5.9, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 8.0, 8.2,8.3, 8.4, 8.6, 8.8, 9.0 olmuştur (Tablo 4).

Tablo 4. Kökenlerde tespit edilen izoelektrik (pI) noktalar

Köken no	Tür	pI
K1	K.pneumoniae	7.2, 8.2, 8.8
K2	K.oxytoca	5.6, 5.9, 7.9
K3	K.pneumoniae	5.6, 7.2, 8.4
K4	K.oxytoca	7.0
K5	K.pneumoniae	8.4
K6	K.pneumoniae	7.2
K7	K.oxytoca	7.6, 8.4
K8	K.oxytoca	7.6, 8.4
K9	K.pneumoniae	7.2, 7.4, 8.8
K10	K.oxytoca	7.2, 7.6, 8.0
K11	K.pneumoniae	7.0, 8.4
K12	K.oxytoca	6.8
K13	K.pneumoniae	7.0, 7.2, 8.3
K14	K.pneumoniae	7.0, 7.2, 8.6
K15	K.pneumoniae	5.4, 7.2, 7.6, 8.0
K17	K.pneumoniae	7.4, 8.2, 8.6
K18	K.oxytoca	5.6
K19	K.pneumoniae	7.6, 8.9
K20	K.pneumoniae	7.6, 8.6
K21	K.oxytoca	5.6
K22	K.pneumoniae	5.9, 7.2, 8.4
K23	K.oxytoca	7.4
K24	K.pneumoniae	7.2, 8.2
K25	K.pneumoniae	7.2, 8.4, 9.0
K26	K.oxytoca	5.2
K28	K.pneumoniae	8.4
K31	K.pneumoniae	7.4
K33	K.pneumoniae	7.4, 8.2

Köken no	Tür	pI
K36	K.pneumoniae	8.6
K37	K.oxytoca	5.9, 8.6
K38	K.pneumoniae	7.0, 8.8
K42	K.pneumoniae	7.2, 9.0
K43	K.pneumoniae	7.4, 8.6
K44	K.pneumoniae	7.2, 8.2, 9.0
K45	K.oxytoca	5.6
K46	K.pneumoniae	7.6, 8.2
K48	K.pneumoniae	7.6, 8.2
K49	K.oxytoca	7.6, 8.4
K50	K.oxytoca	7.8
K51	K.pneumoniae	7.6, 8.3, 8.6
K52	K.pneumoniae	5.4, 7.6, 8.3
K53	K.pneumoniae	5.4, 7.6, 8.3
K54	K.pneumoniae	8.6
K55	K.pneumoniae	7.8
K56	K.pneumoniae	7.4, 8.2
K57	K.pneumoniae	8.2
K58	K.pneumoniae	7.6
K59	K.pneumoniae	8.0
K60	K.pneumoniae	7.6
K61	K.pneumoniae	7.6, 8.4
K62	K.pneumoniae	7.6
K63	K.pneumoniae	7.8, 8.2
K64	K.oxytoca	7.4, 8.4
K65	K.pneumoniae	7.2, 8.4
K66	K.pneumoniae	7.3
K67	K.oxytoca	7.6, 7.8

K. pneumoniae kökenlerinde 12 ve *K. oxytoca* kökenlerinde beş olmak üzere toplam 17 enzimin (%15.9) izoelektrik noktası 7.6 olarak bulunmuştur. En sık tespit edilen diğer iki izoelektrik nokta 7.2 (%14) ve 8.4 (%11.2) tür. İncelenen kökenlerde sık gözlenen bant pI'sı 7.6 olmuştur.

TARTIŞMA

GSBL üreten bakterilerde enzim tipleri yeryüzünün coğrafi bölgelerine, aynı coğrafi bölgelerde ise değişik merkezlere göre farklılıklar göstermektedir (1,5). Bu nedenle enzim tiplerinin belirlenmesi epidemiyolojik önem taşımaktadır. IEO ile enzim tiplerinin özgül izoelektrik noktaları belirlenebilmekte, antibiyotik duyarlılık profilleri de bu sonuçlarla birlikte yorumlanarak enzimlerin hangi gruba dahil oldukları tahmin edilebilmektedir (6). Ancak, günümüzde pek çoğu benzer izoelektrik noktasına sahip 90'dan fazla TEM tipi beta-laktamazın mevcut olduğu ve kökenlerin birden fazla enzim tipi bulundurabilecekleri bilinmektedir. Bu nedenle enzim tiplerinin sadece izoelektrik noktalarına dayanılarak belirlenmesi tam anlamı ile mümkün olmadığından moleküler yöntemler uygulanmaktadır. (17). Bir enzim ailesine ait bir beta-laktamazın varlığının tespiti için en sık kullanılan moleküler yöntem, enzim genine özgü oligonükleotid primerlerle yapılan PZR'dir (17). Ancak PZR ile TEM ve SHV'nin farklı varyantları arasında ayırım yapılamamaktadır. Nükleotid dizi analizi bir suşta mevcut olan özgül beta-laktamaz geninin belirlenmesinde altın standart yöntemdir (18,19). Bunun yanı sıra dizi analizi yapılmadan enzim tespiti ve ayırt edilmesine olanak sağlayacak çeşitli moleküler yöntemler de önerilmiştir (18,19). İzoelektrik odaklama, bir bakteride olası enzim gruplarının tahmini için öncü çalışma niteliği taşımaktadır. Sayısı yüzün üzerinde olan GSBL'ların moleküler genetik yöntemler kullanılarak tiplenesinde özgül oligonükleotid primerlerin dizayn edilebilmesi için olası grup tahmini önemlidir. Günümüzde standart yöntem olan nükleik asit dizi analizi ülkemiz şartlarına göre pahalı ve yoğun emek gerektiren bir yöntemdir.

Ülkemizde GSBL oranlarının yüksekliğine rağmen enzim tiplemesine yönelik çalışmaların sayısı oldukça azdır. Gülay ve ark. (20) nosokomial enfeksiyon etkeni olarak izole ettikleri *K. pneumoniae* kökenlerinde birden dörde kadar değişen sayılarda enzim varlığı gözlemiştir. Bu enzimler için en sık belirlenen pI 7.6 olmuştur. Bunun yanı sıra pI 8.4, 8.2, 5.4, 7.8 olan enzimler belirlenmiştir. Löker (21), 2000 yılında izole edilen *K. pneumoniae* ve *E. coli* kökenlerinin %92'sinde pI'sı 7.6 olan bant belirlemiş, bakterilerin antibiyotik direnç fenotipleri göz önüne alındığında bu enzimin SHV-2 olabileceği düşünülmüştür. Aynı çalışmada %56 oranında ikinci sıklıkla pI'sı 5.4 olan bant bulunmuş, bu bantın TEM-1 enzimine ait olduğu düşünülmüştür.. Durmaz ve ark. (22) *K. pneumoniae*, *Citrobacter* spp., *E. coli* ve *Enterobacter* spp. kökenlerinde sırasıyla pI'ları 7.0, 7.6, 7.8, 8.2 olarak belirlemiş, bunların da sırasıyla SHV-3 benzeri, SHV-2/6 benzeri, SHV-4 benzeri, SHV-5 benzeri enzimlere ait olduğunu bildirmiştir. SHV-2 ve SHV-6 türevi olan GSBL'lar bu çalışmada en sık rastlanan enzim grubu olarak bulunmuştur. Akata ve ark. (23), 21'i *K. pneumoniae* olan 23 kökenin çoğunda pI'sı 7.6 olan enzim belirlemişlerdir. Limoncu ve ark. (24), GSBL üreten 12 *K. pneumoniae* kökeninin 11'inde pI 7.6 olan enzim belirlemişler, bunların 5'inde antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre SHV-2 bulunduğu sonucuna varmışlardır. Taşlı ve ark. (25,26), GSBL üreten toplam 63 *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* ve *E. cloacae* kökeninde SHV-5 ve SHV-12 bulunduğunu bildirmişlerdir. Gülay ve ark. (27) 23 *K. pneumoniae* kökeninin dahil olduğu çok merkezli bir çalışmada *K. pneumoniae* kökenlerinde CTX-M prevalansını %82.6 arasında bulmuşlar, ülkemizde *Enterobacteriaceae* ailesine ait mikroorganizmalarda CTX-M enzimlerinin yaygın olduğunun bildirmişlerdir. Nükleotid dizi analizi sonucuna göre bunu CTX-M-3 olarak belirlemişlerdir.

Bizim çalışmamızda incelenen bakterilerin çoğunda birden fazla enzim varlığı gözlenmiştir. Her iki *Klebsiella* türünden elde edilen enzimler için

en sık belirlenen pI, 7.6 (17/56), 7.2 (15/56) ve 8.4 (12/56) olmuştur. Bunu sırasıyla 8.6, 8.2, 5.6, 7.0, 7.8, 8.0, 5.4, 8.3, 8.8, 9.0, 5.9 ve 6.8 izlemiştir. *K. pneumoniae* kökenlerinde belirlenen pI 8.0, 8.3, 8.8 ve 9.0 *K. oxytoca* kökenlerinde gözlenmemiştir. Kökenlerimizde belirlenen enzim izoelektrik noktaları yorumlandığında literatür ile uyumlu olarak SHV ve CTX-M enzimleri daha sık olarak bulunmuştur.

SHV enzimleri için tanımlanan pI'lar gözden geçirildiğinde incelenen kökenlerin tamamında en sık belirlenen pI 7.6'nın SHV-2'ye ait olduğu gözlenmiştir. *K. pneumoniae* kökenlerinde en sık belirlenen pI 7.2 olmuştur. pI 7.2 için SHV-29 yakın zamanda tanımlanmış bir enzimdir (28). Ancak ülkemizden daha önce pI 7.2 bildirilmemiştir. Bu kökenlerin tekrarlayan IEO'larında belirlenen pI'lar 7.0 ve 7.4 arasında değişmiştir. Poliakrilamid jelde enzimlerin göç etmesi için gerekli olan sürenin beklenenden daha fazla olabilmesi izoelektrik odaklama yönteminde sorun oluşturabilmektedir. Bazı durumlarda uygun pI noktasına erişmek pratikte mümkün olamamaktadır. Enzimlerin moleküler ağırlıkları ve iyonizasyon düzeyleri bunda rol oynayan en önemli etkenlerdir. Oluşturulan pH gradyentinde enzim göçünün kompleks kinetikleri sigmoid bantların oluşmasına ve net bir izoelektrik nokta belirlenemesine yol açabilmektedir (29). Belirtilen kökenler için IEO ile enzim grubu belirlenememiştir.

CTX-M enzimleri için tanımlanan pI'lar gözden geçirildiğinde, bu çalışmada kökenlerin 12'sinde pI 8.4 belirlenmiş olması, buna uygun olan CTX-M-3,4,6,7 ve 21'in araştırılması gerektiğini göstermiştir. Bundan sonra en sık gözlenen pI 8.6; CTX-M-15'e, pI 8.3; CTX-M-20'ye aittir (30). CTX-M enzimleri ile uyumlu pI gözlenen kökenlerin iki tanesi disk diffüzyon ve agar dilüsyon yöntemleri ile sefotaksime duyarlı bulunmuştur. Bunun sonucunda CTX-M enzimi içeren bakteriler için sefotaksim disk diffüzyon ve MİK değerlerinin tarama testlerinde yanıltıcı olabileceği düşünülmüştür. Kökenlerin altısında görülen pI

8.2 hem SHV hem de CTX-M enzimlerinde görülmektedir. Bu kökenlerin PZR yöntemi ile doğrulanması gerekmektedir. pI 8.8; CTX-M-5 ve pI 9.0; CTX-M-15 için tanımlanmıştır. Buna göre izolatlarımızda belirlenebilen CTX-M enzimleri, CTX-M-15, CTX-M-20, CTX-M-5 olmuştur. pI 8.4'in CTX-M-3,4,6,7 ve 21 enzimlerinden hangisine ait olduğunun belirlenmesi için uygun oligonükleotid primerlerle PZR yöntemi ile ileri araştırma yapılması uygun görülmüştür.

Kökenlerin 12'sinde TEM enzimleri ile uyumlu pI'lar gözlenmiştir. Bu noktalar için tanımlanan enzimler Tablo 5'de belirtilmiştir. Bunlardaki TEM enzim tiplerinin ileri çalışmalarla araştırılması gerekmektedir. Ülkemizde *Klebsiella* kökenlerinde TEM enzimlerine yönelik bildirilen pI 5.4 olmuştur (20).

Tablo 5. Kökenlerde belirlenen pI noktalarına göre tanımlanan TEM enzimleri (17)

pI	Tanımlanan Enzimler
5.4	TEM-7, TEM-19, TEM-20, TEM-29, TEM-112, TEM-126
5.6	TEM-5, TEM-10, TEM-11, TEM-13, TEM-26, TEM-112, TEM-126
5.9	TEM-4, TEM-6, TEM-8, TEM-27, TEM-69, TEM-72, TEM-114

K. oxytoca kökenlerinin birinde pI 6.8 olan bant gözlenmiştir. Bu nokta için plazmid aktarımlı AmpC tanımlanmıştır (12). Plazmidik AmpC'nin en önemli göstergesi sefoksitin direnci olmasına rağmen, bu kökende sefoksitin direnci gözlenememiştir.

Bu çalışmada incelenen kökenlerin biri dışında hepsinde (%98.2) çift disk sinerji yöntemi ile GSBL varlığı doğrulanmıştır. Kökenlerin %92.8'inde sefotaksim ve sefotaksim/klavulanik asit diskleri ile kombine disk yönteminde GSBL varlığı gösterilmiştir. Sefotaksim/sefotaksim-klavulanik asit içeren Etest kullanıldığında ise bir köken dışında (%98.2) GSBL varlığı doğrulanmıştır. Bu köken seftazidim/seftazidim-klavulanik asit ile de doğrulanamamıştır. Bu sonuçlara göre çift disk sinerji yöntemi ve Etest, GSBL doğrulamasında en yüksek performans gösteren testler olmuştur. Kombine disk ve Etest için en etkili belirleyici an-

tibiyotiğin sefotaksim olduğu gözlenmiştir.

İncelenen kökenlerin 10'unda sefoksitin direnci gözlenirken, iki köken sefoksitine orta duyarlı bulunmuştur. Bu kökenlerin hepsinde amoksisilin/klavulanik asit duyarlılığı azalmıştır. Sefoksitin direnci *Klebsiella* türlerinde porin direnci veya plazmid yoluyla AmpC kazanımı ile gerçekleşmektedir (1). Bunun dışında mevcut GSBL'in fazla miktarda üretimine bağlı olarak in vitro duyarlılık testlerinde sefoksitin direnci gözlenebilmektedir (31). Plazmidik AmpC kazanımında klavulanik asit direnci nedeniyle inhibisyon temelli doğrulama testlerinde indikatör antibiyotiklerle, sefepim haricinde, sonuç alınamamaktadır (32). Bu suşların içinde sadece birinde GSBL üretimi çift disk sinerji yöntemi ile doğrulanamamıştır. Bu suşlardaki sefoksitin ve amoksisilin/klavulanik asit direncinin enzimin fazla miktarda üretimine bağlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

İncelenen kökenlerin hiçbirinde karbapenem direnci gözlenmemiştir. Literatür ile uyumlu olarak en yüksek direnç oranları aztreonam ve sefoperazona, ardından birbirine yakın düzeylerde seftriakson ve sefotaksime karşı belirlenmiştir.

Çift disk sinerji yöntemi ve Etest, GSBL doğrulamasında en yüksek performans gösteren testler olmuştur. Kombine disk ve Etest için en etkili belirleyici antibiyotiğin sefotaksim olduğu gözlenmiştir. İncelenen bakterilerin çoğunda (%62.5) birden fazla enzim varlığı gözlenmiştir. Her iki *Klebsiella* türünden elde edilen enzimler için en sık belirlenen pI noktaları 7.6, 7.2, 8.4 olmuştur. Buna göre incelenen kökenlerde SHV ve CTX-M enzimlerinin daha sık bulunduğu gözlenmiştir. Belirlenebilen SHV enzimleri (pI 7.0) SHV-3 ve benzeri, (pI 7.8) SHV-4 ve benzeri enzimleri olmuştur. pI 7.2 için enzim belirlenmesi yapılamamıştır. Belirlenebilen CTX-M enzimleri, CTX-M-15, CTX-M-20, CTX-M-5 olmuştur. pI 8.4'ün CTX-M-3,4,6,7 ve 21 enzimlerinden hangisine ait olduğunun belirlenmesi için uygun oligonükleotid primerler kullanılarak PZR yöntemi ile ileri araştırma yapılması gerekli görülmüştür.

Bu çalışma Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından (Proje No:2002-00-20) desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol. Rev. 1995; 8: 557.
2. Gray DL. Enterobacteriaceae Introduction and Identification 'Murray PR(ed): Manual of Clinical Microbiology' p450 ASM Pres, Washington DC (1995).
3. Podschun R, Ullmann U: *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998; 11; 4: 589.
4. Gülay Z: Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta-laktamlara ve karbapenemlere direnç. Has İnfeks Derg 2001; 5: 210.
5. Gür D, Pitt TL, Hall LMC, Akalın HE, Livermore DM: Diversity of *Klebsiella* with extended-spectrum beta-lactamases at a Turkish university hospital. J Hosp Infect 1992; 22: 163.
6. Matthew M, Harris MA, Marshall J, Ross GW: The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. J Gen Microbiol 1975; 88: 169.
7. Heritage J, M'Zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM: Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in Gram negative bacteria. J Antimicrob. Chemother 1999; 44: 309.
8. Bonnet R: Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTZ-M enzymes. Antimic Agents and Chemother 2004; 48: 1.
9. <http://www.lahey.org/Studies/>
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 6th ed. Approved standard M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that growth aerobically; Approved Standard 6th ed. NCCLD document M7-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
12. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A: Extended-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae; hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Inf Dis 1988; 10: 867.
13. Carter MW, Oakton KJ, Warner M, Livermore D: Detection of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiellae* with the Oxoid combination disk method. J Clin Microb 2000; 38; 11: 4228.
14. Cormican MG, Marshall SA, Jones RN: Detection of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing strains by

- the Etest ESBL screen. *J Clin Microb* 1996; 34: 1880.
15. Legrand P, Fournier G, Bure A, Jarlier V, Nicolas MD, Decre D, Durval J and Philippon A: Detection of extended broad-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae in four French hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; 8: 527.
 16. Xiong Z, Demei Z, Wang F, Zhang Y, Okamoto R, Inoue MA: Klebsiella pneumoniae producing three kinds of class A beta-lactamases encoded by one single plasmid isolated from a patient in Huashan Hospital, Shanghai China. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23: 262.
 17. Bradford PA: Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933.
 18. Nüesch-Inderbinen MT, Hachler H, Kayser FH: Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method and comparison with the Etest. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 398.
 19. Chanawong A, M'Zali HM, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM: Characterisation of extended spectrum beta-lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *FEMS Microbiol Lett* 2000; 184: 85.
 20. Gulay Z, Thomson CJ, Yulug N, Amyes SG: High prevalence of extended spectrum beta-lactamase production among Klebsiella pneumoniae strains isolated at a University Hospital in Turkey. *J Chemother* 2000; 12: 145.
 21. Löker KE: Hastane infeksiyonlarından izole edilen Escherichia coli ve Klebsiella suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığının saptanması ve izoelektrik fokuslama yöntemi ile tiplendirilmesi. Uzmanlık Tezi, GATA, Ankara, 2000.
 22. Durmaz R, Durmaz B, Koroglu M, Tekerekoglu MS: Detection and typing of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of the family Enterobacteriaceae in a medical center in Turkey. *Microb Drug Resist* 2001; 7: 171.
 23. Akata F, Tatman-Otkun M, Ozkan E, Tansel O, Otkun M, Tugrul M: Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases produced by nosocomial isolates of Enterobacteriaceae in Trakya University Hospital, Turkey. *New Microbiol* 2003; 26: 257.
 24. Limoncu Hoşgör M, Ermertcen Ş, Çavuşoğlu C, Eraç B: Determination of extended-spectrum beta-lactamase frequency of Klebsiella pneumoniae strains isolated from urinary tract infections and typing with isoelectric focusing method [özet p-398]. *Microbiologica Balkanica 2003 3rd Balkan Conference of Microbiology Proceedings and Abstract Book*, 2003; s.. 556.
 25. Taşlı H, Bahar İH: Emergence of SHV-1 extended-spectrum beta-lactamase in Turkey [özet p-342]. *Microbiologica Balkanica 2003 3rd Balkan Conference of Microbiology Proceedings and Abstract Book*, 2003: 512.
 26. Taşlı H, Bahar İH: The first molecular characterisation of SHV-12 extended-spectrum beta-lactamase in Turkey [özet p-343]. *Microbiologica Balkanica 2003 3rd Balkan Conference of Microbiology Proceedings and Abstract Book*, 2003: 513.
 27. Gülay Z, Terek G, Eraç B, Bal Ç, Gür D, Köksal I, Özakın C, Özinel M, Sümerkan B: High prevalence of CTX-M type extended spectrum beta-lactamases in members of Enterobacteriaceae in Turkey [özet p-752]. *14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Kongre Kitabı*, 2004: 187.
 28. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC: Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of Klebsiella pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1151.
 29. Barthelemy M, Guionie M, Labia R, Beta-lactamases: Determination of their isoelectric points. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 13; 4: 695.
 30. Bonnet R: Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: The CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; 48; 1: 1.
 31. Bal Ç: Beta-laktamaz testleri ve rutininde kullanımları. 'Gür D (ed) Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı' 1998: 101.
 32. Thomson KS: Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *Emerging Infect Dis* 2001: 333.