

GRAM NEGATİF ÇOMAKLARDA GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZLARIN BELİRLENMESİNDE ÜÇ BOYUTLU YÖNTEM VE ÇİFT DİSK SİNERJİ YÖNTEMİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Şengül DERBENTLİ, Handan KATRANCI, Yaşar NAKİPOĞLU

ÖZET

Hastane ortamından ve kolonize olmuş hastalardan izole edilen 35'er *Enterobacter* spp., *K.pneumoniae* ve *Pseudomonas* spp. olmak üzere toplam 105 Gram negatif bakteri, üç boyutlu yöntem ve çift disk sinerji yöntemi ile, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (Extended Spectrum Beta Lactamase: ESBL) oluşturma yönünden incelenmiştir.

Üç boyutlu yöntem ile *K.pneumoniae*, *Pseudomonas* spp. ve *Enterobacter* spp. suşlarında ESBL oluşturduğu saptananların oranı sırasıyla % 57, % 40 ve % 31 olarak belirlenmiştir. Çift disk sinerji yöntemi ile aynı oranlar sırasıyla % 40, % 37 ve % 29 olarak bulunmuştur. Üç boyutlu yöntemde daha fazla sayıda suшта ESBL varlığı saptanmakla beraber, sonuçlar bu iki yöntem arasında ESBL direncinin belirlenmesindeki duyarlılık yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığını ($p>0.05$) göstermiştir. Seftazidimin üç boyutlu yöntemde çift disk sinerji yöntemine göre anlamlı derecede ($p<0.02$) daha fazla sayıda suшта ESBL üretimini saptadığı, üç boyutlu yöntemde seftaksim diğer iki antibiyotikten, çift disk sinerji yönteminde aztreonam ve seftaksim seftazidimden daha uygun indikatörler olduğu ($p<0.05$) saptanmıştır.

SUMMARY

Comparison of three dimensional and double disk synergy methods in detection of extended spectrum beta-lactamases in Gram negative rods.

In this study, 105 Gram negative bacterial strains, 35 from each of *Enterobacter* spp., *K.pneumoniae* and *Pseudomonas* spp., isolated from hospital environment and colonized patients, have been examined by double disk synergy method and three dimensional method for ESBL production.

By three dimensional method, the percentages of strains in which ESBL production was observed were 57 %, 40 % and 31 % for *K.pneumoniae*, *Pseudomonas* spp. and *Enterobacter* spp., respectively. By double disk synergy method, however the same percentages were found as 40 %, 37 % and 29 %. Although, presence of ESBL were detected in a greater number of strains with the three dimensional method, the results indicated that there was statistically no meaningful difference ($p>0.05$) between the two methods for the detection of ESBL resistance. It was found that ceftazidime detected greater number of ESBL production in the three dimensional method compared to the double disk synergy method ($p<0.02$). Furthermore, it was determined that in the three dimensional method, cefotaxime was a more appropriate indicator compared to the other two antibiotics and that in the double disk synergy method aztreonam and cefotaxime were more appropriate indicators compared to ceftazidime ($p<0.05$).

GİRİŞ

Beta-laktamazlar penisilin, sefalosporin ve diğer beta-laktam antibiyotiklere bağlanarak, henüz kendi hedeflerine ulaşmadan onları hidrolize eden ve bu suretle bakterilerde direnç sağlayan enzimlerdir. 1940'lardan itibaren *S.aureus* suşlarında rastlanan beta-laktamaz aracılı beta-laktam direnci, 1944'de *E.coli*'de, 1960'larda diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde, 1970'lerde *H.influenzae* ve *N.gonorrhoeae*'de ve 1980'lerde *E.faecalis*'de de görülmüştür. Bu suşlara ait beta-laktamazların substrat profillerinde değişikliklere rastlanmaması önemli bir avantajdır. Çünkü bu enzimler için zayıf substrat olan beta-laktam antibiyotikler üretilerek, klinikte başarı ile kullanılmıştır. *Enterobacteriaceae* ailesindeki Gram negatif çomakların çoğunluğu kromozom kaynaklı, konstitütif veya indüklenebilir beta-laktamaz ürettiklerinden, eski kuşak beta-laktam antibiyotiklere direnç gösterirler. Bunların en önemlisi Tip 1 beta-laktamazlarıdır. Bu bakterilerde plazmid kaynaklı beta-laktamazlarla oluşan direnç de büyük önem taşımaktadır. Geniş spektrumlu olan bu enzimler içinde en sık olarak TEM-1 ve SHV-1'e rastlanır. Bunlar ampisilin, karbenisilin, tikarsilin, sefalotin ve sefamandole etkili; yeni sefalosporinler, monobaktamlar ve sefamisinlere etkisiz; beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı enzimlerdir. Son yıllarda fazla enzim üreten ve bu antibiyotiklere direnç gösteren dereprese mutant bakteriler ortaya çıkmıştır. Transfer edilemeyen bu direnç ilgili bakterilerde sınırlı kalmıştır (7, 16, 24).

İlk kez 1983 yılında Almanya'da *Klebsiella* suşlarında geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı, plazmid kaynaklı bir direnç belirlenmiş ve bu bildirimden sonra birçok Avrupa ülkesinde *Enterobacteriaceae* ailesinin üyelerinde benzer direnç mekanizmaları saptanmıştır (4, 6, 11, 15, 17, 25, 27). Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (Extended Spectrum Beta-Lactamases= ESBL) olarak adlandırılan bu enzimleri kodlayan genlerin 80-300 kb büyüklüğünde ve genellikle kolay transfer edilen plazmidler üzerinde bulunduğu belirlenmiştir (7, 12, 17). ESBL'lar geniş spektrumlu sefalosporinleri (sefotaksim, seftriakson, seftazidim) ve aztreonamı hidrolize eder, ancak sefamisinlere (sefoksitin, moksalaktam) ve karbapenemlere (imipenem, meropenem) etkisizdirler. Başka bir önemli özellikleri de, klavulanik asit ve diğer beta-laktamaz inhibitörleri ile inaktive olmalarıdır (7, 11, 20, 24, 32).

Gram negatif bakterilerde, plazmid üzerindeki genlerde kodlanan TEM ve SHV ailesinden beta-laktamazlara tüm dünyada yaygın olarak rastlanır. Birçok ESBL bu enzimlere ait genlerde meydana gelen basit nokta mutasyonlarını izleyerek, enzimin aktif bölgesinde bulunan 1-4 anahtar aminoasidin değişikliğe uğraması sonucunda ortaya çıkmıştır. Bugün bilinen 50'den fazla ESBL'in çoğunluğunun, hibridizasyon deneylerine ve aminoasit dizilerinin belirlenmesine dayanılarak TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 beta-laktamaz genlerinin değişimi sonucunda meydana geldiği saptanmıştır (5, 7, 11, 14, 24). Bu nedenle birçok ESBL, TEM veya SHV olarak adlandırılmış, genellikle direnç fenotipi (CTX-1, CAZ-1 gibi) veya tanımlandıkları yer (RHH-1 = Royal Hallamshire Hospital gibi) dikkate alınarak ikinci adlandırmaları da yapılmıştır (24).

Sefotaksim, seftriakson, seftazidim gibi 3. jenerasyon sefalosporinler (oksiimino sefalosporinler) 7-aminosefalosporanik asit nükleusunun 7- β yan zincirinde bir aminotiazol ve bir oksiimino grubu taşırlar. İlgili gendeki mutasyon sonucunda ESBL molekülünün çukur bölgesindeki aktif alanda meydana gelen değişikliklerin, enzimin 3. jenerasyon sefalosporinlere olan uygunluğunu arttırdığı ve bunun sonucunda ESBL'ların geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotikleri hidrolize edebildiği belirlenmiştir (5, 24).

ESBL'ların üretiminden sorumlu olan plazmidlerin aynı zamanda diğer antimikrobiyal ajanlara direnç genlerini de taşıdığı saptanmıştır. Bu ajanların başta aminoglikozidler olmak üzere, tetrasiklinler, kloramfenikol, sülfonamidler, trimetoprim, civa klorür, potasyum tellürit ve UV radyasyonu olduğu bildirilmiştir (11, 12, 27).

Bugüne kadar tanımlanan hemen tüm ESBL'ların TEM veya SHV enzimlerinin modifikasyonu olduğu saptanmıştır. Ancak TEM ve SHV türevi olmayan, yine plazmid aracılı MIR-1, BIL-1, MEN-1, OXA-11, KH gibi ESBL'lar da bulunmuştur (3, 10, 21, 22, 34). Ayrıca bir *P.aeruginosa* suşunda saptanan yeni bir ESBL'nin (PER-1) muhtemelen kromozomal olduğu bildirilmiştir (20). Başka bir araştırmada ise, *K.pneumoniae* ve *E.coli* suşlarında kromozom orijinli ESBL bulunduğu belirlenmiştir (25).

ESBL oluşturan suşların hastane infeksiyonu epidemilerine neden oldukları, taşıdıkları direnç plazmidleri türler arasında da transfer edilebildiğinden hastanelerde plazmid salgınları ile karşılaştığı bildirilmektedir (21, 23, 26). Bu çalışma İstanbul Tıp Fakültesi'nde ESBL üreten hastane suşlarının sıklığını belirlemek amacı ile planlanmıştır. ESBL oluşumu, ilgili beta-laktam antibiyotiklere duyarlılık azalması, üç boyutlu yöntem ve çift disk sinerji deneyi ile araştırılmış ve bu yöntemlerin sonuçları birbiri ile karşılaştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Tıp Fakültesi'nin çeşitli kliniklerinden nozokomiyal infeksiyon kontrolü amacı ile, hastane ortamından, başta anestezi ve solunum cihazları olmak üzere çeşitli alet ve gereçlerden alınan örneklerden ve bir yenidoğan ünitesinde anormal kolonizasyonun belirlenmesi amacı ile yenidoğanlardan alınan burun sürüntü örneklerinden izole edilen Gram negatif çomaklar çalışma kapsamına alınmıştır. Otuzbeşer *Enterobacter* spp., *K.pneumoniae* ve *Pseudomonas* spp. (21'i *P.aeruginosa*) olmak üzere toplam 105 suş ESBL oluşturma yönünden incelenmiştir.

Suşların aztreonam, seftazidim, sefotaksim, sefoperazon, sefodizim, piperasilin, mezlosilin ve meropenem duyarlılık deneyleri NCCLS standartlarına uygun olarak yapılmıştır (19). Üç boyutlu yöntem için de disk difüzyon yöntemi uygulanan Petri kutuları kullanılmıştır.

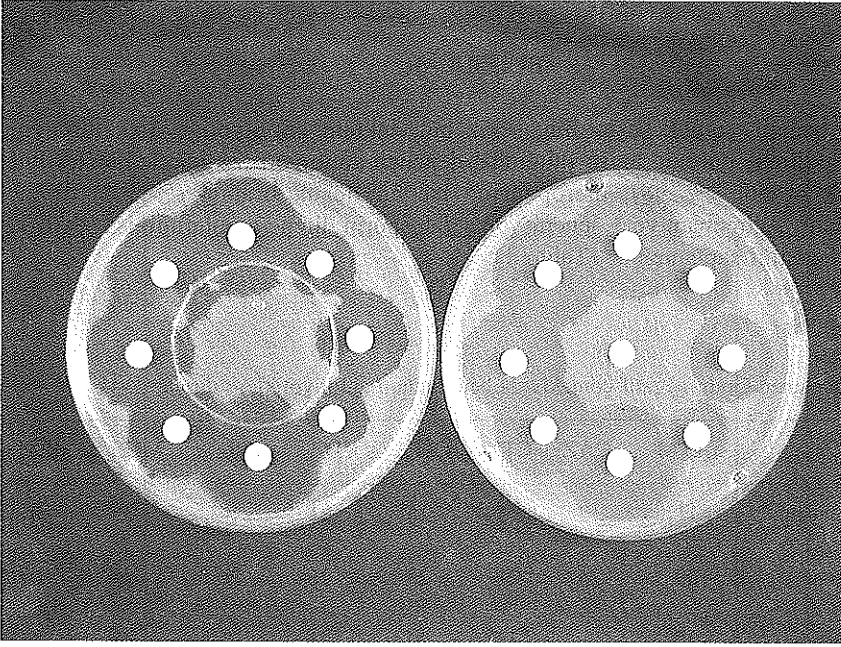
Üç boyutlu yöntem: Disk difüzyon yönteminin esas alındığı bu deneyde, ek olarak Petrinin ortasına yakın tarafta ve antibiyotik disklerinin 3 mm uzağında besiyeri (Mueller-Hinton agar, Oxoid) daire şeklinde kesilmiştir. Bu amaçla laboratuvarımızda mukavva üzerine 11 No'lu bistüri ucu monte edilerek bir düzenek hazırlanmıştır. Düzenekdeki bistüri ucu Petri kutusundaki agar üzerinde bir tur döndürüldüğü zaman, disk dispenseri (Oxoid) ile yerleştirilen disklerin 3 mm uzağında ve merkeze yakın tarafında besiyerinin dibine kadar daire şeklinde kesilmesi sağlanmıştır. Düzenek her kullanımdan önce UV kabininde (Steristrom 2537 A°) 15' tutulmuştur.

Bu yöntemde besiyerinin nem içeriği ve Petri kutusundaki yüksekliği çok kritiktir. Tüplerde 25.5'er ml olarak hazırlanarak steril edilmiş Mueller-Hinton agarlar, kaynayan suda tutularak eritilmiş ve 50°C'lik su banyosunda 15' bekletildikten sonra, 9 cm çapındaki Petri kutularına dökülmüştür. Bu suretle besiyerinin Petri kutusundaki yüksekliğinin 4 mm olması sağlanmıştır. Besiyerleri kapakları aralık olarak bek alevi yakınında 5-10' bekletildikten sonra buzdolabına kaldırılmıştır. Agar çok kuruduğu zaman, kesi çizgisi inokülasyon esnasında genişlemekte ve agarda istenmeyen bir açıklık meydana gelmektedir. Oysa, kesi çizgisinin iki tarafının birbirine temas etmesi gereklidir.

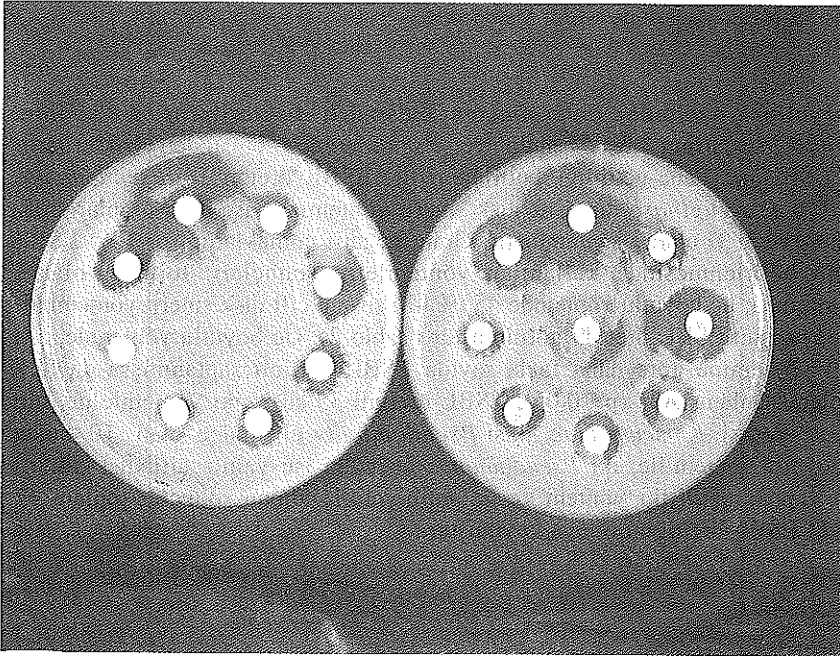
Disk difüzyon ve üç boyutlu yöntemdeki inokulumlar denenecek bakterinin triptik soy agardaki (Oxoid) bir gecelik kültüründen hazırlanmıştır. Üç boyutlu yöntem için; 10 µl'lik bir öze dolusu suşun 0.5 ml steril triptik soy buyyon (Oxoid) içindeki süspansiyonu Vortex mikser ile 10 sn süreyle iyice karıştırılmıştır. Disk difüzyon deneyinde kullanılmak üzere hazırlanan ikinci triptik soy buyyon kültürünün bulanıklığı 0.5 No'lu McFarland standardına eşitleninceye kadar, her iki kültür tüpü birlikte, 35°C'de inkübe edilmiştir. Bu suretle üç boyutlu test için agara açılmış olan yarığa ekilecek inokulumun ml'de 10^9 - 10^{10} , disk difüzyon için agar yüzeyine ekilecek inokulumun yaklaşık 10^8 bakteri içermesi sağlanmıştır. 0.5 No'lu McFarland bulanıklığındaki kültür disk difüzyon deneyi standartlarına uygun olarak besiyerinin yüzeyine yayılmıştır. Daha sonra üç boyutlu yöntem için hazırlanan inokulumdan steril pipet ucu kullanılarak otomatik pipetle 200 µl alınmış, kesi çizgisi bu inokulumla doldurulmuş ve bu esnada süspansiyonun agar yüzeyine taşmamasına dikkat edilmiştir. Her iki inokulasyon yapıldıktan sonra disk dispenseri ile diskler yerleştirilmiş ve Petri kutuları etüvde 35°C'de 18-20 saat bekletilmiştir. Disk difüzyon sonuçları NCCLS standartlarına göre okunmuştur. Beta-laktamaza bağlı zon bozulmalarında, çaplar zonun bozulmamış bölgelerinden ölçülmüştür.

Denenen antibiyotiğin enzimatik inaktivasyonu, inhibisyon zonunun dairesel üç boyutlu inokulasyon bölgesi ile kesiştiği yerde genişliğinin incelenmesi ile belirlenmiştir. Yani, deney sonucu kalitatif olarak değerlendirilmiştir. Aztreonam seftazidim ve sefotaksime ait inhibisyon zonlarının dairesel biçiminde bozulma veya keşinti ya da suşun inokule edildiği kesi çizgisi civarında birbirinden ayrı kolonilerin üremesi; antibiyotiğin yoğun inokulasyon bölgesinden geçerken inaktive edildiğini göstermiştir. Antibiyotik inaktivasyonuna ilişkin belirti, zonda çok hafif bir bozulma şeklinde ortaya çıktığında da, deney sonucu pozitif olarak kaydedilmiştir. Zon çapında değişiklik olmaması veya üç boyutlu inokulasyon bölgesinde birbirinden ayrı kolonilerin oluşmaması antibiyotiğin inaktive olmadığını göstermiştir (Resim 1, 2). Deneyde *E.coli* ATCC 25922 suşu negatif kontrol olarak kullanılmıştır (30).

Çift disk sinerji deneyi: Deneyin tüm aşamalarında disk difüzyon yönteminin standartları sağlanmıştır (19). Suşların yayıldığı Mueller-Hinton agar yüzeyine, çevreye disk difüzyon yönteminde kullanılan antibiyotik diskleri ve ortaya amoksisilin-klavulanik asit diskleri yerleştirilmiştir. Ortadaki disk ile çevredeki disklerin uzaklığı, merkezden merkeze 3 cm olacak şekilde ayarlanmıştır. 18-20 saat 35°C'de inkübe edilen besiyerleri incelendiğinde, 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, diğer bir deyimle klavulanik asidin antibiyotiği güçlendirmesi, suşun ESBL oluşturduğunu göstermiştir (Resim 1, 2) (13, 27, 30).



Resim 1. Bir *Pseudomonas* suşunda üç boyutlu yöntem (pozitif) ve çift disk sinerji yöntemi (negatif) ile ESBL oluşumu aranması.



Resim 2. Bir *K.pneumoniae* suşunda üç boyutlu yöntem (pozitif) ve çift disk sinerji yöntemi (pozitif) ile ESBL oluşumu aranması.

BULGULAR

Gram negatif çomak suşlarının, sekiz beta-laktam antibiyotiğe disk difüzyon yöntemi ile direnç durumu araştırıldığında; denenen antibiyotikler içinde mezlosiline en yüksek oranda (% 98), meropeneme ise en düşük oranda (% 3.8) direnç belirlenmiştir. Aztreonam ve 3. jenerasyon sefalosporin direnç oranlarının ise % 36-77 arasında değiştiği saptanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. İncelenen Gram negatif çomaklarda beta-laktam antibiyotiklere direnç*.

	ATM	CAZ	CTX	CFP	CDZ	PRL	MEZ	MEM
Enterobacter spp. (n: 35)	11	12	13	15	21	14	35	0
K.pneumoniae (n: 35)	20	25	21	25	26	26	35	0
Pseudomonas spp (n: 35)	21	1	33	12	34	1	33	4
Toplam (n: 105)	52 (% 50)	38 (% 36)	67 (% 64)	52 (% 50)	81 (% 77)	41 (% 39)	103 (% 98)	4 (% 4)

*: Orta duyarlı suşlar dirençli olarak sınıflandırılmıştır.

ATM: Aztreonam, CAZ: Sef tazidim, CTX: Sefotaksim, CFP: Sefoperazon, CDZ: Sefodizim, PRL: Piperasilin, MEZ: Mezlosilin, MEM: Meropenem.

Üç boyutlu yöntemde *Enterobacter* cinsinden bakterilerin % 31'inin, *K.pneumoniae* suşlarının % 57'sinin ve *Pseudomonas* cinsinden bakterilerin % 40'ının ESBL meydana getirdiği belirlenmiştir. ESBL üreten 14 *Pseudomonas* suşundan 10'u *P.aeruginosa*'dır. Çift disk sinerji yönteminde ise aynı oranlar sırası ile % 29, % 40 ve % 37 olarak saptanmıştır. Gram negatif çomaklarda (n: 105) ESBL oluşumunun belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin sonuçları toplam olarak karşılaştırıldığında; üç boyutlu yöntemde 45 (% 43) suşun, çift disk sinerji yönteminde ise 37 (% 35) suşun ESBL ürettiği görülmüştür (Tablo 2). Üç boyutlu yöntemde, çift disk sinerji yöntemine göre daha fazla sayıda ESBL üretimi saptanmışsa da fark istatistiki olarak anlamsızdır ($p > 0.05$). ESBL üretimi 35 suşta iki yöntemle de, biri *Enterobacter*, yedisi *K.pneumoniae*, ikisi *Pseudomonas* cinsinden olan 10 suşta yalnız üç boyutlu yöntem ile, iki *Pseudomonas* suşunda ise yalnız çift disk sinerji yöntemi ile saptanmıştır. İki yöntem ve üç antibiyotikle alınan sonuçlar toplam 47 suşun (% 45) ESBL ürettiğini ortaya koymuştur.

Tablo 2. Üç boyutlu yöntem ve çift disk sinerji yönteminde ESBL üretiminin belirleyicisi olan beta-laktam antibiyotikler.

	Toplam								n	%
	ATM	CAZ	CTX	ATM+CAZ	CAZ+CTX	ATM+CTX	ATM+CAZ+CTX			
Enterobacter spp. n:35	ÜB	0	2	5	0	2	1	1	11	31
	ÇDS	1	0	3	0	0	4	2	10	29
									p>0.05	
K.pneumoniae n:35	ÜB	2	1	7	0	5	3	2	20	57
	ÇDS	1	0	4	0	0	8	1	14	40
									p>0.05	
Pseudomonas spp. n:35	ÜB	4	4	1	1	1	2	1	14	40
	ÇDS	7	3	0	0	1	2	0	13	37
									p>0.05	
Toplam n:105	ÜB	6	7	13	1	8	6	4	45	43
	ÇDS	9	3	7	0	1	14	3	37	35
									p>0.05	

ÜB: Üç boyutlu yöntem, ÇDS: Çift disk sinerji yöntemi.

ESBL üreten 47 suşun yalnız aztreonam dikkate alındığında üç boyutlu yöntem ile 17'sinde, çift disk sinerji yöntemi ile 26'sında; yalnız seftazidim dikkate alındığında sırasıyla 20'sinde ve 7'sinde; yalnız sefotaksim dikkate alındığında 31'inde ve 25'inde pozitif sonuç alınmıştır (Tablo 3). Buna göre ESBL üretiminin belirlenmesi için üç boyutlu yöntemde, sefotaksim aztreonam ve seftazidimden daha iyi bir indikatör olduğu ($p<0.05$), çift disk sinerji yönteminde ise aztreonam ve sefotaksim seftazidimden daha iyi bir indikatör olduğu ($p<0.001$) anlaşılmaktadır.

Tablo 3. Aztreonam, seftazidim veya sefotaksimden biri ile ESBL ürettiği belirlenen suş sayıları.

		ATM	CAZ	CTX
Enterobacter spp. (n: 35)	ÜB	2	5	9
	ÇDS	7	2	9
K.pneumoniae (n: 35)	ÜB	7	8	17
	ÇDS	10	1	13
Pseudomonas spp. (n: 35)	ÜB	8	7	5
	ÇDS	9	4	3
Toplam (n: 105)	ÜB	17 ^a	20 ^b	31 ^c
	ÇDS	26 ^d	7 ^e	25 ^f

ab, ad, cf, df: $p>0.05$; ac, bc: $p<0.05$; be: $p<0.02$; de, ef: $p<0.001$.

ESBL oluşturan suşlarla yapılan disk difüzyon deneyinde, aztreonam, seftazidim ve sefotaksim karşısında meydana gelen ortalama inhibisyon zon çapları incelendiğinde; genellikle bunların duyarlılık sınırlarının altında kaldığı gözlenmiştir. Ancak ESBL oluşturan *Pseudomonas* suşları için seftazidim ile elde edilen inhibisyon zon çapları ortalaması (26.7 mm) duyarlılık sınırının (≥ 18 mm) çok üstünde bulunmuştur (Tablo 4). Çalışmamızda *K.pneumoniae* suşlarında ESBL üretimi diğer iki türdekinden ve *P.aeruginosa* suşlarında *Enterobacter* suşlarından daha fazla bulunmuşsa da, farklar istatistiki olarak anlamsız düzeyde kalmıştır ($p>0.05$).

Tablo 4. ESBL oluşturan suşlarda disk difüzyon deneyi ile belirlenen ortalama inhibisyon zon çapları (mm).

	ATM (≥ 22)*	CAZ (≥ 18)*	CTX (≥ 23)*
Enterobacter spp. (n: 11)	15	7.1	19.1
K.pneumoniae (n: 20)	12.9	9.7	16.4
Pseudomonas spp.(n: 16)	19.5	26.7	12.5

*: Duyarlılık sınırı.

TARTIŞMA

Gram negatif bakterilerce üretilen TEM ve SHV beta-laktamazlarına duyarlı olduklarından, ilk yarı sentetik sefalosporinlerin bu bakteriler ile gelişen infeksiyonların tedavisindeki değeri sınırlıdır. Yeni jenerasyon sefalosporinlerde 7-amino-sefalosporanik asit nükleusunun yan zincirlerinde yapılan değişiklikler, bunların eski jenerasyon sefalosporinlere dirençli bakterilere etkili olmalarını sağlamıştır. Buna karşın, yeni sefalosporinler de, ilk kez 1983 yılında tanımlanmış olan ESBL'lar tarafından inaktive edilmektedir.

Enterobacteriaceae ailesindeki birçok bakteri cinsinin ESBL oluşturduğu, en sık ESBL üreten türün *K.pneumoniae* olduğu saptanmıştır. Bunun nedeni kesin olarak belirlenememiştir. Bazı yazarlar bu bakteri türünde spontan mutasyonların daha sık olarak gerçekleştiği fikrini öne sürmüşlerdir. ESBL'ları kodlayan plazmidlerin farklı türler arasında transfer edilebilmesi sonucunda, *K.oxytoca*, *E.aerogenes*, *E.cloacae*, *S.marcescens*, *E.coli*, *L.malonatica*, *M.morganii*, *C.freundii* ve *Salmonella* spp.'in de bu enzimleri üretebildiği gösterilmiştir (11, 14, 17, 32).

Fransa'da 1988 yılında yapılan ve 16 hastaneyi kapsayan bir çalışmada *K.pneumoniae* suşlarının % 9'unun ESBL oluşturduğu saptanmıştır (29). Bu ülkede aynı yıl yapılan başka bir çalışmada, *Enterobacteriaceae* türleri arasında ESBL oluşturma oranı % 14 olarak bildirilmiştir (13). Sirot ve ark. (27)'nin bir çalışmasında, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* cinsleri dışındaki diğer *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde ESBL oluşturma oranının düşük olduğu ve *K.pneumoniae* suşlarında ESBL'lara bağlı geniş spektrumlu sefalosporin ve aztreonam direncinin üç yıllık periyotta % 11.5'den % 15.2'ye yükseldiği belirtilmiştir. Bir salgın döneminde yoğun bakım ünitesinden izole edilen *Enterobacteriaceae* türlerinin % 50'den fazlasının CTX-1'i de kodlayan çoğul direnç plazmidlerini taşıdığı belirlenmiştir (28). İngiltere'de yapılan bir çalışmada, *K.pneumoniae* suşlarının % 16'sının ESBL ürettiği bildirilmiştir (16).

Çalışmamızda, incelenen *Enterobacteriaceae* üyelerinden *Enterobacter* suşlarının % 31'inin ve *K.pneumoniae* suşlarının % 57'sinin ESBL oluşturduğu saptanmıştır. *K.pneumoniae* suşlarında ESBL üretme oranının *Enterobacter* cinsine göre yüksek bulunması, literatüre uygunluk göstermiştir. Ülkemizdeki çeşitli merkezlerde bu konuda yapılan çalışmalarda, ESBL pozitif suşların oranı genellikle yüksek bulunmaktadır. Abacıoğlu ve ark. (1)'nin bir çalışmasında nozokomiyal salgın döneminde bir yenidoğan ünitesindeki 34 hastadan izole edilen *K.pneumoniae* suşlarının tümünün ESBL ürettiği gösterilmiştir. Aynı merkezde yapılan başka bir çalışmada 24 *K.pneumoniae* suşunun; çift disk sinerji yöntemi ile 15'inde (% 62) ve E testi ile 12'sinde (% 50) ESBL üretimi belirlenmiştir (2). Vahaboğlu ve ark. (31) hastane kaynaklı Gram negatif çomaklarda ESBL oluşturma oranını, çift disk sinerji yöntemi ile % 24 olarak belirlemişlerdir. Çift disk sinerji yöntemi ve E testinin karşılaştırmalı olarak uygulandığı başka bir çalışmada, *Klebsiella* suşlarının ESBL üretim oranı (% 52) her iki yöntemde eşit bulunmuştur (8).

1991 yılına kadar *Pseudomonas* cinsinde ESBL'ların varlığı gösterilmemiş, bu tarihten itibaren plazmid ve kromozom kaynaklı ESBL üreten *P.aeruginosa* suşları bildirilmiştir (10, 20, 33). Çalışmamızda incelenen *Pseudomonas* cinsinden bakterilerde ESBL oluşturma oranı (% 40) oldukça yüksek bulunmuştur. Ülkemizde yapılan ve çift disk sinerji yönteminin uygulandığı bir çalışmada, incelenen *P.aeruginosa* suşlarının % 5.8'inde ESBL'ların varlığı gösterilmiştir (9).

ESBL'lar klinik laboratuvarlarda yapılan duyarlılık deneylerinde; sefotaksim, seftriakson, seftazidim ve/veya aztreonama alışılmışın dışında direnç görülmesi ile belirlenebilirler. Ancak bazı ESBL pozitif bakterilerle yapılan duyarlılık deneylerinde, bu antibiyotiklere direnç veya hiç olmazsa orta duyarlılık saptanamaz ve bu suşlar yanlışlıkla duyarlı olarak tanımlanır. Çünkü dereprese mutant suşlarda genellikle yeni sefalosporinlere ve aztreonama yüksek düzeyde direnç (MİK>64 µg/ml) gelişmesine karşın, ESBL oluşturan suşlarda direnç düşük düzeydedir (MİK= 4-16 µg/ml) ve bu düşük düzeyde direnç, standart yöntemlerle her zaman gösterilememektedir. Bu durum, klinikte büyük önem taşıyan bir direnç mekanizmasının belirlenememesine neden olur (27, 30). Nitekim, çalışmamızda da ESBL üreten *Pseudomonas* suşlarının tümü seftazidime duyarlı bulunmuştur. Bu nedenle duyarlılık deneylerinin yanında, güvenilir sonuç veren ek bir yöntem kullanılarak ESBL'lara bağlı direncin saptanması gereklidir.

Standart inokulumdan daha yoğun inokulumların kullanıldığı dilüsyon yöntemi, çift disk sinerji yöntemi ve üç boyutlu yöntem ile ESBL direnci saptanabilmektedir (30). Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı çift disk sinerji yöntemidir. Bazı yazarlar çok düşük düzeylerde üretilen ESBL'ların bile bu yöntem ile belirlenebildiğini ve bu nedenle önerilebilir bir yöntem olduğunu savunmuşlardır. Bir çalışmada disk difüzyonla geniş spektrumlu sefalosporinlere duyarlı olarak tanımlanan bakterilerin yaklaşık yarısı çift disk sinerji yöntemi ile dirençli olarak sınıflandırılmıştır (27). Ancak çift disk sinerji yönteminin güvenilirliğini azaltan çeşitli faktörler de bildirilmiştir. Örneğin bazı suşlar tarafından yüksek düzeyde oluşturulan sefalosporinazlar sinerjist etkinin görülmesini önleyebilmektedir (27). Diskler arasındaki uzaklığın da, deneyin sonucunu etkilediği, bazen ESBL oluşturan suşlarla yapılan ve diskler arasındaki uzaklığın 30 mm olarak ayarlandığı deneylerde yanlış negatif sonuçlar elde edildiği bildirilmekte ve böyle durumlarda diskleri yakınlaştırarak deneyin tekrarlanması önerilmektedir. Ayrıca klavulanik asit diskinde meydana gelebilecek potens kaybının da dikkate alınması gerektiği belirtilmektedir. Bir çalışmada, ambalajı yedi gün veya daha kısa süre önce açılmış disklerle doğru sonuç elde edilmesine karşın, iki hafta önce kullanılmaya başlanmış disklerin hatalı sonuç verdiği saptanmıştır (18).

ESBL'ların gösterilmesinde yararlanılan üç boyutlu yöntemde antibiyotik duyarlılığı ile, beta-laktamaz substrat profili birlikte saptanabilmektedir. Bir çalışmada bu yöntem için en duyarlı indikatörlerin sefotaksim ve seftriakson olduğu bildirilmiştir (30). Çalışmamızda seftriakson kullanılmamış, sefotaksim üç boyutlu yöntemle ESBL'ların belirlenmesi için seftazidim ve aztreonama göre daha uygun bulunmuştur. Çift disk sinerji yönteminde ise, aztreonam ve sefotaksimin seftazidime göre daha uygun indikatörler olduğu saptanmıştır.

Thomson ve ark. (30)'nın, ESBL oluşturduğu bilinen suşlarla yapılan araştırmalarında, çift disk sinerji yöntemi ile % 79, üç boyutlu yöntem ile % 90 oranında pozitif sonuç elde edilmiştir. Çalışmamızda çift disk sinerji yöntemi ile suşların % 35'inin ESBL oluşturduğu belirlenmiş, üç boyutlu yöntem ile ise aynı oran % 43 olarak bulunmuştur. Ancak yapılan istatistiksel değerlendirmede, iki deney sonucu arasındaki farkın anlamlı olmadığı ($p>0.05$) görülmüş, daha fazla sayıda suşun denenmesi halinde, bu farka ilişkin istatistiksel değerler anlamlı olabileceği düşünülmüştür.

Denenen antibiyotiklerin ESBL'ların indikatörü olarak iki ayrı yöntemdeki tek başına değerleri karşılaştırıldığında, yalnız aztreonam veya sefotaksim kullanıldığında yöntemler arasında elde edilen farkın istatistiksel anlamı olmadığı

($p>0.05$), ancak yalnız seftazidim ile elde edilen farkın anlamlı olduğu ($p<0.02$) belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan iki yöntemde, üç indikatör antibiyotikle ESBL üretimi değişik sayıda suşta gösterilmiştir (Tablo 3). Suşların 35'inde iki yöntemle de ESBL üretimi belirlenmesi yanında, 10 suşta yalnız üç boyutlu yöntem, iki suşta yalnız çift disk sinerji yöntemi ile pozitif sonuç alınmıştır. Bu fark muhtemelen denenen suş sayıları nedeniyle anlamlı bulunmamışsa da, üç boyutlu yöntemde yalnız aztreonam veya seftazidim ile, çift disk sinerji yönteminde yalnız seftazidim ile alınan sonuçlarla, üç antibiyotik de kullanılması halinde alınan sonuçlar arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.01$). Buna karşılık çift disk sinerji yönteminde yalnız aztreonam, her iki yöntemde yalnız sefotaksim ile alınan sonuçlar, üç antibiyotik de kullanıldığında saptanandan daha düşük ise de, fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

ESBL'ların pek çoğunun sefamisinleri ve karbapenemleri etkilememeleri ve beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı olmaları, bu tür beta-laktamazlara sahip bakterilerin etken olduğu infeksiyonların tedavisi için önemli bir avantajdır. ESBL'ların geniş spektrumlu beta-laktamlara afinitesi arttıkça, beta-laktamaz inhibitörlerine de ilgileri arttığından, bu enzimler beta-laktam+beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları ile etkisiz hale getirilmektedir. Ancak, eğer bir suş ESBL yanında, örneğin TEM-1 de oluşturduğu takdirde, kombinasyondaki inhibitörün etkisi zayıflar ve tedavi başarısız kalabilir (24).

ESBL oluşturan bakterilerin oranı hastaneler arasında değişiklik göstermektedir. Bu farklılık, lokal epidemiyolojik faktörlere, genel infeksiyon kontrol önlemlerine ve antibiyotik kullanım politikalarına bağlanmaktadır (27). Hastanelerde geniş spektrumlu beta-laktamlara direnç varlığının belirlenmesi ve bu direncin izlenmesi, nozokomial infeksiyon epidemilerinin ortaya çıkmasını ve yayılmasını azaltmada yararlanması gereken bir kontrol yöntemidir.

KAYNAKLAR

- 1- Abacıoğlu YH, Aslani Mehr M, Gülay Z, İnan S, Yuluğ N: Resistotyping and plasmid profile analysis of multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated during a nosocomial outbreak, *İnfeksiyon Derg* 9: 63 (1995).
- 2- Abacıoğlu YH, Yücesoy M, Gülay Z, Yuluğ N: "Extended spectrum beta-lactamases" saptanmasında E testi ile çift disk sinerji yöntemlerinin karşılaştırılması, *İnfeksiyon Derg* 9: 93 (1995).
- 3- Bernard H, Tancrede C, Livrelli V, Morand A, Barthelemy M, Labia R: A novel extended-spectrum plasmid-mediated β -lactamase not derived from TEM- or SHV-class enzymes, *J Antimicrob Chemother* 29: 590 (1992).
- 4- Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, Montravers F, Ansquer M, Duval J: Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*, *Lancet* ii: 302 (1987).
- 5- Collatz E, Labia R, Gutmann L: Molecular evolution of ubiquitous β -lactamases towards extended-spectrum enzymes active against newer β -lactam antibiotics, *Molecular Microbiol* 4: 1615 (1990).
- 6- De Champs C, Sirot D, Chanal MC, Dumas MP, Sirot J: Concomitant dissemination of three extended-spectrum β -lactamases among different Enterobacteriaceae isolated in a French hospital, *J Antimicrob Chemother* 27: 441 (1991).
- 7- Du Bois SK, Marriott MS, Amyes SGB: TEM- and SHV-derived extended-spectrum β -lactamases: relationship between selection, structure and function, *J Antimicrob Chemother* 35: 7 (1995).

- 8- Eskitürk A, Korten V, Söyletir G: Akut bakım gerektiren hastalarda gelişen infeksiyonlardan izole edilen Klebsiella türlerinde geniş spektrumlu β -laktamaz (ESBL) direnci sıklığının araştırılması, 5. *Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi*, Kongre Kitabı s.33, Türk Mikrobiyol Cem Yayın No. 23, İstanbul (1995).
- 9- Gülay Z, Biçmen C, Yuluğ N: Pseudomonas aeruginosa suşlarında geniş spektrumlu beta-laktamazların araştırılması, 5. *Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi*, Kongre Kitabı s.52, Türk Mikrobiyol Cem Yayın No. 23, İstanbul (1995).
- 10- Hall LMC, Livermore DM, Gür D, Akova M, Akalın HE: OXA-11, extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from Pseudomonas aeruginosa, *Antimicrob Agenst Chemother* 37: 1637 (1993).
- 11- Jacoby GA, Medeiros AA: More extended-spectrum β -lactamases, *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1697 (1991).
- 12- Jacoby GA, Sutton L: Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum β -lactamases, *Antimicrob Agents Chemother* 35: 164 (1991).
- 13- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A: Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns, *Rev Infect Dis* 10: 867 (1988).
- 14- Katsanis G, Jacoby G: The frequency of extended-spectrum β -lactamases in isolates of Klebsiella pneumoniae, *J Antimicrob Chemother* 29: 345 (1992).
- 15- Knothe H, Shah P, Kreméry V, Antal M, Mitsuhashi S: Transferable resistance to cefotaxime, ceftaxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens, *Infection* 11: 315 (1983).
- 16- Eiu PYF, Gür D, Hall LMC, Livermore DM: Survey of the prevalence of β -lactamases amongst 1000 Gram-negative bacilli isolated consecutively at the Royal-London-Hospital, *J Antimicrob Chemother* 30: 429 (1992).
- 17- Mariotte S, Nordmann P, Nicolas MH: Extended-spectrum β -lactamase in Proteus mirabilis, *J Antimicrob Chemother* 33: 925 (1994).
- 18- Moland ES, Thomson KS: Extended-spectrum β -lactamases of Enterobacteriaceae, *J Antimicrob Chemother* 33: 666 (1994).
- 19- 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).
- 20- Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Yvon MB, Labia R: Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from Pseudomonas aeruginosa, *Antimicrob Agents Chemother* 37: 962 (1993).
- 21- Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA: Novel plasmid-mediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and α -methoxy β -lactams in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae, *Antimicrob Agents Chemother* 34: 2200 (1990).
- 22- Payne D J, Woodruff N, Amyes S G B: Characterization of the plasmid-mediated β -lactamase BIL-1, *J Antimicrob Chemother* 30: 119 (1992).
- 23- Petit A, Gerbaud G, Sirot D, Courvalin P, Sirot J: Molecular epidemiology of TEM-3 (CTX-1) β -lactamase, *Antimicrob Agents Chemother* 34: 219 (1990).
- 24- Philippon A, Labia R, Jacoby G: Extended-spectrum β -lactamases, *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1131 (1989).
- 25- Pörnüll KJ, Göransson E, Rytting AS, Dornbusch K: Extended-spectrum β -lactamases in Escherichia coli and Klebsiella spp. in European septicaemia isolates, *J Antimicrob Chemother* 32: 559 (1993).
- 26- Rice LB, Willey SH, Papanicolaou GA, Medeiros AA, Eliopoulos GM, Moellering RC, Jacoby G A: Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended - spectrum β -lactamases at a Massachusetts chronic-care facility, *Antimicrob Agents Chemother* 34: 2193 (1990).

- 27- Sirot DL, Goldstein FW, Soussy CJ, Courtieu AL, Husson M O, Lemozy J, Meyran M, Morel C, Perez R, Quentin-Noury C, Reverdy ME, Scheffel JM, Rosebaum M, Rezvani Y: Resistance to cefotaxime and seven other β -lactams in members of the family Enterobacteriaceae: a 3-year survey in France, *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1677 (1992).
- 28- Sirot J, Chanal C, Petit A, Sirot D, Labia R, Gerbaud G: Klebsiella pneumoniae and other Enterobacteriaceae producing novel plasmid-mediated β -lactamases markedly active against third-generation cephalosporins: epidemiologic studies, *Rev Infect Dis* 10: 850 (1988).
- 29- Thabaut A, Acar J, Arlet G, Berardi-Grasias L, Bergogne-Bérézin E, Brun Y, Buisson Y, Chabanon G, Cluzel A, Courtieu A, Dabernat H, Duval J, Fleurette J, Ghnassia JC, Jarlier V, Meyran M, Monteil H, Petithory JC, Philippon A, Sedallian A, Sirot J, Viot M, Werneburg B: Sensibilité des Pseudomonas aeruginosa et des Klebsiella a la ceftazidime, *Presse Med* 17: 1895 (1988) (Kaynak 11'de site edilmiştir).
- 30- Thomson KS, Sanders CC: Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: Comparison of the double-disk and three-dimensional tests, *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1877 (1992).
- 31- Vahaboğlu MH, Mülazımoğlu L, Erdem İ, Yıldırım İ, Taşer B, Avkan V: Taksim Hastanesi'nde β -laktam antibiyotiklere karşı gelişen direncin süurveyansı, *Klinik Derg* 6: 79 (1993).
- 32- Vedel G, Belaouaj A, Gilly L, Labia R, Philippon A, Nevot P, Paul G: Clinical isolates of Escherichia coli producing TRI β -lactamases: novel TEM-enzymes conferring resistance to β -lactamase inhibitors, *J Antimicrob Chemother* 30: 449 (1992).
- 33- Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S: Transferable imipenem resistance in Pseudomonas aeruginosa, *Antimicrob Agents Chemother* 35: 147 (1991).
- 34- Wu SW, Dornbusch K, Norgren M, Kronvall G: Extended spectrum β -lactamase from Klebsiella oxytoca, not belonging to the TEM or SHV family, *J Antimicrob Chemother* 30: 3 (1992).