

# ESCHERICHIA COLI SUŞLARINDA AMOKSİSİLİN/ KLAVULANİK ASİT DİRENCİ VE BUNUNLA İLİŞKİLİ BETA-LAKTAMAZ VE PLAZMİD PROFİLLERİ

Zeynep GÜLAY<sup>1</sup>, Meral BİÇMEN<sup>1</sup>, Sebastian G.B. AMYES<sup>2</sup>, Nuran YULUĞ<sup>1</sup>,

## ÖZET

Çeşitli klinik örneklerden soyutulan ve ampisiline dirençli bulunan 100 ardışık *Escherichia coli* suşunun amoksisilin/klavulanik asit (AMC) duyarlılığı araştırılmıştır. NCCLS kriterlerine göre hem disk difüzyon, hem de agar dilüsyon yöntemi ile aminopenisilinler ile klavulanat kombinasyonuna “dirençli” veya “orta” olarak değerlendirilen 19 suş beta-laktamaz üretimi ve direnç transferi açısından ileri incelemeye alınmıştır. Bu suşların ampisilin ve ampisilin/klavulanat (2 mg/L) için MİK<sub>50</sub> değerleri sırasıyla > 1024 (dağılım 256 - > 1024) ve 256 (dağılım 64-1024) mg/L olarak bulunmuştur. İzoelektrik odaklama yöntemi ile beta-laktamaz aktiviteleri değerlendirildiğinde klavulanik aside dirençli izolatların 1-3 beta-laktamaz ürettiği saptanmıştır. Beta-laktamazlar arasında en sık izoelektrik noktası (pI) 5.4 olan enzimlerin (% 84) görüldüğü, bunu pI ≥ 8.3 olan enzimlerin (% 31.5) izlediği belirlenmiştir. Onbir izolatın ampisilin ve klavulanata direnç özelliklerini alıcı *E. coli* K12 suşuna aktardığı, bunun yanı sıra tetrasiklin, trimetoprim, streptomisin, kloramfenikol direnci gibi ek özelliklerin de aynı plazmidlerce taşındığı gözlenmiştir. Sonuçlarımız, *E.coli* suşlarındaki aktarılabılır klavulanat direncinin bu mikroorganizmanın neden olduğu infeksiyonların sağaltımında sorun oluşturabileceğini düşündürmüştür.

## SUMMARY

*Beta-lactamase patterns and plasmid profiles of amoxicillin/clavulanate resistant Escherichia coli isolates.*

Amoxicillin/clavulanic acid (AMC) susceptibilities of 100 ampicillin resistant *E.coli* strains isolated from various clinical specimens, were investigated. Nineteen isolates that had been categorized as “intermediate” or “resistant” to aminopenicillin/clavulanate combinations by NCCLS disk diffusion and agar dilution tests were further examined for beta-lactamase production and transfer of resistance. Ampicillin and ampicillin plus clavulanate (2 mg/L) MIC<sub>50</sub> values of these isolates were > 1024 (range 256 - > 1024) and (range 64 - 1024) mg/L, respectively. Beta-lactamase activity were investigated by analytical isoelectric focusing and it was seen that each strain produced 1-3 beta-lactamases. Beta-lactamases with an isoelectric point (pI) of 5.4 was the most frequent (84%) among the beta-lactamases. This was followed by pI ≥ 8.3 enzymes (31.5%). Eleven isolates were able to transfer their ampicillin and clavulanic acid resistance to the recipient *E.coli* K 12 strain and this was associated with other resistance properties such as tetracycline, trimethoprim, streptomycin and chloramphenicol. Our results suggests that transferable clavulanate in *E.coli* may limit the success of therapy in infections caused by this microorganism.

1- Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

2- Edinburg Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Direnç Laboratuvarı, Edinburg, İskoçya.

## GİRİŞ

*Escherichia coli*, hastane ve toplum kökenli üriner sistem infeksiyonları başta olmak üzere yol açtığı değişik hastalık tabloları ile insan sağlığı üzerindeki önemini korumaktadır (6,30). *E.coli* infeksiyonlarının tedavisi, infeksiyon bölgesine göre değişmekle birlikte genellikle empiriktir ve bu amaçla sık olarak beta-laktam ajanlar kullanılmaktadır (3,26). Ancak bu yaygın ve sık kullanım beraberinde direnç sorununu da getirmiştir. *E.coli* suşlarında beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişimine neden olan temel mekanizma TEM tipi beta-laktamazların üretimidir (4,16,28). Gerek TEM-1, gerekse oksiminino sefalosporinleri parçalayabilen genişlemiş spektrumlu türevleri, klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile inaktive olmaktadır (2). Bu nedenle, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları bu tür ile gelişen infeksiyonların tedavisinde önde gelen seçenekler arasında yer almaktadır (22,30). *E.coli* suşlarında amoksisilin/klavulanik asit (AMC) kombinasyonuna direnç ilk kez 1987 yılında tanımlanmıştır (17). Bu direnç çeşitli mekanizmalarla gelişebilmektedir. Bu mekanizmalar arasında en yenisi TEM-1 kökenli, ancak klavulanik asit ve diğer inhibitörlere dirençli beta-laktamazların (IRT) üretimidir (11,31,32).

Ülkemizde *E.coli* suşlarının başta AMC olmak üzere çeşitli beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonlarına duyarlılığını inceleyen çok sayıda çalışma yapılmış olmasına karşın, genellikle bu çalışmalarda dirençten sorumlu mekanizmalar yer almamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda klinik örneklerden soyutulmuş ve ampisiline dirençli *E.coli* suşlarında klavulanat direnci ve bu dirençten sorumlu beta-laktamazlar araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

**İzolatlar:** Çalışmaya 1996-1997 yılları arasında, 90'ı idrar, altısı kan, dördü cerrahi yara olmak üzere çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve ampisiline dirençli olan 100 ardışık *E.coli* suşu alınmıştır. İzolatlar, koloni yapısı ve biyokimyasal özelliklerine göre tanımlanmıştır.

**Antibiyotik duyarlılık testleri:** İzolatların ve transkonjugantların ampisilin ve ampisilin/klavulanik asit (2 mg/L) duyarlılığı agar dilüsyon yöntemiyle, amoksisilin/klavulanik asit (AMC), sefazolin (CZ), sefoksitin (FOX), seftazidim (CAZ), sefotaksim (CTX), imipenem (IMP), streptomisin (Sm), gentamisin (G), amikasin (Ak), siprofloksasin (CIP), nalidiksik asit (NAL), tetrasiklin (Tc), trimetoprim-sulfametoksazol (SXT), trimetoprim (Tp), tikarsilin (TIC), kloramfenikol (C) duyarlılığı ise disk difüzyon yöntemiyle çalışılmıştır. Duyarlılık testlerinde NCCLS önerilerine uyulmuştur (20,21). *E.coli* ATCC 25922 ve 35218 ile *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşları kalite kontrol amacıyla çalışmalara alınmıştır.

**Beta-laktamaz çalışmaları:** Bakterilerin genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz yapımı çift disk sinerji (ÇDS) yöntemi ve diskler arası uzaklığın 20 milimetreye indirildiği modifiye bir yöntem ile incelenmiştir (10,13).

İzolatların içerdikleri beta-laktamazların saptanması amacıyla izoelektrik odaklama yöntemi (isoelectric focusing; IEF) kullanılmıştır (18). Bu amaçla bakterilerin jeloz besiyeri yüzeyindeki kolonileri 1 ml 50 mM fosfat tamponu ile yıkanarak toplandıktan sonra, bakteriler sonikatörde (Soniprep 150) buz üzerinde, 15 saniyelik iki siklüs olacak şekilde tutularak parçalanmış, sonikat 4°C'de, 10,000 rpm'de 10 dk santrifüje edilerek beta-laktamazları içeren üst sıvı toplanmıştır (19). Sonik ekstre, amfolenli (pH 3.5 - 10.0, Sigma Chem. Comp.) poliakrilamid jellerde (güç 1 watt, voltaj 500 v, akım 20 mAmpere olacak

şekilde) yürütüldükten sonra, enzim bantları nitrosefin çözeltisi (500 µg/ml) emdirilmiş filtre kâğıtları yardımıyla görünür hale getirilmiştir. İzoelektrik noktalar (pI) referans proteinler (pI Calibration Kit®, BDH) ile karşılaştırılarak saptanmıştır.

İzoelektrik noktası (pI) 5.4 olan enzimlerin tek başına üretildiği hallerde bakteri sonikatındaki spesifik beta-laktamaz aktivitesi ve klavulanik asitin inhibitör etkinliği nitrosefin hidrolizinin 384 nm'de değerlendirildiği spektrofotometrik bir yöntem ile ölçülmüştür (29). Spesifik enzim aktivitesinin ölçümü için sonikatin içerdiği total protein konsantrasyonu belirlenmiştir (36). Klavulanik asidin inhibitör etkinliğinin belirlenmesi amacıyla, sonikatlar 0.5 - 10 µg/ml arasında değişen düzeylerde klavulanik asit ile inkübe edildikten sonra, nitrosefin hidrolizi değerlendirilerek, enzim aktivitesini % 50 oranında inhibe eden konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) saptanmıştır (25,29). Spesifik enzim aktivitesinin > 150 nmol/dk/mg protein olması TEM-1 enziminin aşırı üretimi olarak değerlendirilmiştir.

**Transfer deneyleri:** İzolatların ampisilin ve klavulanik aside direnç özelliklerini alıcı *E.coli* K-12 suşu J62-2 (Rif<sup>R</sup>)'ye aktarım oranları sıvı faz konjugasyon deneyleri ile incelenmiştir. Bu deneylerde alıcı ve verici suşlar karıştırılıp buyyon besiyerinde (Oxoid Ltd) bir gece inkübe edildikten sonra, aktarımın olduğu transkonjugantlar ampisilin (10 mg/L) ve rifampisin (100 mg/L) içeren Isosensitest besiyerleri yardımıyla seçilmiştir (29).

**Plazmid analizi:** Transkonjugantların içerdiği plazmid DNA'sının eldesinde Kado ve Liu (14)'nun önerdiği yöntem kullanılmıştır. Plazmidlerin sayısı ve büyüklükleri agaroz jel elektroforez yöntemiyle belirlenmiştir.

## BULGULAR

**İzolatların çeşitli antibiyotiklere duyarlılığı:** Ampisiline dirençli *E.coli* suşlarının diğer antibiyotiklere direnç ve duyarlılık oranları tablo 1'de gösterilmiştir. İzolatların tümünün imipeneme duyarlı olduğu, ayrıca aminoglikozidler ve oksiminosefalosporinlerin etkinliğinin yüksek olduğu (% 92-98 duyarlılık) gözlenmiştir. Buna karşın, SXT ve kinolon türevi antibiyotiklere direnç oranlarının % 70 ve % 18-23 olduğu saptanmıştır.

AMC duyarlılığı değerlendirildiğinde, suşların % 41'i bu kombinasyona "ortada" veya dirençli bulunmuştur. Bu suşların ampisilin MİK değerleri klavulanik asit eklenmesinden önce ve sonra değerlendirilmiş, klavulanat eklenmesine rağmen MİK değeri ≥ 64 mg/L olan 19 suş ileri incelemelere alınmıştır.

Klavulanata dirençli (Klav<sup>R</sup>) suşların diğer antibiyotiklere duyarlılık oranları tablo 2'de, beta-laktam ajanlarla elde edilen rezistotipleri ise tablo 3'de gösterilmiştir. Bu suşların tümünün tikarsilin ve sefazoline, birinin (% 5.4) sefoksitine ve altısının (% 31.5) oksiminosefalosporinlerden en az birine "orta" veya dirençli olduğu saptanmıştır. Klav<sup>R</sup> izolatların ampisilin ve ampisilin/klavulanat için MİK<sub>50</sub> değerleri sırası ile > 1024 ve 256 mg/L bulunmuştur (Tablo 3).

**Klavulanata dirençli izolatların beta-laktamazları:** İzoelektrik odaklama yöntemiyle beta-laktamaz paternleri değerlendirildiğinde, Klav<sup>R</sup> izolatların 1-3 beta-laktamaz ürettiği gözlenmiştir (Tablo 3). Beta-laktamazlar arasında en sık (% 84) pI 5.4 olan enzimlerin görüldüğü, bunu pI ≥ 8.3 (8.3, 8.5 ve 9.0) olan enzimlerin izlediği belirlenmiştir.

Oksiminosefalosporinlere dirençli izolatların dördünde ÇDS pozitif bulunmuş, bunların üçünün pI 5.4'de odaklanan enzim(ler), birinin ise pI 7.0 olan bir enzim içerdiği saptanmıştır.

Klav<sup>R</sup> izolatların direnç fenotipleri, IEF paternleri, spesifik enzim aktiviteleri ve klavulanat direncinden sorumlu olası mekanizmalar tablo 3'de yer almaktadır. Buna göre suşların dördünde (% 21) TEM-1 enziminin aşırı üretimi olası mekanizma olarak karşımıza

çıkılmaktadır. Klavulanik asit inhibitör konsantrasyonu ( $IK_{50}$ ) > 10  $\mu$ M olarak saptanan bir suşun inhibitöre dirençli bir TEM mutanlığı (IRT) olabileceği düşünülmüştür.

**Plazmid analizi:** On bir izolatın (% 53) ampisilin ve klavulanata direnç özelliklerini 4-100 kb büyüklüğünde plazmidlerle alıcı *E.coli* suşuna aktardığı ve aynı plazmidler üzerinde ek direnç özelliklerinin taşındığı belirlenmiştir (Tablo 4). Buna karşın, oksiminosefalosporinlere direnç özelliğinin aktarımı gösterilememiştir.

Tablo 1. Çeşitli antibakteriyel ajanların ampisiline dirençli *E.coli* izolatları üzerindeki etkinliği.

Antibiyotik	Sayı (%)*		
	R	I	S
Amoksisilin/klavulanik asit (AMC)	20	21	59
Sefazolin (CZ)	29	34	37
Sefoksitin (FOX)	1	2	97
Seftazidim (CAZ)	7	1	92
Sefotaksim (CTX)	1	7	92
İmipenem (IMP)	0	0	100
Streptomisin (Sm)	80	9	11
Gentamisin (Gm)	4	1	95
Amikasin (Ak)	0	4	96
Siprofloksasin (CIP)	16	2	82
Nalidiksik asit (NAL)	22	1	77
Tetrasiklin (Tc)	73	14	13
Trimetoprim-sulfametoksazol (SXT)	58	12	30
Trimetoprim (Tp)	100	0	0

\*: Sayı =%, R: Dirençli, I: Orta, S: Duyarlı.

Tablo 2. AMC<sup>IR</sup> *E.coli* izolatlarının çeşitli antibakteriyellere duyarlılığı.

Antibiyotik*	Duyarlılık yüzdesi
CZ	0
FOX	85
CAZ	68.5
CTX	68.5
IMP	100
TIC	0
NAL	63
CIP	68.5
Tc	10
Sm	5
Tp	0

\* Kısaltmalar metin içinde belirtilmiştir.

Tablo 3. Klavulanata dirençli E.coli suşlarının direnç ve beta-laktamaz özellikleri.

Suş no	MİK (mg/L)		β-laktamaz			Rezistoup	β-laktamaz ve olası direnç mekanizması
	Amp	Amp/klav	pl	Sp. aktivite	IC <sub>50</sub>		
1	> 1024	64	5.4, > 8.3	-	-	(-)	AMP <sup>R</sup> , TIC <sup>R</sup> , CZ <sup>R</sup> , FOX <sup>1</sup> , CAZ <sup>R</sup> , CTX <sup>1</sup> , TEM-1 ve Amp C enzim aşırı üretimi
2	> 1024	64	7.4, 9.0	-	-	(-)	IPSS, AMC <sup>R</sup> , Tc <sup>S</sup> , Sm <sup>S</sup> , CIP <sup>R</sup> , NAL <sup>R</sup> , Tp <sup>R</sup> AMP <sup>R</sup> , TIC <sup>R</sup> , CZ <sup>1</sup> , FOX <sup>S</sup> , CAZ <sup>S</sup> , CTX <sup>S</sup> , OXA-1 ve kromozomal enzim üretimi
3	> 1024	128	5.4	427.3	≤ 0.5	(-)	IMP <sup>S</sup> , AMC <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , CIP <sup>S</sup> , NAL <sup>S</sup> , Tp <sup>R</sup> AMP <sup>R</sup> , TIC <sup>R</sup> , CZ <sup>1</sup> , FOX <sup>S</sup> , CAZ <sup>S</sup> , CTX <sup>S</sup> , TEM-1 aşırı üretimi
4	> 1024	64	5.4, 7.4	-	-	(-)	IMP <sup>S</sup> , AMC <sup>1</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> , NAL <sup>R</sup> , Tp <sup>R</sup> AMP <sup>R</sup> , TIC <sup>R</sup> , CZ <sup>1</sup> , FOX <sup>S</sup> , CAZ <sup>S</sup> , CTX <sup>S</sup> , TEM-1 ve OXA-1
5	> 1024	256	5.4	207.0	≤ 0.5	(+)	IMP <sup>S</sup> , AMC <sup>R</sup> , Tc <sup>S</sup> , Sm <sup>R</sup> , CIP <sup>S</sup> , NAL <sup>S</sup> , Tp <sup>R</sup> AMP <sup>R</sup> , TIC <sup>R</sup> , CZ <sup>R</sup> , FOX <sup>S</sup> , CAZ <sup>R</sup> , CTX <sup>1</sup> , TEM-tipi GSBL aşırı üretimi
6	> 1024	256	5.4	1124.0	≤ 0.5	(-)	AMP <sup>R</sup> , TIC <sup>R</sup> , CZ <sup>R</sup> , FOX <sup>S</sup> , CAZ <sup>S</sup> , CTX <sup>S</sup> , TEM-1 aşırı üretimi
7	> 1024	1024	7.0 (silik) 8.5	-	-	(+)	AMP <sup>R</sup> , TIC <sup>R</sup> , CZ <sup>R</sup> , FOX <sup>R</sup> , CAZ <sup>R</sup> , CTX <sup>R</sup> , Amp C enzim aşırı üretimi ve SHV grubu GSBL (SHV-3)
8	> 1024	256	5.4, 8.2	-	-	(+)	AMP <sup>R</sup> , TIC <sup>R</sup> , CZ <sup>R</sup> , FOX <sup>S</sup> , CAZ <sup>R</sup> , CTX <sup>1</sup> , TEM-tipi GSBL ve kromozomal enzim
9	> 1024	128	5.4, 8.5	-	-	(+)	AMP <sup>R</sup> , TIC <sup>R</sup> , CZ <sup>R</sup> , FOX <sup>1</sup> , CAZ <sup>R</sup> , CTX <sup>R</sup> , TEM-tipi GSBL ve kromozomal enzim
10	> 1024	256	5.4	65.7	> 10	(-)	AMP <sup>R</sup> , TIC <sup>R</sup> , CZ <sup>R</sup> , FOX <sup>S</sup> , CAZ <sup>S</sup> , CTX <sup>S</sup> , IRT üretimi
11	> 1024	512	5.4, 8.5	-	-	(-)	IMP <sup>S</sup> , AMC <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , CIP <sup>S</sup> , NAL <sup>S</sup> , Tp <sup>R</sup> AMP <sup>R</sup> , TIC <sup>R</sup> , CZ <sup>R</sup> , FOX <sup>S</sup> , CAZ <sup>S</sup> , CTX <sup>S</sup> , TEM-1 ve kromozomal enzim üretimi
12	256	64	5.4, 9.0 7.4 (silik)	-	-	(-)	AMP <sup>R</sup> , TIC <sup>1</sup> , CZ <sup>1</sup> , FOX <sup>S</sup> , CAZ <sup>S</sup> , CTX <sup>R</sup> , TEM-1, OXA-1 ve kromozomal enzim

Tablo 3. Klavulanata dirençli E.coli suşlarının direnç ve beta-laktamaz özellikleri (devam).

13	> 1024	512	5.4, 8.5	-	-	(-)	AMP <sup>R</sup> , TIC <sup>R</sup> , CZ <sup>I</sup> , FOX <sup>S</sup> , CAZ <sup>S</sup> , CTX <sup>S</sup> , IMP <sup>S</sup> , AMC <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , CIP <sup>S</sup> , NAL <sup>S</sup> , Tp <sup>R</sup>	TEM-1 ve kromozomal enzim üretimi
14	> 1024	128	5.4, 9.0	-	-	(-)	AMP <sup>R</sup> , TIC <sup>R</sup> , CZ <sup>I</sup> , FOX <sup>S</sup> , CAZ <sup>S</sup> , CTX <sup>S</sup> , IMP <sup>S</sup> , AMC <sup>I</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , CIP <sup>S</sup> , NAL <sup>S</sup> , Tp <sup>R</sup>	TEM-1 ve kromozomal enzim üretimi
15	> 1024	64	5.4	724.4	≤ 0.5	(-)	AMP <sup>R</sup> , TIC <sup>R</sup> , CZ <sup>R</sup> , FOX <sup>S</sup> , CAZ <sup>S</sup> , CTX <sup>S</sup> , IMP <sup>S</sup> , AMC <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , CIP <sup>S</sup> , NAL <sup>S</sup> , Tp <sup>R</sup>	TEM-1 aşın üretimi
16	> 1024	512	5.6, 7.2	-	-	(-)	AMP <sup>R</sup> , TIC <sup>R</sup> , CZ <sup>I</sup> , FOX <sup>S</sup> , CAZ <sup>S</sup> , CTX <sup>S</sup> , IMP <sup>S</sup> , AMC <sup>I</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , CIP <sup>S</sup> , NAL <sup>S</sup> , Tp <sup>R</sup>	TEM-2 ve OXA tipi enzim
17	> 1024	128	5.4, ≥ 8.3	-	-	(-)	AMP <sup>R</sup> , TIC <sup>R</sup> , CZ <sup>R</sup> , FOX <sup>S</sup> , CAZ <sup>S</sup> , CTX <sup>S</sup> , IMP <sup>S</sup> , AMC <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , CIP <sup>R</sup> , NAL <sup>S</sup> , Tp <sup>R</sup>	TEM-1 ve kromozomal enzim üretimi
18	> 1024	1024	5.4	467.2	≤ 0.5	(-)	AMP <sup>R</sup> , TIC <sup>R</sup> , CZ <sup>R</sup> , FOX <sup>S</sup> , CAZ <sup>S</sup> , CTX <sup>S</sup> , IMP <sup>S</sup> , AMC <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , CIP <sup>S</sup> , NAL <sup>S</sup> , Tp <sup>R</sup>	TEM-1 aşın üretimi
19	> 1024	256	5.4, 9.0	-	-	(-)	AMP <sup>R</sup> , TIC <sup>R</sup> , CZ <sup>I</sup> , FOX <sup>S</sup> , CAZ <sup>S</sup> , CTX <sup>S</sup> , IMP <sup>S</sup> , AMC <sup>I</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , CIP <sup>S</sup> , NAL <sup>S</sup> , Tp <sup>R</sup>	TEM-1 ve kromozomal enzim üretimi

Tablo 4. Transkonjugantların direnç ve plazmid profilleri.

Transkonj No.	MİK (mg/L)		Ampisiline eşlik eden direnç özelliği				Plazmid (kb)
	Amp	Amp/klav	Tp	Sm	Tc	C	
Tc1	>256	>256	S	S	S	R	60
Tc3	>256	>256	S	S	R	S	68
Tc4	>256	>256	R	R	R	S	60
Tc6	>256	>256	R	R	S	S	74,60
Tc7	>256	>256	R	S	S	S	72,60
Tc8	>256	>256	R	S	R	S	70,60
Tc14	>256	>256	R	R	R	S	100,68,38,6
Tc15	>256	>256	R	R	R	R	71
Tc16	>256	>256	S	S	R	S	82,68
Tc18	>256	>256	S	S	R	S	74,4.0
Tc19	>256	>256	S	R	R	S	71,66

## TARTIŞMA

*E.coli* suşlarında ampisilin ve amoksisilin direnci, sıklıkla TEM-1 ve bazen de TEM-2 beta-laktamazı üretiminden kaynaklanmaktadır (2,37). Bu beta-laktamazların etkinliği klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile giderilebilmektedir. Ancak son yıllarda, izoelektrik odaklama ve beta-laktamaz direnç paternlerine göre sadece TEM-1 benzeri beta-laktamazlar ürettiği halde klavulanik aside dirençli *E.coli* ve diğer *Enterobacteriaceae* suşlarının bulunduğu bildirilmiştir (11,12,15,31,32).

*E.coli* suşlarında beta-laktamaz inhibitörlerine direnç mekanizmaları arasında, yüksek oranda penisilinaz (TEM-1, TEM-2) üretimi (17,27,31,33,38), *Omp F* ve/veya *C* gibi dış membran proteinlerinin değişimi (27), *OXA-1* veya kromozomal Amp C tipi enzimler gibi inhibitörlere kısmen veya tümüyle dirençli enzimlerin üretimi (29,39), sayılabilir. Bu mekanizmalar arasında en yenisi inhibitörlere dirençli TEM mutantlarının (IRT) üretimidir (2,11,31,32). Mutasyona göre değişmekte birlikte bu enzimlerin izoelektrik noktası 5.4 veya 5.2 olabilmektedir (2,9).

Ülkeye, coğrafi bölgeye ve araştırma zamanına göre değişmekle birlikte gerek yurtdışında, gerekse ülkemizde yapılan çalışmalar *E.coli* suşlarında AMC direncinin % 3-82.7 arasında olduğunu göstermiştir (5,7,8,23,24,31,34,35). Çalışmamızda ise, ampisiline dirençli 100 klinik izolatın yaklaşık % 20'si hem disk difüzyon, hem de dilüsyon yöntemleri ile aminopenisilinlerin klavulanik asit ile kombinasyonuna orta veya dirençli bulunmuştur. Bu suşların beta-laktamaz paternleri incelendiğinde 16 suşun TEM-1 ve bazı inhibitör dirençli TEM mutantları gibi izoelektrik noktası 5.4 olan enzim(ler) ürettiği saptanmış, bu suşlardaki klavulanat direncinin TEM-1'in aşırı üretimine veya IRT tipi bir enzim üretimine bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bunlar yanısıra, *Klav<sup>R</sup>* suşların beta-laktamaz direnç paternleri (*AMP<sup>R</sup>*, *TIC<sup>R</sup>*, *CZ<sup>R</sup>*, *CAZ<sup>S</sup>*, *CTX<sup>S</sup>*, *IMP<sup>S</sup>*) incelendiğinde bunun gerek TEM-1, gerekse IRT'ler gibi penisilinazlarla uyumlu olduğu görülmektedir (2,35). Dizgi analizi yapılmadığı için tam direnç mekanizması ortaya konulmamakla birlikte sadece pI 5.4 olan bir enzim üreten suşlarda spesifik enzim aktivitesi incelenerek klavulanat direncinde önde gelen mekanizmanın TEM-1 enziminin aşırı üretimi olduğu belirlenmiştir. Klavulanat ile inhibisyona göreceli olarak dirençli bir suşun ise bir IRT olabileceği düşünülmüştür.

Üretilen enzim miktarı ile beta-laktamaz inhibitörlerine direnç arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (27,31,33,38). Stapleton ve ark. (31)'nin çalışmasında, amoksisilin/klavulanata dirençli suşların % 61'inde direnç mekanizmasının TEM-1'in aşırı üretimi olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada belirlenen diğer mekanizmalar arasında OXA-1 üretimi (% 15), kromozomal beta-laktamaz üretimi (% 14), TEM-2 aşırı üretimi (% 3) ve IRT üretimi (% 4) yer almaktadır. Henquell ve ark. (11)'nin çalışmasında ise, 417 AMC dirençli *E.coli* izolatının 153'ünde (% 37) klavulanata dirençli TEM beta-laktamazların saptandığı bildirilmektedir.

Çalışmamızdaki Klav<sup>r</sup> suşlardan üçünün izoelektrik noktası OXA-1 ile uyumlu beta-laktamazlar, on birinin ise pI  $\geq$  8.3 olan kromozomal enzim ürettiği belirlenmiştir. Son gruptaki izolatlardan ikisinde direnç fenotipinin CAZ<sup>R</sup>, CTX<sup>R</sup>, FOX<sup>IR</sup> olması, bunların klavulanat direncindeki temel mekanizmanın AmpC tipi sefalosporinazların aşırı üretimi olduğunu düşündürmüştür. Oksiiminosefalosporinlere dirençli ve ÇDS testi pozitif bulunan dört izolattan üçünün TEM 7, TEM 19, TEM 20 ve TEM 29'a benzer şekilde pI 5.4'de odaklanan enzim/enzimler, birinin ise SHV-3'e benzer şekilde pI 7.0 olan bir enzim içerdiği saptanmıştır. İncelediğimiz izolatlardan % 58'inde ampisilin ve klavulanat direncinin aktarılabildiği ve buna diğer direnç belirleyicilerinin de eşlik ettiği saptanmıştır.

Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları, *E.coli*'ye bağlı infeksiyonların empirik tedavisinde önde gelen sağaltım seçenekleri arasındadır. Çalışmamıza alınan ve çoğunluğu idrar kökenli olan *E.coli* suşlarındaki aktarılabildiği klavulanat direncinin bu tip infeksiyonların sağaltımında sorun oluşturabileceği düşünülmüştür.

#### KAYNAKLAR

- 1- Bachmann BJ: Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli*, *Bacteriol Rev* 36: 525 (1972).
- 2- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA: A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure, *Antimicrob Agents Chemother* 39:1211 (1995).
- 3- Chambers HJ, Neu HC: Other beta-lactam antibiotics, "GL Mandell, JE Bennett, R Dolin (eds): *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4. baskı" kitabında s. 264, Churchill Livingstone, New York (1995).
- 4- Cooksey R, Swenson J, Clark N, Gay E, Thornsberry C: Patterns and mechanism of  $\beta$ -lactam resistance among isolates of *Escherichia coli* from hospitals in the United States, *Antimicrob Agents Chemother* 34: 739 (1990).
- 5- Coşkunlar F, Özüt H, Eraksoy H, Çalangu S, Dilmener M: Üriner sistem infeksiyonu etkeni *Escherichia coli* suşlarının oral antibiyotiklere duyarlılıkları, 5. *Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi*, Kongre kitabında s. 49, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayın No. 23, İstanbul (1995).
- 6- Eisenstein BI: Enterobacteriaceae, "GL Mandell, JE Bennett, R Dolin (eds): *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4. baskı" kitabında s. 1964, Churchill Livingstone, New York (1995).
- 7- Erdenizmenli M, Özgeç O, Urbarlı A, Fidan N, Arı A: Enterobacteriaceae üyesi bakterilerin çeşitli antibiyotiklere direnç oranları ve beta-laktamaz aktiviteleri, "3. *Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik ve Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler*" kitabında s. 338, Kuşadası (1997).
- 8- Ergüven M, Talay S, Babaoğlu K, Toprak A, Tamkan Ş, Özçay S: Çocuklarda idrardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları (özet), *ANKEM Derg* 13: 137 (1999).



- 9- Gülay Z: Beta-laktamaz inhibitörlerine dirençli TEM-benzeri enzimler, *ANKEM Derg 11*: 213 (1997).
- 10- Gülay Z, Abacıoğlu YH, Yuluğ N: Çift disk sinerji yönteminde diskler arası uzaklığın sonuca etkisi, *İnfeksiyon Derg 9*: 89 (1995).
- 11- Henquell C, Chanal C, Sirot D, Labia R, Sirot J: Molecular characterization of nine different types of mutants among 107 inhibitor-resistant TEM  $\beta$ -lactamases from clinical isolates of *Escherichia coli*, *Antimicrob Agents Chemother 39*: 427 (1995).
- 12- Hunter JE, Corkhil JE, McLennan AG, Fletcher JN, Hart CA: Plasmid encoded  $\beta$ -lactamases resistant to inhibition by clavulanic acid produced by calf faecal coliforms, *Res Vet Sci 55*:367 (1993).
- 13- Jarlier V, Nicholas MH, Fournier G, Philippon 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).
- 14- Kado CI, Liu ST: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids, *J Bacteriol 145*: 1365 (1981).
- 15- Lemozy J, Sirot D, Chanal C, Huc C et al: First characterization of inhibitor resistant TEM (IRT) beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* strain, *Antimicrob Agents Chemother 39*: 145 (1995).
- 16- Liu PYF, Gur D, Hall LMC, Livermore DM: Survey of the prevalence of  $\beta$ -lactamases amongst 1000 Gram-negative bacilli isolated consecutively at the Royal London Hospital, *J Antimicrob Chemother 30*: 429 (1992).
- 17- Martinez JL, Cercenado E, Rodriguez-Creixems M, Vincent-Perez et al: Resistance to  $\beta$ -lactam/clavulanate, *Lancet ii*: 473 (1987).
- 18- Matthew M, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW: The use of analytical isoelectric focusing for the detection and identification of beta-lactamases, *J Gen Microbiol 88*: 169 (1975).
- 19- Nandivada LS, Amyes SGB: Plasmid-mediated  $\beta$ -lactam resistance in pathogenic Gram-negative bacteria isolated in South India, *J Antimicrob Chemother 26*: 279 (1990).
- 20- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, Approved Standard M7-A4, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa (1997).
- 21- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, Approved Standard M2-A6, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa (1997).
- 22- O'Shaughnessy EM, Fahle GA, Witebsky FG: Correlation of in vitro test results for amoxicillin-clavulanate and ampicillin-sulbactam tested against *Escherichia coli*, *J Clin Microbiol 35*: 1902 (1997).
- 23- Özenci MV, Kırdar S, Yüce A, Yuluğ N: Üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli* suşlarının sulbaktam+ampisilin ile amoksisilin+klavulanik asit duyarlılıklarının karşılaştırılması, *5. Ulusal Infeksiyon Hastalıkları Kongresi*; Kongre kitabında s. 49, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No. 23, İstanbul (1995).
- 24- Öztürkeri H, Erdemoğlu A, Emekdaş G, Kocabeyoğlu Ö, Düztaş O: Beta-laktamaz inhibitörlü ve inhibitörsüz antibiyotiklerin idrardan izole edilen Enterobacteriaceae türlerine etkinliği (özet), *ANKEM Derg 13*: 135 (1999).
- 25- Payne DJ, Marriott MS, Amyes SGB: TEM-E1: a novel beta-lactamase conferring resistance to ceftazidime, *FEMS Microbiol Lett 50*: 97 (1989).

- 26- Prince AS, Neu HC: New penicillins and their use in pediatrics, *Pediatr Clin North Am* 50: 3 (1983).
- 27- Reguera JA, Baquero F, Pérez-Díaz JC, Martínez JL: Factors determining resistance to  $\beta$ -lactam combined with  $\beta$ -lactamase inhibitors in *Escherichia coli*, *J Antimicrob Chemother* 27: 569 (1991).
- 28- Roy C, Foz A, Segura C, Tirado M, Fuster C, Reig R: Plasmid determined  $\beta$ -lactamases identified in a group of 204 ampicillin resistant Enterobacteriaceae, *J Antimicrob Chemother* 12: 507 (1983).
- 29- Shanahan PMA, Thomson CJ, Amyes SGB:  $\beta$ -lactam resistance in aerobic commensal faecal flora, *Int J Antimicrobial Agents* 3: 259 (1994).
- 30- Sobel JD, Kaye D: Urinary tract infections, "GL Mandell, JE Bennett, R Dolin (eds): *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4. baskı" kitabında s. 662, Churchill Livingstone, New York (1995).
- 31- Stapleton P, We PJ, King A, Shannon K, French G, Phillips I: Incidence and mechanisms of resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*, *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2478 (1995).
- 32- Thomson CJ, Amyes SGB: TRC-1: emergence of a clavulanic acid-resistant TEM  $\beta$ -lactamase in a clinical strain, *FEMS Microbiol Lett* 91: 113 (1992).
- 33- Thomson KS, Weber DA, Sanders CC, Sanders Jr WE:  $\beta$ -lactamase production in members of the family Enterobacteriaceae and resistance to  $\beta$ -lactam-enzyme inhibitor combinations, *Antimicrob Agents Chemother* 34: 622 (1990).
- 34- Urbarlı A, Özgenç O, Erdenizmenli M, Fidan N, Arı A: İdrar örneklerinden soyulanan Gram negatif bakteriler ve antibiyotik direnç oranları, "3. *Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik ve Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler*" kitabında s. 352, Kuşadası (1997).
- 35- Vanjak D, Muller-Serieys C, Picard B, Bergogne-Berezin E, Lambert-Zechovsky N: Activity of beta-lactamase inhibitor combinations on *Escherichia coli* isolates exhibiting various patterns of resistance to beta-lactam agents, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14: 972 (1995).
- 36- Waddell WJ, Hill C: A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein, *J Lab Clin Med* 48: 311 (1956).
- 37- Wiedemann B, Kliebe C, Kresta M: The epidemiology of beta-lactamases, *J Antimicrob Chemother* 24 (Suppl B): 1 (1989).
- 38- Wu PJ, Shannon K, Phillips I: Effect of hyperproduction of TEM-1  $\beta$ -lactamase on in vitro susceptibility of *Escherichia coli* to  $\beta$ -lactam antibiotics, *Antimicrob Agents Chemother* 38: 494 (1994).
- 39- Zhou XY, Bordon F, Sirot D, Kitzis MD, Gutmann L: Emergence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing TEM-1 derivatives or an OXA-1  $\beta$ -lactamase conferring resistance to  $\beta$ -lactamase inhibitors, *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1085 (1994).