

GRAM NEGATİF ÇOMAKLARDA İNDÜKLENEBİLİR BETA-LAKTAMAZ BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Özden BÜYÜKBABA, Handan KATRANCI, Yaşar NAKİPOĞLU,
Şengül DERBENTLİ

ÖZET

Laboratuvarlarda rutin olarak uygulanan, antimikrobiyal duyarlılık deneyleri indüklenabilir beta-laktamaz (İBL) oluşturan bakterilerin sahip olduğu potansiyel direnci doğru olarak yansıtmamaktadır.

Bu çalışmada hastane ortamından izole edilen 60 *Enterobacter* (34 *E.aerogenes*, 16 *E.agglomerans*, 10 *E.cloacae*), 50 *Pseudomonas* (36 *P.aeruginosa*, 14 *Pseudomonas* spp.) suşu indikatör olarak kullanılarak, İBL'lerin belirlenmesinde önerilen çift disk indüksiyon yöntemi ile, indükleyici içeren besiyerinde indüksiyon yönteminin değeri araştırılmıştır.

Enterobacter suşları için hem çift disk, hem de indükleyici içeren besiyerinde indüksiyon yöntemi ile paralel sonuçlar alınmış, suşların sadece %45'inde İBL belirlenmiştir. *Pseudomonas* suşlarının çift disk yöntemi ile %34'ünde, indükleyici içeren besiyerinde indüksiyon yöntemi ile %46'sında İBL varlığı gösterilmiş, iki yöntemin sonuçları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$).

Çalışma sonuçlarımız İBL'lerin belirlenmesi için önerilen deneylerin duyarlı ve birbirine üstün olmadığını; Gram negatif çomakların doğru tanısı ile bakterinin İBL oluşturduğuna kesin delil sağlanacağı dikkate alınarak, bu bakterilerin cins ve tür düzeyinde tanımlanması gerektiğini; ancak identifikasyon yapılamayan laboratuvarlarda bu yöntemlerden düşük oranda da olsa yararlanılabileceğini göstermiştir.

SUMMARY

Evaluation of methods used in the determination of inducible beta-lactamase in Gram negative rods.

Antimicrobial sensitivity tests used routinely in laboratories, do not correctly show the potential resistance of inducible beta-lactamase (IBL) producing bacteria.

In this study 60 *Enterobacter* (34 *E.aerogenes*, 16 *E.agglomerans*, 10 *E.cloacae*), 50 *Pseudomonas* (36 *P.aeruginosa*, 14 *Pseudomonas* spp.) strains isolated from the hospital environment were used as the indicator to evaluate two methods proposed for identifying IBL, namely the induction method in inducer containing medium, and the double disk induction method.

For the *Enterobacter* strains, parallel results were obtained in both of these methods, and IBL were found in only 45% of the strains. IBL presence was demonstrated in 34% of the *Pseudomonas* strains with the double disk induction method, and 46% of the *Pseudomonas* strains with the induction method in inducer containing medium. It was determined that the difference between the results obtained by the two methods was not statistically significant ($p>0.05$).

Results of our study showed that the two methods proposed for the determination of IBL were neither more sensitive nor better than each other. Considering that the certainty with which bacteria produce IBL will be determined with correct identification of Gram negative rods, it will be necessary to identify the bacteria to the level of genus and species. However in laboratories where identification can not be made, it is possible that these methods may be useful.

GİRİŞ

Gram negatif çomaklar için beta-laktam antibiyotiklere dirençte en önemli yol beta-laktamaz oluşturmaktır. Beta-laktamaz enzimlerini periplazmik aralığa salgılayan Gram negatif bakteriler, ekstrasellüler beta-laktamaz üreten ve bu nedenle antibiyotikleri henüz PBP'lere ulaşmadan hidrolize etmek zorunda olan Gram pozitif bakterilere göre daha az enzim oluşturarak daha yüksek düzeyde beta-laktam direnci kazanmaktadır.

Beta-laktamazlar Bush tarafından Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerce oluşturulma, kromozom veya plazmid kaynaklı olma, farklı beta-laktam moleküllerini hidrolize etme, beta-laktamaz inhibitörleri ile inhibe edilip edilmeme özellikleri ile, molekül ağırlıkları ve izoelektrik noktaları dikkate alınarak 1, 2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2e, 2f, 3 ve 4 olarak sınıflandırılmıştır. Ambler sınıflandırmasında ise, beta-laktamaz enzimleri aminoasit sıralarına göre, A, B, C, D, olarak gruplandırılmıştır (5,19).

Bush sınıflandırılmasında 1.gruba giren sınıf C beta-laktamazları, *ampC* geni tarafından kodlanan, genellikle düşük düzeyde sentez edilen konstitütif enzimlerdir. *Enterobacter* spp., *C.freundii*, *Serratia* spp., *M.morganii*, indol pozitif *Proteus* spp., *P.stuartii*, *P.rettgeri*, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp.'de kromozomal *ampC* geni indüklenbilir özelliktedir. Sefalosporinazlar olarak da adlandırılan grup I enzimler sefaloridin ve sefalotini penisilinlerden daha hızlı hidrolize etmekte, klavulanik asit ve sulbaktam ile zayıf olarak inhibe edilmektedir (4).

Bu enzimler bir indükleyici ile karşılaştıklarında 1-20 dakika sonra sentezlenen, miktarı indükleyicinin yoğunluğuna ve induksiyon süresine bağlı olarak bazal değerinin 700 katı kadar artabilen enzimlerdir. Beta-laktam antibiyotikler, beta-laktamaz enzimi ile hidrolize dirençleri ve enzim sentezini indüklemeleri bakımından farklılık gösterirler. Stabil güçlü indükleyiciler enzim sentezini güçlü bir şekilde indüklerken, bu enzim tarafından hidrolize edilmezler. Bu nedenle, bu gruptaki antibiyotiklerden imipenem *Enterobacter* ve *Pseudomonas* gibi indüklenbilir beta-laktamaz oluşturan türlere etkilidir. Labil-güçlü indükleyiciler bakterideki enzim sentezini indüklemekte ve indükledikleri enzimler tarafından hidrolize edilmektedir. Benzil penisilin, ampisilin ve I. kuşak sefalosporinlerin çoğunluğu bu grupta yer alır. İndüklenbilir beta-laktamaz oluşturan Gram negatif çomaklar bu antibiyotiklere daima dirençlidir. Karbenisilin gibi stabil zayıf indükleyiciler enzim sentezini indüklemekte ve enzim fazla miktarda sentezlense bile bakteriyi koruyamamaktadır. II. ve III. kuşak sefalosporinler, üreidopenisilinler ve monobaktamlar labil-zayıf indükleyicilerdir (9,16,18,24).

İndüklenbilir beta-laktamaz direncinde önemli bir yol da, spontan mutasyon sonucunda stabil dereprese mutant hücrelerin ortaya çıkmasıdır. Bu tür mutantların indüklenbilir beta-laktamaz sentezleyen bakteri populasyonlarında meydana gelme olasılığı 10^{-5} - 10^{-8} 'dir. Konstitütif beta-laktamaz sentezleyen türlerde de bu tür mutasyonlar görülebilmektedir. Ancak bunlarda mutasyon olasılığı 10^{-16} - 10^{-18} 'dir.

İndüklenebilir beta-laktamaz sentezleyen ve az sayıda dereprese mutant içeren bir bakteri popülasyonu, labil-zayıf indükleyicilerle karşılaştığında, hücrelerin çoğu yeterli miktarda enzim sentezleyemediği için ölürken, stabil dereprese mutant hücreler seleksiyona uğrar ve bakteri popülasyonuna hakim olur. Bu durum tedavide başarısızlığın yanısıra, stabil dereprese mutantların hastane mikroflorasına yerleşerek hastane infeksiyonları yönünden de sorunlar yaratmasına neden olur (16,17,19).

Bugün uygulanan antimikrobiyal duyarlılık deneyleri indüklenebilir beta-laktamaz oluşturan bakterilerin sahip olduğu potansiyel direnci doğru olarak yansıtmamaktadır. Bu enzimlerin gösterilmesi için geliştirilen yöntemlerin duyarlılığı azdır. Bu nedenle indüklenebilir beta-laktamazların saptanmasında en güvenilir yolun bakterilerin doğru identifiye edilmesi olduğu bildirilmektedir (28). Bu çalışma laboratuvarımızda identifiye edilen *Enterobacter* ve *Pseudomonas* suşları indikatör olarak kullanılarak, indüklenebilir beta-laktamazların belirlenmesinde önerilen iki farklı yöntemin duyarlılığını karşılaştırmak amacı ile planlanmıştır. Ayrıca antibiyotik direnç profillerine bakılarak, dereprese mutant suşların belirlenmesine çalışılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Epidemik hastane infeksiyonlarının araştırılması amacı ile hastane ortamından alınan örneklerden izole edilen 60 *Enterobacter* ve 50 *Pseudomonas* suşunda, çift disk indüksiyon yöntemi ve indükleyici içeren besiyerinde indüksiyon yöntemi uygulanarak indüklenebilir beta-laktamazlar araştırılmıştır.

Enterobacter suşları klasik tanı yöntemleri ve/veya API-20 E ile tür düzeyinde tanımlanmıştır.

Tümü pigmentli olan *Pseudomonas* suşları içindeki piyosiyanın oluşturan suşlar *P.aeruginosa* olarak adlandırılmıştır.

İndüklenebilir beta-laktamazların araştırılması:

1 - Çift disk indüksiyon yöntemi: Bu amaçla NCCLS disk difüzyon yöntemi standartlarına uyularak, suşlar Mueller-Hinton besiyerine yayılmış, sefotaksim (30 µg) diski ve indükleyici olarak imipenem (10 µg) diski, aralarındaki uzaklık 20 mm olacak şekilde besiyerinin yüzeyine yerleştirilmiştir. 35°C'de 18 saatlik inkübasyondan sonra sefotaksim diski çevresindeki inhibisyon zonunun imipenem diskine yakın kenarda düzleşmesi, suşun indüklenebilir beta-laktamaz oluşturduğunu göstermiştir (3,21).

2 - İndükleyici içeren besiyerinde indüksiyon yöntemi: Suşlar 0.06 mg/l imipenem içeren ve içermeyen Mueller-Hinton besiyerlerine NCCLS standartlarına uyularak yayılmış ve her iki besiyerine de sefotaksim (30 µg) diski yerleştirilerek 35°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. İmipenem içeren besiyerindeki sefotaksim inhibisyon zon çapının, imipenem içermeyen besiyerine göre en az 3 mm daralması, indüklenebilir beta-laktamaz varlığı olarak değerlendirilmiştir (3,21). Literatürde önerildiği şekilde 0.06 mg/l imipenem içeren besiyerinde duyarlı suşların ürememesi nedeni ile, deney bu suşlar için 0.05 mg/l imipenem içeren besiyerlerinde tekrarlanmıştır.

Dereprese mutantların araştırılması:

Çalışma kapsamına alınan suşlar içindeki dereprese mutantları belirleyebilmek amacıyla, ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamases) oluşturup oluşturmadıkları araştırılmıştır. NCCLS standartlarına uyularak suşların yayıldığı Mueller-Hinton besiyerleri üzerine, *Enterobacter* spp. için sefepim diski, amoksisilin-klavulanik asit diski ile aralarında 20 mm ve *Pseudomonas* spp. için seftazidim diski, amoksisilin-klavulanik asit diski ile aralarındaki uzaklık 30 mm olacak şekilde yerleştirilmiştir (29).

ESsBL (Extended Spectrum secondary Beta-Lactamases)'lerin varlığı hakkında ipucu elde edebilmek amacı ile suşların piperasilin, seftazidim, sefoperazon, seftriakson, sefotaksim, aztreonam, imipenem dirençleri disk difüzyon yöntemi ile incelenmiştir (18). Ayrıca yüksek beta-laktam direnci gösteren suşlarda, direncin permeabilite azalmasına bağlı olup olmadığını belirlemek için, aminoglikozitlerden gentamisin ve amikasin, kinolonlardan siprofloksasine direnç de araştırılmıştır.

BULGULAR

Enterobacter suşlarının indikatör olarak kullanıldığı deneylerde; suşların sadece %45 (27/60)'inde hem çift disk indüksiyon yöntemi ve hem de indükleyici içeren besiyerinde indüksiyon yöntemi ile indüklenebilir beta-laktamaz varlığı gösterilmiştir. *Pseudomonas* suşlarında ise çift disk indüksiyon yöntemi ile %34 (17/50)'ünde, indükleyici içeren besiyerinde indüksiyon yöntemi ile %46 (23/50)'sında İBL saptanabilmiş, iki yöntemin sonuçları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 1).

Tablo 1. *Enterobacter* ve *Pseudomonas* suşlarında iki farklı yöntem ile indüklenebilir beta-laktamazların belirlenmesi.

Bakteri	Çift disk indüksiyon yöntemi	İndükleyici içeren besiyerinde indüksiyon yöntemi
<i>E.aerogenes</i> (n:34)	15	15
<i>E.agglomerans</i> (n:16)	7	7
<i>E.cloacae</i> (n:10)	5	5
Toplam (n:60)*	27(%45)	27(%45)
<i>P.aeruginosa</i> (n:36)	15	20
<i>Pseudomonas</i> spp. (n:14)	2	3
Toplam (n:50)	17(%34)	23(%46)

*: Tüm suşlar sefoksitine dirençli, imipeneme duyarlı bulunmuştur.

Dereprese mutantları belirleyebilmek amacıyla yapılan deneylerde, suşlardan hiçbirinin ESBL oluşturmadığı belirlenmiştir. Ayrıca ESsBL oluşumu hakkında ipucu elde edebilmek için suşların çeşitli beta-laktam antibiyotiklere direnci belirlenmiş, elde edilen sonuçlar ESsBL oluşturmadıkları fikrini vermiştir. Beta-laktam direncinin hücre duvarı permeabilitesinin azalmasına bağlı olup olmadığını saptamak amacı ile gentamisin, amikasin ve siprofloksasin direnci de araştırılmış, sonuçlar tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. İncelenen *Enterobacter* ve *Pseudomonas* suşlarında çeşitli antibiyotiklere direnç*.

Bakteri	PRL	FOX	CAZ	CTX	CRO	CFP	CFP/ Sul	FEP	ATM	IMP	GN	AK	CIP	ESBL
<i>Enterobacter</i> spp. (n:60)	4	60	0	0	0	0	0	0	0	0	6	4	0	0
<i>Pseudomonas</i> spp. (n:50)	1	50	0	44	28	3	1	0	5	0	4	2	1	0

* Orta duyarlı suşlar da dirençli kategorisine alınmıştır.

PRL: Piperasilin, FOX: Sefoksitin, CAZ: Seftazidim, CTX: Sefotaksim, CRO: Seftriakson, CFP: Sefoperazon.

CFP/Sul: Sefoperazon / Sulbaktam, FEP: Sefepim, ATM: Aztreonam, IMP: İmipenem, GN: Gentamisin,

AK: Amikasin, CIP: Siprofloksasin

Piperasiline dirençli ikişer *E.aerogenes* ve *E.cloacae* suşunda diğer geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere direnç görülmemesi, bu suşların kromozomal (indüklenebilir) beta-laktamazın yanısıra TEM-1/2 veya SHV-1 enzimlerini birlikte ürettiğini göstermiştir. *Enterobacter* suşlarında dereprese beta-laktamaz üretimine rastlanmamıştır.

İncelenen *Pseudomonas* suşlarında da kromozomal beta-laktamazın derepresyonunu gösteren bir bulguya rastlanmamıştır. Ancak bazı geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere orta derecede duyarlılık saptanan iki *P.aeruginosa* (No.1,2) suşunda indüklenebilir beta-laktamaza ek olarak intrinsek beta-laktam direncinin, bu direnç modelini ortaya çıkardığı sonucuna varılmıştır. *P.aeruginosa* suşları içinde en yüksek dirence sahip olan bir suşun (No.3) ise; gösterdiği direnç modeline bakılarak, kromozomal indüklenebilir beta-laktamazın yanısıra PSE-1 veya PSE-4 enzimlerine sahip olduğu düşünülmüştür. Ayrıca bu suşta gentamisin, amikasin ve siprofloksasin direncinin görülmesi, beta-laktamlara direncin permeabilite azalmasından da kaynaklanabileceği fikrini vermiştir (Tablo 3).

Tablo 3. İncelenen diğer *Pseudomonas* suşlarına göre daha yüksek beta-laktam direnci gösteren üç *P.aeruginosa* suşunun direnç modeli.

Suş	PRL	CAZ	CFP	CFP/ Sul	CRO	FEP	ATM	IMP	GN	AK	CIP
No.1	Du	Du	O	O	O	Du	O	Du	Du	Du	Du
No.2	Du	Du	O	Du	O	Du	O	Du	Du	Du	Du
No.3	Di	Du	Di	Di	O	Du	O	Du	Di	Di	Di

Du: Duyarlı, O: Orta duyarlı, Di: Dirençli

TARTIŞMA

Enterobacteriaceae ailesinde plazmid kökenli TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 beta-laktamazları yaygın olarak bulunur. Bu beta-laktamazlar penisilinler ve I. kuşak sefalosporinleri etkin bir şekilde parçaladıkları halde, geniş spektrumlu beta-laktamlara sınırlı etki gösterirler. Bu ana enzimlerden 1-4 amino asit değişikliği ile meydana gelen ve ESBL olarak adlandırılan enzimler ise geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere etkilidirler. Hem ana enzimler, hem de bunların geniş spektrumlu türevleri, klavulanik asit ile inhibe olurlar (3,5,15,22). Ayrıca

Enterobacteriaceae ailesindeki bazı türlerde bulunan kromozomal tip-1 beta-laktamazlar (sefalosporinazlar) indüklenebilir özelliindedir (16). Klonlama çalışmaları, kromozomal tip-1 beta-laktamaz indüksiyonunda, *ampR*, *ampC* ve *ampD* olarak adlandırılan üç genin rol oynadığını göstermiştir. Beta-laktamazı kodlayan *ampC* geni doğadan izole edilen suşlarda düşük ve belirli bir düzeyde beta-laktamaz üretimini sağlar ve böyle bir suшта *ampD* geni proteini, *ampR* geni proteinini inaktive eder. Eğer *ampD* geni bir mutasyonla inaktive olursa, beta-laktamaz geni çok etkin biçimde kullanılır ve 150-1000 kat daha fazla beta-laktamaz oluşturulur. Bu aktivasyon *ampR* geninin ürünü olan protein aracılığı ile olur. Bu protein DNA'ya muhtemelen promotör-operatör bölgesinden bağlanır ve bir aktivatör görevi yapar (20,32). Bu genler *Enterobacteriaceae* ailesinin tüm üyelerinde bulunmaz. Örneğin *E.coli*'de *ampC* ve *ampD* genleri vardır, ancak *ampR* kaybolmuştur. *Salmonella*'larda ise *ampC* geni eksiktir. Düzenleme ve indüksiyon süreci için gerekli tüm genler, *C.freundii*, *Enterobacter* spp., *P.vulgaris*, *S.marcescens*, *M.morganii* ile *Pseudomonas* spp.'de bulunur (18,20,32). Bu bakterilerin tür düzeyinde doğru olarak tanımlanmasının İBL varlığının gösterilmesinde en doğru yol olduğu bildirilmektedir (8,28). Çünkü rutin uygulanan antimikrobiyal duyarlılık deneyleri İBL'ların substratları üzerine etkilerinin yavaş olması nedeni ile, İBL oluşturan bakterilerin sahip olduğu potansiyel direnci doğru olarak yansıtmamakta, yoğun ve yetersiz laboratuvar koşullarında suşların hatalı idantifikasyonu da İBL'ların belirlenmesinde problemlere neden olabilmektedir. Bu nedenlerle bazı indüksiyon deneyleri tarif edilmiştir (3,28). Bunlardan çift disk indüksiyon deneyinin duyarlılığının %80 olduğu, ancak bu deneyde indükleyici disk ile, labil-zayıf indükleyici disk arasında 15 mm ve 20 mm'lik iki aralığın ayrı ayrı kullanılması ile bu oranın %90'a çıktığı bildirilmiştir (18).

Çalışmamızda çift disk indüksiyon yöntemi ve indükleyici içeren besiyerinde indüksiyon yöntemleri ile 60 *Enterobacter* suşunun 27'sinde (%45) İBL oluşumu belirlenebilmiş, iki yöntemin sonuçları arasında fark gözlenmemiştir. İncelenen 50 *Pseudomonas* suşunun 17'sinde (%34) çift disk indüksiyon yöntemi ile, 23 (%46)'ünde indükleyici içeren besiyerinde indüksiyon yöntemi ile İBL varlığı gösterilebilmiştir ($p>0.05$).

Gülây ve ark. (12)'nin yaptığı bir çalışmada klinik örneklerden izole edilen 150 *P.aeruginosa* suşunun çift disk indüksiyon yöntemi ile ancak 92 (%61.3)'ünde İBL varlığı belirlenmiştir.

Ramadan ve ark. (24) ise çift disk indüksiyon yöntemi ile *E.cloacae* suşlarının %80'inde, *Pseudomonas* suşlarının %40'ında İBL saptamışlardır.

Benzil penisilin, ampicilin ve çoğu I. kuşak sefalosporinler, tip-1 kromozomal beta-laktamazların indükleyicisidir. Ancak imipenem ve sefoksitin çok küçük miktarları bile bu enzimin üretimini güçlü bir şekilde indüklediğinden, çalışmamızda, İBL'ların belirlenmesinde uygulanan her iki farklı yöntemde indükleyici olarak imipenem kullanılmıştır (11,24).

İBL üreten bakterilerle gelişen infeksiyonlarda karbapenemlerin ve alfa-metoksisefalosporinlerin, diğer beta-laktam antibiyotiklerle birlikte kullanılması hem tedavide başarısızlıklara, hem de bu bakteri popülasyonu içinde İBL'ı yüksek oranda sentezleyen bir subpopülasyonun yani dereprese mutantların seleksiyonuna neden olmaktadır (1,2,7,14,27). Dereprese mutantların seleksiyonunda, infeksiyon yerindeki bakteri yoğunluğu ve bu bölgeye ulaşan antibiyotik miktarı önemli etkenlerdir. Seleksiyonun geniş spektrumlu sefalosporinlerle tedavi edilen enterobakteremi olguları ile *Enterobacter* pnömonilerinin %20'sinde meydana gelebileceği

gösterilmiştir (7). İdrar yolu infeksiyonlarında ise geniş spektrumlu sefalosporinler kullanıldığında seleksiyonun minimal olduğu, çünkü infeksiyon yerinde dereprese mutantların inaktivasyonu için gereken MİK'dan daha fazla antibiyotik bulunduğu bildirilmiştir (27).

Yeni sefalosporinlerin yaygın kullanımı nozokomiyal patojenler olarak *Enterobacter* ve *Pseudomonas*'ların önemini giderek arttırmıştır. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde bu bakterilerle kontamine olmuş sulardan ve çeşitli objelerden horizontal bulaşma sonucunda, sıklıkla nozokomiyal *Enterobacter* ve *Pseudomonas* infeksiyonu epidemileri görülmektedir (23,24). Bu nedenlerle tedavi öncesinde İBL oluşturan bakterilerin belirlenmesi önemlidir. Çalışmamızda nozokomiyal infeksiyon epidemilerinin araştırılması amacı ile hastane ortamı ve gereçlerinden izole edilen *Enterobacter* ve *Pseudomonas* suşları ile çalışılmıştır.

Sefoksitin direncinin *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp. ve *C.frendii* suşlarının karakteristik özelliği olduğu, buna karşılık *Morganella*, *Providencia* ve *Serratia* türlerinin sefoksitine orta duyarlı olduğu bildirilmektedir (18). Çalışmamızda incelenen tüm *Enterobacter* suşları sefoksitine dirençli bulunmuştur.

İBL oluşturan suşların sefepim, sefpirom ve imipenem duyarlı olduğu, bu durumun belirtilen antibiyotiklerin bakteri hücre duvarından hızlı bir şekilde geçmesine bağlı olduğu bildirilmektedir (19). Çalışmamızda da tüm *Enterobacter* ve *Pseudomonas* suşları imipenem ve sefepime duyarlı bulunmuştur.

İBL'ların beta-laktam antibiyotiklere iki farklı yoldan direnç sağlayabileceği bildirilmiştir (9,16,26). Bunlardan birincisi, bakteri hücresinin periplazmik boşluğunda bulunan enzimin, klasik olarak beta-laktam antibiyotiğe bağlanarak antibiyotiği hidrolize etmesidir. İkinci direnç mekanizmasında ise, antibiyotiğin tuzaklanması söz konusudur. Tip-I kromozomal beta-laktamazlar III. kuşak sefalosporinlere ve diğer beta-laktamaza dirençli beta-laktamlara yüksek afinite gösterir. Bu nedenle enzim, substrat olmayan veya zayıf substrat olan antibiyotiklerle birleşerek uzun süre ayrılmayan kompleksler oluşturur ve bu tuzaklama mekanizması antibiyotiğin inaktivasyonu ile sonuçlanır. Ayrıca enzim düzeyinin artması, antibiyotiğin hedef proteinlere ulaşmasını en aza indireyen veya yok eden bir non-hidrolitik bariyer etkisi de yaratmaktadır (25,26).

Bu iki direnç mekanizmasından farklı olarak porin proteinlerinde meydana gelen mutasyonlar dış membran permeabilitesinin değişimine neden olmakta, bunun sonucunda da beta-laktam antibiyotiklerin yanısıra aminoglikozidler, kinolonlar, tetrasiklinler ve kloramfenikole direnç meydana gelmektedir (19,24). Dış membran permeabilitesindeki değişimler, yeni beta-laktam antibiyotiklerle tedavi sırasında meydana gelen direnç tiplerinden biridir ve çok önemlidir. Çünkü bu direnç, beta-laktamaz indüksiyonu ile ortaya çıkan dirence benzemez. Farklı olarak, beta-laktamlar ve aminoglikozidler arasında çapraz dirence yol açar (24,26). Çalışmamızda incelenen *Enterobacter* ve *Pseudomonas* suşlarında bu tür çapraz direnç modeli gösteren suş belirlenmemiştir.

Dereprese mutant suşlar ESBL ve ESsBL oluşturmamaları, imipenem duyarlı, buna karşın sefotaksim, seftazidim ve aztreonamdan en az birine dirençli olmaları ve dış membran permeabilitesinin değişimine bağlı dirence sahip olmalarını gibi özellikleri ile tanımlanabilir.

ESsBL'lar dört sınıfta toplanmaktadır (18):

Sınıf A: Az rastlanır PER-1 beta-laktamazını içerir. Bu enzimi taşıyan *P.aeruginosa* suşlarında, seftadizime direnç, seftadizim-klavulanata duyarlılık ve piperasiline azalmış duyarlılık saptanır.

Sınıf B: Karbapenemaz aktivitesi göstermeleri başlıca karakteristikleridir. Bazı *P.aeruginosa* ve *S.marcescens* suşları tarafından taşınan IMP-1 enzimi bu sınıfa girer. Bu enzimi taşıyan suşlar imipenem ve meropeneme dirençli, aztreonama duyarlıdır. Bu özellikleri herhangi bir beta-laktamaz inhibitörünün varlığında değişmez.

Sınıf C: *Enterobacter* spp. ve *E.coli*'de bulunur. Bu enzimleri (MIR-1, CMY-2, BIL-1....) taşıyan suşlar, dereprese *Enterobacter* suşlarının antibiyogram sonucuna benzer özellik gösterirler. Karbapenemler dışında tüm beta-laktamlara ve sefamisinlere (Örn: sefoksitin) dirençli, temosilin ve mesilinama duyarlıdır. Beta-laktam dirençleri klavulanat ve sulbaktamla değişmez.

Sınıf D: *P.aeruginosa* suşlarından soyutlanan OXA-10 (PSE-2), OXA-11 enzimlerini içerir. OXA-10 sefoperazona yüksek düzeyde dirence, aztreonam, sefotaksim ve seftriaksona duyarlılığın azalmasına neden olur.

Çalışmamızda incelenen ve hiçbirinde ESBL üretimi belirlenmeyen suşlarda, ESsBL oluşumu gösteren bir direnç fenotipine de rastlanmamıştır. Bunların yanı sıra geniş spektrumlu beta-laktam direncinin de görülmemesi, bu suşlarda beta-laktamaz üretiminin dereprese olmadığını göstermiştir.

Avrupa ve Amerika'da yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen *Enterobacter* suşları içinde dereprese mutantların oranının %30-50 arasında olduğu, 10 yıl öncesinde ise bu oranın sadece %10 olduğu bildirilmiştir (14). Atina'da bir hastanede hastalardan izole edilen *E.cloacae* suşlarında derepresyon sıklığı %70 (31), Connecticut'da bir hastanede ise bu oran %5 olarak saptanmıştır (10).

Gür ve ark. (13) hastalardan izole edilen ve yeni kuşak sefalosporinlere direnç gösteren 15 *Enterobacter* suşundan 13'ünün dereprese mutant olduğunu belirlemişlerdir.

E.cloacae infeksiyonlu hastalarda dereprese mutantların seçilmesi özel bir problem yaratır. Çünkü profilakside sık olarak kullanılan I. kuşak sefalosporinlere intrinsek direnç gösteren bu türde, mutasyon sıklığı da çok yüksektir (10^{-5} - 10^{-7}). Bu nedenle *E.cloacae* suşlarının diğer kolonize olmuş flora bakterileri ile yarışmada avantajlı olacağı bildirilmiştir (30).

P.aeruginosa infeksiyonlarında, dereprese mutantların seleksiyonu üreidopenisilinler, piperasilin ve geniş spektrumlu sefalosporinlerin kullanımına bağlanmaktadır. Özellikle kistik fibrozlu hastalarda, dereprese mutantların tedavide başarısızlığa neden olduğu bildirilmektedir (11,18,27). *P.aeruginosa*'da derepresyon sıklığı, ülkelere ve kaynağa göre değişkenlik göstermektedir (27). 1993'de İngiltere'de 24 merkezde yürütülen bir çalışmada yoğun bakım ünitesindeki hastalardan izole edilen 134 *P.aeruginosa* suşundan 10'unun dereprese mutant olduğu saptanmıştır. Ayrıca yatan hastalardan izole edilen 1041 *P.aeruginosa* suşundan 34'ünün, poliklinik hastalarından izole edilen 797 suştan ise 10'unun dereprese mutant olduğu bildirilmiştir (6).

Çalışmamızda dereprese mutant suş saptanmamasının en önemli nedeni olarak suşların hastalardan değil, hastane ortamından izole edilmesi düşünülmüştür. Ancak nozokomiyal infeksiyonlara neden olabilecek bu suşlarda gelişebilecek mutant hücrelerin antibiyotik tedavisi sırasında doğal seleksiyon sonucunda, potansiyel antibiyotik direncinde önemli bir rezervuar olabilecekleri her zaman dikkate alınmalı ve İBL üreten bir tür izole edildiğinde, raporda klinisyene "3.jenerasyon sefalosporinler kullanıldığında tedavi esnasında direnç gelişebilir!" uyarısı yapılmalıdır. Bu noktada, klinik izolatların tür düzeyinde ve doğru tanısının önemi ortaya çıkmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Bennett PM, Chopra I: Molecular basis of beta-lactamase induction in bacteria, *Antimicrob Agents Chemother* 37: 153 (1993).
2. Bodey GP, Elting LS, Rodriguez S: Bacteremia caused by Enterobacter: 15 years of experience in a cancer hospital, *Rev Infect Dis* 13: 550 (1991).
3. British Society for Antimicrobial Chemotherapy: A guide to susceptibility testing, *J Antimicrob Chemother* 27 (Suppl D): 1 (1991).
4. Bush K: Characterization of beta-lactamases, *Antimicrob Agents Chemother* 33: 259 (1989).
5. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA: A functional classification scheme of beta-lactamases and its correlation with molecular structure, *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1211 (1995).
6. Chen HY, Yuan M, Ibrahim-Elmagboul IB, Livermore DM: Susceptibility and resistance to antimicrobials amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993, *J Antimicrob Chemother* 35:521 (1995).
7. Chow JW, Fine MJ, Shales DM, Quinn JP, Hooper DC, Johnson MP, Ramphal R, Wagener MM, Miyashiro DK, Yu VL: Enterobacter bacteremia: Clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy, *Ann Intern Med* 115: 585 (1991).
8. Courvalin P: Interpretive reading of in vitro antibiotic susceptibility tests (the antibiogramme), *Clin Microbiol Infect* 2 (Suppl 1) : S26 (1996).
9. Curtis NAC, Eisenstadt RL, Rudd C, Whife AJ: Inducible type I beta-lactamases of Gram-negative bacteria and resistance to beta-lactam antibiotics, *J Antimicrob Chemother* 17: 51 (1986).
10. Ellner PD, Fink DJ, Neu HC, Parry MF: Epidemiological factors affecting antimicrobial resistance of common bacterial isolates, *J Clin Microbiol* 25: 1668 (1987).
11. Giwercman B, Jensen ET, Hoiby N, Kharazmi A, Consterton W: Induction of beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1008 (1991).
12. Gülay Z, Biçmen C, Yuluğ N: *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir seftazidimazların araştırılması, *İnfeksiyon Derg* 10: 329 (1996).
13. Gür D, Akalın HE, Baykal M, Doğrul F: Yeni kuşak beta-laktam antibiyotiklere dirençli *Klebsiella* ve *Enterobacter* suşlarında "isoelectric focusing" yöntemi kullanılarak beta-laktamaz enzimlerinin tiplendirimi, *Mikrobiyol Bült* 26: 1 (1992).
14. Johnson MP, Ramphal R: Beta-lactam-resistant *Enterobacter* bacteremia in febrile neutropenic patients receiving monotherapy, *J Infect Dis* 162: 981 (1990).
15. Knox JR: Extended spectrum and inhibitor resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity and three-dimensional structure, *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2593 (1995).
16. Livermore DM: Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in Gram-negative rods, *Eur J Clin Microbiol* 6: 439 (1987).
17. Livermore DM: Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics, *Scand J Infect Dis* 78 (Suppl): 7 (1991).
18. Livermore DM: Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance, *Clin Microbiol Rev* 8: 557 (1995).
19. Livermore DM, Williams JD: Beta-lactams: Mode of action and mechanisms of bacterial resistance, "Lorian V (ed): *Antibiotics in Laboratory Medicine*" kitabında s. 502, 4. baskı, Williams and Wilkins, London (1996).

20. Lodge JM, Piddock LJV: The control of class I beta-lactamase expression in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*, *J Antimicrob Chemother* 28: 167 (1991).
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, *Approved Standard M2-A5*, 5th ed, Vol.13, No: 24, NCCLS, Villanova (1993).
22. 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).
23. Pitout JDD, Moland ES, Sanders CC, Thomson KS, Fitzsimmons SR: Beta-lactamases and detection of beta-lactam resistance in *Enterobacter* spp., *Antimicrob Agents Chemother* 41: 35 (1997).
24. Ramadan MA, Tawfik AF, Shibl AM: Effect of beta-lactamase expression on susceptibility of local isolates *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* to beta-lactam antibiotics, *Chemotherapy* 41: 193 (1995).
25. Sanders CC: Inducible beta-lactamases and non-hydrolytic resistance mechanisms, *J Antimicrob Chemother* 13: 1 (1984).
26. Sanders CC, Sanders WE: Microbial resistance to newer generation beta-lactam antibiotics: Clinical and laboratory implications, *J Infect Dis* 151: 399 (1985).
27. Sanders CC, Sanders WE: Beta-lactam resistance in Gram-negative bacteria: Global trends and clinical impact, *Clin Infect Dis* 15: 824 (1992).
28. Sanders CC, Thomson KS, Bradford PA: Problems with detection of beta-lactam resistance among non-fastidious Gram-negative bacilli, "Moellering RC (ed): *Infectious Disease Clinics of North America*, Vol 7" kitabında s. 411, WB Saunders Co., London (1993).
29. Sirot J: Detection of extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases by disk diffusion, *Clin Microbiol Infect* 2 (Suppl 1): S35 (1996).
30. Steffee CH, Wasilauskas BL: Beta-lactamase expression and cross-resistance to beta-lactam antibiotics in a nosocomial population of *Enterobacter*, *Chemotherapy* 38: 291 (1992).
31. Tzelepi ELS, Tzouveleki AC, Vatopoulos AC, Mentis AC, Tskaris A, Legakis NJ: High prevalence of stably derepressed class-1-beta-lactamase expression in multiresistant clinical isolates of *Enterobacter cloacae* from Greek hospitals, *J Med Microbiol* 37: 91 (1992).
32. Widemann B, Peter K: Induction of beta-lactamase in Gram-negative bacteria, *Diagn Microbiol Infect Dis* 12 (Suppl): 131S (1989).