

## ENTEROBACTERIACEAE AİLESİNDE ANTİBİYOTİK DUYARLILIK DENEYLERİNDE YENİ GELİŞMELER

Zeynep GÜLAY

*New developments in antibiotic sensitivity tests for Enterobacteriaceae.*

*Enterobacteriaceae* türleri, hastane ve toplum kökenli infeksiyonlardan en sık izole edilen etkenler arasında yer almaktadır. Bu grupta yer alan bakterilerde, çeşitli antibiyotiklere direnç giderek yaygınlaşmakta, tedavi seçimi ve etkinliğinde sorun yaratmaktadır. *Enterobacteriaceae* türlerinde iki türlü dirençten söz edilebilir(3):

1- Doğal (intrinsik) direnç: Klinikte antibiyotik kullanılmasından çok önce gelişmiştir ve çoğu türlerin genetik bir özelliğidir. Örneğin, tüm *Serratia marcescens* suşları penisilin G, kolistin ve sefalotine intrinsik olarak dirençlidir.

2- Kazanılmış (intrinsik-dışı) direnç: Günümüzde, antibiyotik kullanımının seçici baskısı ile, infeksiyon etkeni olarak en sık karşılaştığımız *Enterobacteriaceae* türlerinin antibiyotiklere yüksek oranda direnç kazandığı görülmektedir. Bu tür antibiyotik direncinin genellikle plazmid kökenli olduğu bilinmektedir.

*Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinin antibiyotik duyarlılıklarının gösterilmesinde çeşitli metodlar kullanılabilir(1,9,10,14). Bunlar:

- 1- Dilüsyon yöntemleri (Makro "tüp" dilüsyon, mikrodilüsyon, agar dilüsyon)
- 2- Diffüzyon yöntemleri (Disk diffüzyon, E test)
- 3- Hızlı, otomatize yöntemler

olarak kısaca özetlenebilir. Son yıllarda, otomatize sistemleri veya hazır mikrodilüsyon yöntemlerini kullanma eğiliminin artmasına rağmen, laboratuvar şartlarına ve izolatlara göre adaptasyon kolaylığı ve diğer yöntemlere kıyasla ucuzluğu nedeniyle disk diffüzyon testi yine geçerliliğini korumaktadır. Mikrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemlerinin avantajları ise, Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değeri gibi kantitatif sonuçların elde edilmesidir. Hızlı, otomatize yöntemler erken sonuç alma olanağını getirmektedir. Ancak, bunun mortalite ve morbidite açısından objektif yararı tartışılmalıdır. Bunun yanı sıra, otomatize sistemlerin, indüklenebilir veya silik direnç mekanizmalarını saptayamadığı da bildirilmektedir. Bu durum, özellikle geniş spektrumlu beta-laktamazlar (ESBL) konusunda sorun yaratmaktadır.

Duyarlılık testinde kullanılacak antimikrobiyal ajanların ve besiyerlerinin seçimi, izlenmesi gereken yöntemin ve duyarlılık sınırlarının (breakpoint) belirlenmesi için tüm dünyada en yaygın olarak kullanılan metodlardan birinin (örneğin: National Committee for Clinical Laboratory Standards "NCCLS" veya British Society for Antimicrobial Chemotherapy "BSAC" metodları) seçilip, tüm uygulamanın buna göre yapılması koşuldur. Ancak, özellikle duyarlılık sınırları ile ilgili konsantrasyonlar yöntemden yöntem ve ülkeden ülkeye değişebildiği için, ülkemize özgü standartların belirlenmesi gerekmektedir.

### Enterobacteriaceae üyeleri için uygulanan klasik yöntemler

#### 1- Dilüsyon (Sulandırım) yöntemleri

Dilüsyon yöntemleri, bir mikroorganizmanın üremesini inhibe eden veya mikroorganizmayı öldüren minimal ilaç konsantrasyonunun belirlenmesi amacı ile kullanılmaktadır. Bu yöntem-

lerde, denenen antibakteriyel ajan, katı veya sıvı besiyerlerine değişen oranlarda katılır. Sonuçta, Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) ve uygun modifikasyonlar ile Minimal Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) değerleri elde edilir.

## 2- Disk diffüzyon testi

Bu test, diske emdirilen antibiyotiğin duyarlılığı araştırılan mikroorganizmanın inokule edildiği besiyerine diffüze olması temeline dayanmaktadır. İnhibisyon zon çapına göre izolatlar, duyarlı, orta duyarlı, dirençli olarak sınıflandırılır. *Enterobacteriaceae* üyelerine karşı denemesi gereken antibakteriyel ajanlar tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. *Enterobacteriaceae* duyarlılık testlerinde seçilen antibakteriyel ajanlar(9).

Ampisilin	Sefuroksim ve sefaklor	Siprofloksasin
Sefazolin	Seftazidim	Trimetoprim/sulfametoksazol
Sefalotin	Sefotaksim	Sadece idrar izolatları için:
Mezlosilin	Amikasin	Norfloksasin
Amoksisilin/klavulanik asit	Gentamisin	Nitrofurantoin
Sefoksitin	Netilmisin	

## 3- E testi

E testi plastik striplere emdirilmiş antimikrobiyal ajanın MİK değerinin saptanabildiği bir diffüzyon testidir. Pahalı olmasına rağmen, disk diffüzyon yönteminin kolaylıklarına sahip olması ve MİK değerlerinin belirlenmesini de sağlaması nedeniyle, *Enterobacteriaceae* duyarlılık testlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca, özellikle *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında geniş spektrumlu beta-laktamaz (Extended spectrum beta-lactamase "ESBL") tanımlanmasında da kullanılabilmektedir.

## Beta-laktamaz aktivitesinin saptanması

Beta-laktamazlar, amid, amidin ve benzeri C-N bağlarını parçalayan enzimlerdir. Beta-laktamaz üretimi, *Enterobacteriaceae* üyelerinin beta-laktam antibiyotiklere direncindeki temel mekanizmadır. Beta-laktamazlar, moleküler yapılarına ve işlevsel özelliklerine göre sınıflandırılırlar (Tablo 2)(2).

Tablo 2. Bakteriyel beta-laktamazlar(2).

Grup	Moleküler sınıf	Substrat	İnhibitör		
			Klav.	EDTA	
1	C	Sefalosporinler	-	-	Kromozomal enzimler, plazmid kökenli AmpC benzeri enzimler (MIR 1, BIL 1)
2a	A	Penisilinler	+	-	Gram pozitif bakterilerin penisilinazları
2b	A	Penisilinler, sefalosporinler	+	-	TEM 1, TEM 2, SHV 1
2be	A	Penisilinler, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler	+	-	TEM 3-26, SHV 1-6
2br	A	Penisilinler, sefalosporinler	±	-	TEM 30-41, TRC 1, İRT 1, İRT 10, İRT 167
2c	A	Penisilinler	+	-	PSE 1, PSE 3, PSE 4
2d	D	Penisilin, kloksasilin	±	+	OXA 1-11
2e		Sefalosporinler	+	-	<i>P.vulgaris</i> 'in indüklebilir beta-laktamazları
2f	A	Penisilin, sefalosporin, karbapenemler	±	-	Serratia Sme 1 enzimi
3	B	Beta-laktamlar, karbapenemler	-	+	<i>S.maltophilia</i> , <i>B.fragilis</i> enzimleri
4	?	Penisilinler	-	?	<i>B.cepacia</i>

Klav. = Klavulanik asit

*Enterobacteriaceae* üyelerinde yaygın olan plazmid kökenli TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 beta-laktamazları, penisilinler ve 1. kuşak sefalosporinleri etkin bir biçimde parçaladıkları halde, sefotaksim, seftazidim ve aztreonam gibi geniş spektrumlu beta-laktamlara kısıtlı etki gösterirler. Sınıf 2be'de yer alan enzimler ise, TEM-1 ve 2, SHV-1 gibi ana enzimlerden 1-4 amino asit değişikliği ile gelişmiş olup geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere etkilidirler ve ESBL olarak adlandırılmaktadırlar(2,11). Gerek parental enzimler ve gerekse bunların geniş spektrumlu mutantları klavulanik asit ile inhibe olmaktadır. Son yıllarda, *E.coli* ve *K.pneumoniae* gibi infeksiyonlardan en sık izole edilen türlerde, yine geniş spektrumlu beta-laktamlara etkili, ancak klavulanata kısmen dirençli TEM benzeri mutantlar bildirilmiştir (2br)(2,5). Bunların yanı sıra, tüm *Enterobacteriaceae* üyelerinde kromozomal sefalosporinazlar bulunmaktadır. Bu enzimler moleküler sınıf C (Grup 1)'de yer alırlar(2,6). Bu enzimlerden bir kısmı indüklenebilir niteliktedir. İndüklenebilir sefalosporinazların bulunduğu türler arasında *E.cloacae*, *C.freundii*, *S.marcescens*, *P.aeruginosa* sayılabilir. Bu türlerde kromozomal grup 1 beta-laktamaz normal olarak düşük düzeyde üretilmekte ancak, beta-laktam antibiyotikler varlığında bu miktar bir kaç yüz katına çıkabilmektedir. Ashında bu durum, zayıf indükleyiciler olan yeni beta-laktam ajanlara dirençte önemli değildir. Ancak, beta-laktamazları indüklenebilir türlerde, sıklıkları az olduğu için rutin duyarlılık testleri ile saptanamayan, sürekli ve yüksek düzeyde enzim üretebilen 'stabil dereprese' mutantlar görülmektedir. Antibiyotik uygulanması sırasında, bu dereprese mutantların seçilmesi tedavi başarısızlığını getirmektedir. Bu nedenle, indüklenebilir beta-laktamaz üretiminin saptanması, klinik açıdan önemlidir.

Beta-laktamaz üretiminin saptanması için kullanılan yöntemler arasında,

- 1- Direkt yöntemler
  - a) Asidometrik
  - b) İyodometrik
  - c) Kromojenik
- 2- İndüklenebilir beta-laktamaz tayini
- 3- ESBL tayini

yer almaktadır.

*Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde direkt yöntemler ile beta-laktamaz enzim varlığının saptanmasının klinik açıdan değeri azdır. *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan türler için, klinik laboratuvarında uygulanan, geçerli yöntemler tablo 3'de verilmiştir. Bu testler de genel olarak, rutin antimikrobiyal duyarlılık yöntemleri ile elde edilen sonuçların kesinleştirilmesi veya araştırma amacı ile yapılmaktadır.

Tablo 3. *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde beta-laktamaz varlığının saptanmasında kullanılan testler.

<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Çift disk sinerji testi ile ESBL tanımlanması	Sefalosporinler ve aztreonam
<i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter spp.</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Providencia spp.</i> <i>Morganella spp.</i> <i>Serratia marcescens</i>	Disk yakınlaştırma desteği ile indüklenebilen beta- laktamaz tayini	Geniş spektrumlu sefalosporinler

## İndüklenebilir kromozomal beta-laktamazların saptanması(1)

### 1- Disk yakınlştırma yöntemi

McFarland 0.5 bulanıklık standardına göre sulandırılan mikroorganizma, uygun agar (DST, Iso-Sensitest, Mueller-Hinton) yüzeyine yayılır. Plak yüzeyi kuruduktan sonra, yüzeye bir sefotaksim diski ve indükleyici olarak da bir sefoksitin veya imipenem diski, aradaki uzaklık sefotaksim inhibisyon zon çapının 2 misli olacak şekilde yerleştirilir. 35°C'de 18 saat inkübe edildikten sonra, sefotaksim diskinin çevresindeki inhibisyon zonunun indükleyici ajana yakın kenarda bir düzleşme göstermesi pozitif sonuç olarak kabul edilir.

### 2- İndükleyici ajanın besiyerine eklenmesi

Mikroorganizma, 0.06 mg/l imipenem içeren ve içermeyen iki besiyeri yüzeyine inoküle edilir. Her iki besiyerine de bir sefotaksim (veya diğer uygun beta-laktam) diski yerleştirilir. Plaklar 35°C'de 18 saat inkübe edildikten sonra sefotaksim zon çapları değerlendirilir. İmpenem içeren besiyerindeki inhibisyon zon çapının, imipenem içermeyen besiyerine kıyasla >3 mm dar olması, indüklenebilir beta-laktamaz varlığını göstermektedir.

### 3- Sefoksitin duyarlılığının değerlendirilmesi

Bazı türler için sefoksitin duyarlılığının da indüklenebilir beta-laktamazlar açısından belirleyici olabileceği öne sürülmektedir. Sefoksitine dirençli *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *H. alvei* ve *S. liquefaciens* türlerinde aynı zamanda indüklenebilir beta-laktamaz varlığı da gösterilmektedir. Oysa ki, sefoksitine duyarlı suşlarda indüklenebilir beta-laktamaz saptanmamaktadır.

### 4- Amoksisilin ve amoksisilin/klavulanat duyarlılığının değerlendirilmesi

Klavulanik asit de indükleyici bir ajan olduğu için, mikroorganizmanın amoksisiline duyarlı olduğu halde amoksisilin/klavulanata dirençli olması, indüklenebilir enzimlerin varlığını düşündürmektedir.

## ESBL varlığının saptanması

Rutin disk diffüzyon ve dilüsyon yöntemleri ile ESBL üreten suşların saptanabilmesi her zaman mümkün olmamaktadır. Bu açıdan, duyarlılık sınırları ile ilgili kriterler önem taşımaktadır. BSAC yönteminde seftazidim ve sefotaksim için öngörülen duyarlılık sınırları 2 ve 1 mg/l iken, NCCLS yönteminde bu sınırlar, duyarlı suşlar için <8 mg/l (her iki antibiyotik), orta duyarlı suşlar için 16 mg/l (seftazidim) ve 16-32 mg/l (sefotaksim), dirençli suşlar için ≥32 mg/l (seftazidim) ve ≥64 mg/l (sefotaksim) olarak belirtilmiştir(1,10). ESBL aktivitesi gösteren TEM ve SHV mutantları için NCCLS yönteminin duyarlılık sınırları oldukça yüksektir ve bu enzimleri taşıyan suşlar NCCLS yöntemiyle geniş spektrumlu beta-laktamlara duyarlı bulunabilmektedir. Bu nedenle, 3. kuşak sefalosporinlere veya aztreonama duyarlılıkta en ufak bir azalma uyarıcı olmalıdır. İndüklenebilir beta-laktamazların aksine 2be grubundaki ESBL'lar beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır. İn-vitro olarak bu enzimlerin varlığının gösterilmesinde de bu özelliklerinden faydalanılmaktadır.

### 1- Çift disk sinerji testi(4)

Mikroorganizma uygun besiyeri yüzeyine yayılır. Sefotaksim veya seftazidim gibi bir üçüncü kuşak sefalosporin diski besiyeri yüzeyine yerleştirilir. Bu diskden 30 mm uzaklığa da beta-laktamaz inhibitörü içeren bir disk, örneğin amoksisilin/klavulanat (AMC) diski yerleştirilir. 35°C'de 18 saat inkübasyondan sonra, her iki ajanın da diffüze oldukları bölgede, yani AMC diskine yakın kenarda sefotaksim inhibisyon zon çapının genişlemesi ESBL varlığını düşündürür.

Thomson ve Sanders(13), çift disk sinerji testini modifiye ederek 3 boyutlu hale getirmişler ve böylelikle duyarlılığını arttırmışlardır.

## 2- Sefotaksim ve seftazidim gibi beta-laktam ajanlar ve bunların klavulanik asit ile kombinasyonu kullanılarak MİK değerlerinin saptanması

ESBL üreten suşların MİK değerleri sadece beta-laktam ajan ile elde edilene göre düşük bulunmaktadır. Ancak, son yıllarda, başta *E.coli* olmak üzere çeşitli *Enterobacteriaceae* türlerinde TEM-1 enziminden köken alan ve beta-laktamaz inhibitörlerine ana enzime kıyasla dirençli olan beta-laktamazlar tariflenmiştir (Grup 2br)(5). TEM-1 enziminde 69. pozisyonundaki metiyonin yerine lösin, izolösin, valin gibi alifatik, hidrofobik bir amino asidin gelmesi klavulanata direnç yol açmaktadır. Bu şekilde, izoelektrik noktaları TEM-1'e benzer şekilde 5.2-5.4 olan 11 yeni enzim (TEM 30-41; IRT 1-10, 167) bildirilmiştir.

Bu konudaki ikinci bir sorun ise, beta-laktam/klavulanik asit kombinasyonlarına duyarlılığının incelenmesinde izlenen yöntemlerin standart olmamasıdır. Genel olarak iki yöntem bildirilmektedir(12):

1- Klavulanik asit konsantrasyonu 2 veya 4 mg/l olacak şekilde sabit tutulup, beta-laktam antibiyotik düzeyinin değiştirilmesi.

2- Hem beta-laktam hem de klavulanat düzeylerinin değiştirilmesi, ancak oranlarının 2:1 olacak şekilde sabit tutulması.

Bunları kıyaslamak amacı ile amoksisilin/klavulanik asit MİK değerlerinin araştırıldığı bir çalışmada, iki yöntem ile elde edilen sonuçlar arasında önemli ölçüde fark bulunabildiği, sabit klavulanat düzeyi kullanılmasının özellikle 2br grubundaki suşların saptanabilmesi açısından daha uygun olduğu bildirilmektedir(12).

## Antibiyotik duyarlılığının saptanmasında moleküler yöntemler

Son yıllarda *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde pek çok direnç geni tanımlanmış ve bunların ayırdedilmesi amacıyla DNA problemleri ve PCR analizleri geliştirilmiştir. Böylece, antibiyotik direnç genlerinin kaynakları, hastane ve toplumda yayılımları araştırılabilmekte, yeni mutasyonlar tanımlanabilmektedir.

### 1- Beta-laktamaz genlerinin saptanması

TEM, SHV, OXA beta-laktamazlarının saptanması için çeşitli DNA problemleri ve PCR primer setleri geliştirilmiştir. *Klebsiella pneumoniae* ve diğer ESBL üreten *Enterobacteriaceae* türlerinin etken olduğu nozokomial enfeksiyonların sıklığı giderek artmaktadır. Bu nedenle, bu enzimlerin tanımlanması ve sınıflandırılmasında kullanılacak yeni yöntemlere gerek duyulmaktadır. *blaTEM* genleri, nükleotid dizilerinin oligonükleotid problemler ile hibridizasyon yöntemiyle saptanması sonucunda, alt gruplara ayrılmaktadır(7,8). Özellikle klavulanata dirençli mutantların tanımlanmasında nükleotid dizilerinin saptanması gerekmektedir(5). Bu yöntem, yeni beta-laktamazların saptanmasında izoelektrik odaklama yöntemine kıyasla daha duyarlıdır ve antibiyotik dirençliliği ile ilgili epidemiyolojik çalışmaların yer aldığı referans laboratuvarları için önerilmektedir.

### 2- Kloramfenikol asetiltransferaz (CAT) genlerinin saptanması

Gram negatif mikroorganizmalarda bulunan *cat I*, *cat II*, *cat III* genlerinin saptanması için DNA problemleri geliştirilmiştir.

### 3- Trimetoprim direncinin saptanması

*dhfr* genlerinin saptanması için PCR ve hibridizasyon yöntemleri kullanılmaktadır.

Antimikrobiyal ajanlara direnç, *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde giderek yaygınlaşmaktadır. Mikrobiyoloji laboratuvarlarına uygun test yöntemlerini seçmek ve bunların sonuçlarını bildirmek sureti ile, bu direnç problemini izleme ve kontrol etme görevi düşmektedir. Bu

sorumluluk nedeniyle, duyarlılık test yöntemleri şartlara uygun olarak yenilenmeli ve kalite kontrolü yöntemleri ile değerlendirilmelidir.

#### KAYNAKLAR

- 1- British Society for Antimicrobial Chemotherapy: A guide to susceptibility testing, *J Antimicrob Chemother* 37(Suppl D):1 (1991).
- 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- Farmer JJ: Enterobacteriaceae: introduction and identification, "Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 6.baskı" kitabında s.438, ASM Press, Washington (1995).
- 4- Jarlier V, Nicolas MM, 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).
- 5- Knox JR: Extended spectrum and inhibitor resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity and three-dimensional structure, *Antimicrob Agents Chemother* 39:2593 (1995).
- 6- Lindberg F, Lindquist S, Normark S: Genetic basis of induction and overproduction of chromosomal Class I beta-lactamase in non-fastidious Gram negative bacilli, *Rev Infect Dis* 10:782 (1988).
- 7- Mabilat C, Courvalin P: Development of oligotyping for characterization of molecular epidemiology of TEM beta-lactamases in Enterobacteriaceae, *Antimicrob Agents Chemother* 34:2210 (1990).
- 8- Mabilat C, Goussard S: PCR detection and identification of genes for extended spectrum beta-lactamases, "Persing DH, Smith TF, Tenover FC (eds): *Diagnostic Medical Microbiology, Principles and Applications*" kitabında s.553, ASM Press, Washington (1994).
- 9- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard M2-A5*, NCCLS, Villanova (1993).
- 10- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard M7-A3*, NCCLS, Villanova (1993).
- 11- Philippon A, Arlet G, Lagrange PH: Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13(Suppl 1):17 (1994).
- 12- Thomson CJ, Miles RS, Amyes SGB: Susceptibility testing with clavulanic acid: fixed concentration versus fixed ratio, *Antimicrob Agents Chemother* 39:2591 (1995).
- 13- Thomson KS, Sanders CC: Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three dimensional tests, *Antimicrob Agents Chemother* 36:1877 (1992).
- 14- Woods GL, Washington JA: Dilution and disk diffusion methods, "Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 6.baskı" kitabında s.1327, ASM Press, Washington (1995).