

GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZLAR: KLİNİK MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARI, TEDAVİ VE ENFEKSİYON KONTROLÜNDEKİ ROLLERİ

EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASES: THEIR ROLE IN CLINICAL MICROBIOLOGY LABORATORY, TREATMENT AND INFECTION CONTROL

İştar DOLAPÇI*

ÖZET: Beta-laktam halkası içeren antimikrobiyal ajanlara karşı gelişen direnç mekanizmalarının başında β -laktamaz enzimlerinin üretimi gelmektedir. Sefotaksim ve seftazidim gibi genişlemiş spektrumlu β -laktam ajanları inaktive edebilme yeteneğindeki enzimler "genişlemiş spektrumlu β -laktamaz" (extended spectrum β -lactamases: ESBL) olarak adlandırılmaktadır. Gram pozitif bakteriler içinde β -laktamaz sentezleyen en önemli patojen *Staphylococcus aureus* iken, Gram negatifler arasında ilk sırayı *Enterobacteriaceae* ailesinin üyeleri almaktadır. Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi β -laktamaz inhibitörleri, ESBL etkisini bloke edebilmekle birlikte, ESBL'lerin sıklıkla plazmidler üzerinde kodlanmaları ve bu nedenle suşlar arasında kolaylıkla yayılmaları büyük sorun oluşturmaktadır. Bugün 150'nin üzerinde farklı ESBL tanımlanmıştır. ESBL üreten klinik izolatları saptamak için çok sayıda metod önerilmektedir. ESBL taşıyan ajanlar ile oluşan enfeksiyonların yayılmasını önlemede ve tedavide en etkili ajan imipenem olarak görünmektedir. Bu derleme yazıda, ESBL'lerin klinik mikrobiyoloji laboratuvarı, tedavi ve enfeksiyon kontrolündeki rolleri tartışılmaktadır.

Anahtar sözcükler: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, tanı yöntemleri, epidemiyoloji.

ABSTRACT: The major mechanism responsible for resistance to β -lactam antibiotics is the production of β -lactamases. These enzymes, which have the ability to inactivate extended-spectrum β -lactam antibiotics, like cefotaxime and ceftazidime are called as extended-spectrum β -lactamases (ESBL). The most important pathogen which produces β -lactamases among Gram positive bacteria is *Staphylococcus aureus* and the members of the *Enterobacteriaceae* family are the leading β -lactamase producing organisms among Gram negative bacteria. Although the β -lactamase inhibitors like clavulanic acid, sulbactam and tazobactam could block ESBL effects, ESBL's have still been considered as a threat since they are coded by plasmids and can easily be transmitted between species. Recently, more than 150 ESBLs have been identified. Numerous methods have

* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

been proposed for the detection of ESBLs in clinical isolates. Imipenem seems to be the most effective agent for the therapy and control of the spread of infections caused by ESBL-producing bacteria. In this review article, the roles of ESBL in clinical microbiology laboratory, treatment and infection control, have been discussed.

Key words: Extended-spectrum beta-lactamases, identification methods, epidemiology.

GİRİŞ

Yirminci yüzyılın en önemli buluşlarından birisi enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antibiyotiklerin kullanılmaya başlanmasıdır. Penisilin 1941 yılında bulunmasıyla birlikte, yüzyıllardır süren mikroorganizma-insan savaşının kazanıldığı düşünülmüş ancak tarihte pek çok defa olduğu gibi insanoğlu bir kez daha yanılmıştır. Çünkü o yıllarda varlığından pek de haberdar olunmayan oysa günümüzde, özellikle geliştirilen moleküler tekniklerle iyice aydınlatılan bir gerçek söz konusudur ki; bu da mikroorganizmaların farklı direnç yolları geliştirebilme yeteneğidir. Beta laktamazlar olarak bilinen enzimler de bu direnç mekanizmalarından birisidir.

BETA-LAKTAMAZLAR

β -laktam halkası içeren antimikrobiyal ajanlara karşı gelişen direnç mekanizmalarının en önemlisi β -laktamaz enzimlerinin üretimidir. β -laktamazlar; penisilinler, sefalosporinler ve benzeri β -laktam halkası içeren antibiyotikleri hidrolize eden ve bu antibiyotiklere karşı direnç gelişimine neden olan enzimlerdir^{1,2}. Bu enzimler, penisilinler ve 1. kuşak sefalosporinleri etkin bir biçimde parçaladıkları halde, sefotaksim, seftazidim ve aztreonam gibi genişlemiş spektrumlu β -laktam ajanlara kısıtlı etki gösterirler. Ancak 1980'li yıllardan başlayarak genişlemiş spektrumlu β -laktam ajanların klinik tedavide yaygın kullanımları sonucunda, bu ana enzimleri kodlayan genlerdeki nokta mutasyonlarına bağlı olarak yeni enzimler gelişmiştir. Bu enzimler genişlemiş spektrumlu β -laktam ajanları inaktive edebilmekte ve bu nedenle "genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar (extended spectrum β -lactamases: ESBL)" olarak adlandırılmaktadırlar¹. ESBL'ler geniş spektrumlu sefalosporinler (örn. sefotaksim ve seftazidim) ve monobaktamları hidrolize ederek etkisiz hale getirebilirler. Buna karşılık sefamisinleri (örn. sefoksitin) parçalayamazlar ve klavulanik asit gibi β -laktamaz inhibitörleri ile inhibe edilebilirler^{3,4}.

ESBL'lar, Gram negatif bakteriler arasında öncelikle *Enterobacteriaceae* ailesinin üyeleri tarafından üretilirler, ancak diğer Gram negatif bakterilerde de ESBL'ye rastlanılmaktadır^{3,5}. *Enterobacteriaceae* ailesi içinde de ESBL üretimi açısından baskın olan türler *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* iken *Klebsiella oxytoca* da bunlara eklenmiştir^{3,5}.

Beta-laktamaz üretiminden sorumlu genler kromozomlar, transpozonlar ve plazmidlerde yerleşik olabilir; ancak plazmidlerde yerleşik genetik bilgi en büyük tehdidi oluşturmaktadır. Zira plazmidlerin direnç genlerini konjugasyonla

mikroorganizmalar arasında kolayca aktarmaları, bu genlerin bir çok farklı türe hızla yayılabileceği anlamına gelir. Böylece β -laktamazlara bağlı direncin patojen suşlar arasında yayılımı kolaylaşır^{4,6,7}. Nitekim, kazanılmış ESBL varlığını gösteren ilk klinik izolat 1983 yılında Almanya'da ortaya çıkmıştır⁴. Bunun yanı sıra diğer birçok nedenden dolayı da ESBL'ler ciddi bir klinik problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenlerin başında, ESBL'lerin geniş substrat özgüllüğüne sahip olmaları gelmektedir. Daha önce de belirtildiği gibi tüm penisilinler, sefamisinler dışındaki tüm sefalosporinler ve monobaktamları etkisiz hale getirebilmektedirler. Bir diğer sorun ise, ESBL üreten mikroorganizmaların sıklıkla in-vitro olarak bazı ESBL substratlarına duyarlı gözökmeleridir^{4,8}. Ayrıca bir diğer önemli nokta in-vitro testlerde ESBL'lerin klavulanik asit gibi β -laktamaz inhibitörleri ile inhibe edilebilmelerine rağmen, tedavide β -laktam/ β -laktamaz inhibitör kombinasyonunun etkisinin, enfekte eden bakteri miktarı, ilacın dozu ve var olan ESBL'nin tipine özgül olarak farklılık gösterebileceğidir⁶. Bunun yanı sıra ESBL üreten izolatlar, genellikle aminoglikozidler, florokinolonlar ve kotrimoksazolü de içeren diğer tip antimikrobilyallere de dirençlidirler. Çünkü ESBL'yi kodlayan genlerle birlikte örneğin, aminoglikozid modifiye edici enzimler (AMEs) sıklıkla aynı birleşik plazmidde yerleşirler ve böylece bir suştan diğerine birlikte geçiş gösterirler. Bunun anlamı; farklı yapıdaki iki ilaca karşı, sadece birinin kullanılmasıyla direnç oluşabileceğidir^{4,6,9,10}.

T A R İ H Ç E

İlk β -laktamaz, penisilinin tıbbi tedavide yaygın kullanımının başlamasıyla birlikte bir *Escherichia coli*'de tanımlanmıştır. Gram negatiflerde ilk plazmid ile ilişkili β -laktamaz olan TEM-1 ise 1960'ların başında gösterilmiştir. Orijinal TEM-1 enzimi Yunanistan'da "Temoniera" adındaki bir hastanın kan kültüründen üreyen bir *E.coli* suşunda bulunmuş ve buna ithafen "TEM" adı ile anılmıştır. İlk izolasyonundan bir kaç yıl sonra TEM-1 β -laktamaz enzimi tüm dünyaya yayılmıştır ve bugün *Enterobacteriaceae* ailesinin pek çok üyesinde, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria gonorrhoeae* gibi pek çok farklı türde bulunmaktadır. *Klebsiella pneumoniae* ve *E.coli*'de bulunan bir diğer plazmid ile ilişkili β -laktamaz ise SHV-1'dir ve sülfidril grubu değişken olduğu için bu şekilde isimlendirilmiştir. SHV-1 β -laktamazı, *K.pneumoniae* izolatlarının çoğunda kromozomda kodlanmış iken, *E.coli*'de genellikle plazmid ile ilişkili olarak bulunmaktadır^{11,12}.

Son 20 yıl boyunca, özellikle β -laktamazların hidrolitik aktivitesine dirençli olması için tasarlanmış pek çok yeni β -laktam antibiyotik geliştirilmiştir. Bununla birlikte, hasta tedavisinde kullanıma giren her yeni sınıf ilaç, kendisine dirençli yeni β -laktamazların ortaya çıkmasına yol açmıştır. Yeni β -laktamları hidrolize etme yeteneğindeki bu enzimlerin ilki, Almanya'da bir *Klebsiella ozaenae* suşunda bulunan SHV-2 enzimidir. Özellikle oksimino-sefalosporinlere karşı aktivitelerindeki genişlemiş etki nedeniyle bu enzimler "genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar" olarak isimlendirilmişlerdir. Bugün 150'nin üzerinde farklı ESBL tanımlanmıştır^{3,11}.

ESBL'LERİN ÖZELLİKLERİ

A) Fonksiyonel ve Moleküler Gruplandırma:

Enzimleri sınıflama konusunda yapısal özellikleri ve etki gösterdikleri substratları esas alan çeşitli yaklaşımlar vardır:

Ambler'in sınıflamasında, enzimler moleküler özellikleri ve aktif bölgelerine göre 4 gruba (A-D) ayrılmıştır. Sınıf A'daki enzimler aktif bölgelerinde bir serin ile karakterizedirler, moleküler ağırlıkları yaklaşık 29.000 Da'dur ve özellikle penisilini hidrolize ederler. Sınıf A β -laktamazlar; TEM-1, SHV-1 ve *S.aureus*'da bulunan penisilinaz gibi enzimleri içerir¹³.

Richmond ve Sykes'in sınıflandırma şeması ise, substrat profili ve β -laktamazların kodlandığı gen lokalizasyonuna dayanmaktadır¹¹.

Bush, Jacoby ve Medeiros tarafından daha yakın zamanda geliştirilen sınıflandırma şeması ise, enzimlerin biyokimyasal özellikleri ile birlikte moleküler yapılarını kullanır ve kodlandıkları genlerin nükleotid sekanslarına göre β -laktamazları fonksiyonel gruplara böler. Grup 1, klavulanik asitle inhibe olmayan sefalosporinazları içerir. Bu enzimlerin üretimi genelde kromozomaldır. Grup 2'de genellikle, β -laktamaz inhibitörlerinin etki ettiği plazmidle kodlanan penisilinazlar, sefalosporinazlar ve geniş spektrumlu β -laktamazlar bulunur. Grup 3'deki metalloenzimler, karbapenemler dahil çoğu β -laktamları hidrolize eder ve olağan β -laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezler. Grup 4'deki penisilinazlar da klavulanik asit ve diğer β -laktamaz inhibitörleriyle inhibe olmazlar ve çok nadir görülürler. Ayrıca Bush sınıflandırmasında her grubun kendi içinde alt grupları oluşturulmuştur. Bu şemaya göre, yukarıda da bahsedildiği gibi, klavulanik asit tarafından inhibe edilebilen ve oksiminio-sefalosporinleri hidrolize etme yeteneğindeki β -laktamazlar olarak tanımlanan ESBL'ler, fonksiyonel grup 2be'ye yerleştirilmişlerdir^{11,13,14}.

B. Duyarlılık ve Biyokimyasal Özellikler:

ESBL'ler genişlemiş spektrumlu β -laktam antibiyotikleri hidrolize edebilmelerini sağlayan bazı mutasyonlar içerirler. Bununla birlikte genişlemiş spektrumlu sefalosporinlere karşı aktivitelerinin artmasını sağlayan, aktif bölgelerindeki genişleme, ESBL'lerin β -laktamaz inhibitörlerine duyarlılıklarının da artması ile sonuçlanmıştır¹⁵. Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi β -laktamaz inhibitörleri, ESBL etkisini bloke edebilmekte ve bu yüzden de sıklıkla ESBL üreten mikroorganizmalar bazı β -laktam/ β -laktamaz inhibitörü kombinasyonlarına duyarlı görünmektedir¹⁶.

ESBL TİPLERİ

Günümüzde ESBL'ler aminoasit sekanslama sonuçlarının karşılaştırılması temeline dayanan 9 farklı yapısal ya da gelişimsel grup içinde incelenirler. Bunlar TEM, SHV, CTX-M, OXA, PER, VEB, GES, TLA ve BES aileleridir^{4,17}. Diğer ESBL'lere CME, SFO gibi her geçen gün yenileri eklenmektedir. ESBL'ler geniş spektrumlu penisilinazların türevleridir ve çoğu TEM ya da SHV enzimlerinden köken

almaktadır. Bugün yaklaşık 90'ın üzerinde TEM-tipi β -laktamaz ve 25'in üzerinde de SHV-tipi β -laktamaz enzimi bulunmaktadır (<http://lahey.org/studies/webt.htm>). TEM ve SHV-tipi ESBL'ler çoğunlukla *E.coli* ve *K.pneumoniae*'de bulunmakla birlikte, *Proteus spp.*, *Providencia spp.* ve *Enterobacteriaceae*'nin diğer türlerinde de gösterilmişlerdir¹⁶.

TEM: TEM-1, Gram negatif bakterilerde en sık karşılaşılan β -laktamazdır. *E.coli*'deki ampisilin direncinin %90'ından fazlası TEM-1 üretimine bağlıdır. Bu enzim aynı zamanda *H.influenzae* ve *N.gonorrhoeae*'de gittikçe artan miktarlarda görülen ampisilin ve penisilin direncinden de sorumludur. TEM-1 enzimi penisilin ve sefalotin ile sefaloridin gibi erken kuşak sefalosporinleri hidrolize edebilmektedir. TEM-1'den ilk türeyen enzim olan TEM-2, orijinal β -laktamazdan tek bir aminoasit yerleşimindeki farklılık ile ayrılır. Bu değişiklik izoelektrik noktanın 5.4'den 5.6'ya kaymasına yol açar fakat substrat profilinde bir değişim söz konusu değildir. İlk olarak 1989'da bildirilen TEM-3 enzimi, ESBL fenotipi gösteren ilk TEM-tipi β -laktamazdır. O zamandan bugüne kadar 90 dolayında TEM türevi tanımlanmıştır. Bu β -laktamazlardan bazıları "inhibitöre dirençli" enzimlerdir ancak çoğunluğu ESBL karakterindedir^{2,4,11}.

TEM-tipi β -laktamazlar sıklıkla *E.coli* ve *K.pneumoniae*'de bulunmakla birlikte diğer Gram negatif bakteri türlerinde de artan sıklıkta rastlanılmaktadır. TEM-tipi ESBL'ler, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri*, *Acinetobacter baumannii* ve *Salmonella spp.* gibi diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde de görülebilmektedir. Ayrıca *Enterobacteriaceae* ailesinden olmayan diğer Gram negatiflerde de TEM-tipi β -laktamazlar gösterilmiştir. Bunlardan TEM-42 *P.aeruginosa*'da bulunmuştur^{3,8}.

İNİHİTÖRE DİRENÇLİ β -LAKTAMAZLAR (İDBL): Bu enzimler ESBL olmamakla birlikte, sıklıkla ESBL'ler ile birlikte anılmaktadır, çünkü bu enzimler de klasik TEM ve SHV tipi enzimlerden türemişlerdir. 1990'lı yılların başlarında β -laktamazların klavulanik asit inhibisyonuna direnç geliştirdikleri saptanmıştır. Nükleotid sekanslama çalışmaları bu enzimlerin TEM-1 ya da TEM-2 β -laktamazların çeşitleri olduklarını ortaya koymuştur. Bugün en az 19 farklı İDBL enzimi bulunmaktadır. İDBL'lar esas olarak *E.coli* klinik izolatlarında bulunmuştur fakat aynı zamanda *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *P.mirabilis* ve *Citrobacter freundii*'nin bazı suşlarında da gösterilmiştir^{11,17}. İnhibitöre dirençli TEM çeşitleri klavulanik asit ve sulbaktam ile inhibisyona dirençli olmakla birlikte tazobaktam ve sonradan kullanılan piperasilin ve tazobaktam kombinasyonlarına duyarlı kalmaya devam etmektedirler. Tek bir β -laktamaz içindeki ESBL ve inhibitöre dirençli özgül mutasyonların kombinasyonu ise "kompleks mutant enzim" olarak adlandırılmaktadır. Bu gibi β -laktamazların iki doğal varyantı TEM-50/CMT-1 ve SHV-10'dur^{2,16}.

SHV: SHV-1 β -laktamazlar en çok *K.pneumoniae* suşlarında bulunmakla birlikte, *Citrobacter diversus*, *E.coli* ve *P.aeruginosa*'da da bu enzimlere rastlanmıştır. *K.pneumoniae*'de görülen plazmide bağımlı ampisilin direncinin %20 kadarından SHV tipi enzimler sorumludur. TEM tipi β -laktamazların aksine, SHV-1'in nispeten daha az sayıda türevi vardır. ESBL fenotipine sahip SHV varyantlarının çoğunluğu, 238. pozisyonundaki glisin yerine serin girmesiyle karakterizedir. SHV-5 ile bağlantılı bazı türevlerde ise aynı zamanda 240. pozisyonundaki glutamat ile

lizinin yer değiştirmesi söz konusudur. 238. pozisyondaki serin, seftazidim hidrolizi, 240. pozisyondaki lizin ise, sefotaksim hidrolizi için kritik önem taşımaktadır^{4,8}. Günümüze kadar gösterilen SHV tipi β -laktamazların büyük çoğunluğu ESBL fenotipi göstermektedir. Bununla birlikte tek bir varyant; SHV-10, inhibitöre dirençli yapıya sahiptir¹¹.

CTX-M: Son yıllarda plazmide bağlı ESBL'lerin yeni tanımlanan bir ailesi daha ortaya konmuştur. CTX-M adı verilen bu enzim grubu özellikle sefotaksim hidrolizine yol açmaktadır. Esas olarak *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ve *E.coli*'de bulunmakla birlikte diğer *Enterobacteriaceae* türlerinde de tanımlanmışlardır^{19,20}. Türkiye'de yapılan bir çalışmada da, *Shigella sonnei*'de CTX-M-3 tipi ESBL varlığı gösterilmiştir. Bu bulgu Türkiye'de ilk, dünyada ise 3. CTX-M tipi ESBL üreten *Shigella* suşu olarak literatürde yer almıştır²⁰.

Bu enzimler TEM ve SHV β -laktamazları ile pek ilişkili değildir; bu iki grup enzim ile en fazla %40 benzerlik gösterirler. CTX-M ailesi β -laktamazların filogenetik çalışmaları 4 esas tipleri olduğunu ortaya koymuştur^{4,11}:

1. CTX-M-1 tipi; CTX-M-1 ve CTX-M-3'ü içerir.
2. CTX-M-2 tipi; CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7 ile birlikte Toho-1'i içerir.
3. Toho-2 (sadece bir elemanı vardır).
4. CTX-M-8 (sadece bir elemanı vardır).

Bütün CTX-M enzimlerinde bulunan 237. pozisyondaki serin rezidüsünün, CTX-M tipi β -laktamazların genişlemiş spektrumlu aktivitesinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Sefotaksimin hızlı hidrolizine ek olarak bu enzimlerin bir diğer farklı özelliği, sulbaktam ya da klavulanata göre tazobaktam ile daha iyi inhibe olmalarıdır¹¹.

CTX-M tipi β -laktamaz taşıyan suşlar dünyanın her tarafında izole edilmiş olmakla birlikte, özellikle Doğu Avrupa, Güney Amerika ve Japonya'daki lokal salgınlarda ortaya çıkmışlardır¹³.

OXA: Bu enzimler, ESBL ailesinin bir diğer genişleyen üyesidir. Bu β -laktamazlar, moleküler sınıf D ve fonksiyonel grup 2d'de yer alırlar ve bu özellikleriyle TEM ve SHV enzimlerinden farklıdırlar. OXA tipi β -laktamazlar ampisilin ve sefalotine direnç sağlarlar ve oksasilin ile kloksasiline karşı gösterdikleri yüksek hidrolitik aktivite en önemli özellikleridir. Ayrıca klavulanik asit ile inhibe olmamalarıyla tanınırlar. OXA β -laktamaz ailesi aslında, özgül hidroliz profili ile, genotipik olmaktan çok fenotipik bir grup olarak ortaya çıkmıştır. Bu nedenle bu ailenin bazı üyeleri arasında %20 kadar az sekans homolojisi bulunur^{4,11}. ESBL'lerin çoğunun *E.coli*, *K.pneumoniae* ve diğer *Enterobacteriaceae*'lerde bulunmasına karşılık OXA tipi ESBL'ler esas olarak *P.aeruginosa*'da bulunur. OXA tipi enzimlerin çoğu OXA-10'dan türemişlerdir. Örneğin OXA-14, OXA-10'dan sadece tek bir aminoasit artışı ile, OXA-11 ve OXA-16 iki farkla ve OXA-13 ile OXA-19 da dokuz farkla ayrılırlar. OXA β -laktamaz ailesinin pek çok yeni üyesi özellikle Fransa ve Türkiye'den bildirilen izolatlarda bulunmaktadır^{21,22}.

Diğer ESBL'LER: Tanımlanmış β -laktamaz ailelerinden hiçbirisi ile yakın ilişki içinde olmayan bazı ESBL'ler de bildirilmektedir. Örneğin ilk kez Türkiye'de bir hastadan izole edilen *P.aeruginosa* suşunda gösterilen PER-1 enzimi bunlardan birisidir²³. Daha sonraları aynı enzim *S.enterica* serovar Typhimurium ve *A.baumannii* izolatlarında da gösterilmiştir. PER-1 β -laktamaz enzimi tüm Türkiye'de oldukça yaygındır ve tüm suşların %46'sı, seftazidime dirençli *A.baumannii* suşlarının ise %60 kadarında bulunmaktadır^{24,25}. Plazmid tarafından kodlanan bir enzim olan PER-1'in, *S.enterica* serovar Typhimurium'un pek çok nozokomiyal izolatında bulunması, suşların direnç plazmidleri ile hastane ortamında yayıldığını düşündürmektedir²⁴. Bununla ilişkili bir diğer enzim olan PER-2, PER-1 ile %86 aminoasit homolojisi gösterir ve Arjantin'deki *S.enterica* serovar Typhimurium suşlarında bulunmuştur¹¹. Şimdiye kadar bulunan PER-1 enzimlerinin çoğunun Türkiye'den, PER-2'nin ise çoğunun sadece Güney Amerika'dan bildirilmiş olması ilginçtir.

PER-1 ile biraz benzeyen bir diğer enzim VEB-1 β -laktamaz enzimidir. VEB-1 ilk olarak Vietnam'da bir hastadan izole edilen bir *E.coli* suşunda gösterilmiş olmakla birlikte daha sonra Tayland'da bir hastadan izole edilen *P.aeruginosa* suşunda da bulunmuştur. Bunlarla ilişkili üçüncü enzim de CME-1 enzimidir ve *Chryseobacterium meningosepticum*'da gösterilmiştir. Bu grup içerisinde yer alan dördüncü enzim TLA-1 olarak isimlendirilmiştir ve Meksika'daki bir hastadan izole edilen bir *E.coli* suşunda bulunmuştur. Bu enzimlerin hepsi oksiimino-sefalosporinlere özellikle de seftazidim ve aztreonam'a direnç sağlarlar^{4,11}.

Bir diğer ESBL, *Serratia fronticola*'dan elde edilen ve sınıf A β -laktamazlar ile yüksek oranda benzer olan SFO-1'dir. SFO-1'in ilginç bir özelliği, üretiminin imipenem tarafından yüksek düzeyde indüklenebildiği, geçiş gösterebilen bir β -laktamaz olmasıdır¹¹.

Sık görülmeyen ESBL enzimlerinden biri olan GES-1, diğer plazmid ile ilişkili β -laktamazlara benzememekle birlikte *Proteus mirabilis*'de bulunan karbenisilinaz enzimi ile %36 homoloji gösterir¹¹.

ESBL SAPTAMA YÖNTEMLERİ

Enterobacteriaceae'lerde ESBL üretme prevalansındaki artış, klinik izolatlarda bu enzimlerin varlığını kesin olarak tayin edecek laboratuvar yöntemlerine büyük oranda ihtiyaç duyulmasına yol açmıştır. Bununla birlikte hem "Minimal İnhibitör Konsantrasyon" (MİK) saptanması, hem de disk difüzyon yöntemlerinin *E.coli* ve *K.pneumoniae*'nin tüm suşlarındaki ESBL varlığını tayin etmede başarısız oldukları ortaya konmuştur. Klasik duyarlılık testlerinin ESBL'leri tayininde duyarlılık ve özgüllüklerindeki bu yetersizlik, klinik izolatlarda ESBL'lerin varlığını ortaya koyacak yeni testlerin araştırılmasını gerektirmiştir⁶.

Klinik Mikrobiyolojik Yöntemler:

Klinik mikrobiyoloji testleri genellikle klavulanat olmak üzere bir β -laktamaz inhibitörünü ve seftazidim veya sefotaksim gibi bir oksiimino-sefalosporin kombinasyonunu kullanır. Bu testlerde klavulanat ESBL'yi inhibe eder ve sefalosporin

direçliliğinin düzeyini azaltır. Bu testlerden bazıları Kirby-Bauer disk difüzyon test yöntemi esasına dayandırılmıştır. Tanımlanan ilk tayin testi çift disk sinerji yöntemidir. Bu testte mikroorganizma Mueller-Hinton agar plaklarına eküvyon ile yayılır. Amoksisilin-klavulanat içeren duyarlılık diski plağın merkezine konur. Oksiimino β -laktam antibiyotiklerden birini içeren diskler amoksisilin-klavulanat içeren diskten 3'er cm uzağa yerleştirilir. Oksiimino β -laktam diskinin çevresinde oluşan inhibisyon zonunda, amoksisilin-klavulanat diskindeki klavulanatın sinerjisi nedeniyle olan artış pozitif sonuç olarak kabul edilir. Bu test ESBL tayini için mantıklı bir yöntem olarak halen kabul görmektedir. Bununla birlikte testin duyarlılığının disklerin arasındaki mesafeyi 2 cm'ye indirerek artırılabilceği öne sürülmektedir. Alternatif olarak Mueller-Hinton agara klavulanat (4 μ l/ml) eklenerek, geniş spektrumlu sefalosporin içeren disklerin inhibisyon zonu artırılabilir¹¹.

Benzer bir test Jacoby ve Han²⁶ tarafından tanımlanmıştır. Herhangi bir oksiimino β -laktam antibiyotik içeren duyarlılık disklerine 20 μ g sulbaktam eklenmiştir. Sulbaktam içeren disklerin inhibisyon zonunda tek başına ilaç içeren disklerle göre 5 mm'lik artış pozitif olarak kabul edilmiştir. Bu yöntemle bir çok ESBL üreten suş tanımlanmışsa da önemli bir miktarı da saptanamamıştır.

ESBL tayini için öne sürülen bir diğer yöntem Thomson ve Sanders²⁷ tarafından tanımlanan üç boyutlu testtir. Bu testte Mueller-Hinton agar plağının yüzeyine mikroorganizmanın inokülasyonunu takiben bir yarık açılır. Bu yarığın içine mikroorganizmanın sıvı besiyerindeki süspansiyonundan konulur. Bunu takiben antibiyotik diskleri bu yarıktan 3 mm uzaklıklara yerleştirilir. Beklenen dairesel inhibisyon zonlarında yapısal bozukluk veya devamlılığın olmaması pozitif test olarak kabul edilir. Bu test ESBL'lerin tayini için oldukça duyarlıdır fakat diğer yöntemlere göre hem teknik hem de iş yükü olarak daha zordur.

Günümüzde NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) başlangıç taraması olarak 1 μ g/ml konsantrasyonda 5 adet geniş spektrumlu β -laktam antibiyotikten birini içeren sıvı besiyerindeki üreme testini önermektedir. Pozitif sonuç ESBL varlığı için şüpheyi ortaya koyar¹¹.

Birkaç ticari firma klinik laboratuvarlarda mevcut olan MİK test yöntemleri ile birlikte kullanılabilecek ESBL saptama testlerini geliştirmişlerdir. E-test ESBL şeritleri (AB Biodisk, Solna, İsveç) bir tarafında seftazidim ve diğer tarafında seftazidim + klavulanat içeren iki taraflı şeritlerdir. ESBL için pozitif test klavulanik asit varlığında seftazidimin MİK değerinde 3 dilüsyondan fazla azalma ile ortaya konur. Bu test klinik izolatlardaki ESBL tayininde kullanılan çift disk sinerji testinden daha duyarlıdır. E-test güvenilir ve kullanımı kolay bir yöntem olmakla birlikte, bazen klavulanatın sadece seftazidim olan tarafa difüzyona uğraması nedeniyle, seftazidimin MİK değerlerinde aşırı bir azalma ile birlikte değerlendirme zorluğu yaratır²⁸.

Otomatize mikrobiyal duyarlılık test sistemi olan Vitek (Biomerieux) seftazidim veya sefotaksim tek başına ve klavulanik asit ile birlikte kombinasyonu yöntemine dayanarak ESBL testi üretmiştir. Klavulanat içeren kuyucuklar, tek başına ilaç içeren kuyucuklarla karşılaştırıldığında önceden tahmin edilen üremedeki azalma miktarı ESBL varlığını göstermektedir²⁹.

Bütün bu testlerin her biri değerli olmakla birlikte β -laktamaz fenotipine dayalı hiçbir test Gram negatif bakterilerin klinik izolatlarında ESBL tayini için %100 özgül ve duyarlı değildir.

Moleküler Tayin Yöntemleri:

Yukarıda tarif edilen testler sadece ESBL varlığını ortaya koymaktadırlar. Klinik izolatta hangi özgül ESBL tipinin olduğunun aydınlatılması ise çok daha karışıktır. ESBL çalışmalarının ilk dönemlerinde izoelektrik noktanın tayini, genellikle ESBL varlığının gösterilmesi için yeterliydi. Bununla birlikte sayıları gittikçe artan TEM tipi β -laktamazların benzer izoelektrik noktalara sahip olmaları nedeniyle, ESBL'nin izoelektrik noktaya tayini artık mümkün değildir. Aynı durum ESBL'lerin SHV, CTX-M ve OXA aileleri için de geçerlidir¹¹.

Bir enzim ailesine ait β -laktamazların varlığını tayin etmek için kullanılan en kolay ve en yaygın moleküler yöntem β -laktamaz genine özgül oligonükleotid primerlerinin kullanıldığı "polimeraz zincir reaksiyonu" (PCR)'dur. Oligonükleotid primerleri gen bankası gibi kullanıma açık yerlerden seçilebilir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.htm>). Bu primerler genellikle nokta mutasyonların olmadığı bilinen bölgelerden seçilmiştir. Bununla birlikte PCR, TEM veya SHV'nin farklı varyantlarını ayırt edemez.

TEM tipi β -laktamazların alt tiplerinin saptanmasında kullanılan bir yaklaşım; PCR'a "restriction fragment length polymorphism" (RFLP) analizinin eklenmesidir. Bu testte amplifiye edilmiş PCR ürünleri restriksiyon endonükleazları ile sindirime tabi tutulur ve arta kalan fragmanlar elektroforez ile ayrılır. Her bir restriksiyon enzimi ile oluşturulan fragmanın boyutu bla_{TEM} yapısal geni içindeki nokta mutasyonuna işaret eder¹¹.

SHV türevlerinin tayini ve tanımlanması için ise farklı birkaç test geliştirilmiştir. Bunların içinde en basiti yine PCR-RFLP'dir. Bu yöntemde PCR'ı takiben amplifiye edilen DNA *NheI* restriksiyon enzimi ile sindirilir ve bu G-A nükleotid değişimini tayin ederek, SHV tipi ESBL'lerin çoğunda 238. pozisyonundaki glisin-serin yer değişimini saptar. Bu yöntem SHV tiplerinden hangisi olduğunu saptayamamakla birlikte, 238. pozisyonundaki özgül mutasyonu tayin eder. Bu da daha önce bahsedildiği gibi ESBL fenotipini gösterir. SHV tipi ESBL'lerin varyantlarının saptanması için ise "PCR tek zincir konformasyonel polimorfizm analizi" (PCR-SSCP) kullanılır. Bu metod bla_{SHV} geni içinde özgül lokasyonlardaki tek baz mutasyonlarını saptar. PCR-SSCP ile PCR-RFLP'nin birlikte kullanımı ile 17 farklı SHV geninin tanımlanması yapılabilmektedir¹¹.

SHV genlerinin tanımlanması için öne sürülen bir diğer test de, ligaz zincir reaksiyonudur (LCR). Bu yöntemde bla_{SHV} genini içeren hedef DNA "termal cycler" içinde denatüre edilir ve biyotinle işaretli oligonükleotid primerler ile bağlanarak 4 farklı pozisyonundaki mutasyonlar saptanır. Bu yöntem SHV varyantlarının 7 tanesini tanıyabilir¹¹.

EPİDEMİYOLOJİ

Günümüzde ESBL tüm dünyada hastanede yatan hastalar için büyük bir tehlike oluşturmaktadır. ESBL taşıyan bakterilerle enfeksiyonda; hastanede kalış süresinin uzunluğu, hastalığın ağırlığı, entübasyon ya da mekanik ventilatöre bağlı

olma, üriner ya da arteriyel kateterizasyon ve daha önce antibiyotik kullanmış olma gibi kriterler risk faktörü olarak kabul edilmektedir.

ESBL fenomeni ilk kez Batı Avrupa'da başlamıştır, aslında bu bir sürpriz değildir zira geniş spektrumlu β -laktam antibiyotikler de ilk kez orada klinik kullanıma girmiştir. Bununla birlikte ESBL'lerin Amerika ve Asya'da saptanmaya başlaması hiç de uzun bir zaman almamıştır^{4,30}.

Klinik izolatlarda ESBL'lerin prevalansı ülkeler ve hastaneler arasında oldukça farklılıklar göstermektedir. Örneğin Avrupa'da; Hollanda'da 11 farklı hastanenin laboratuvarından elde edilen verilere göre *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarının % 1'inden daha azı ESBL taşıırken, Fransa'da *K.pneumoniae* suşlarının %40'ı, Yunanistan'da %35'i seftazidime dirençli bulunmuştur^{6,31}. Rusya'da 28 farklı hastanenin toplam sonuçlarına göre ise *E.coli*'lerin %15.8'i ve *K.pneumoniae* izolatlarının %60.8'inde ESBL saptanmıştır³². Türkiye'den ise Akata ve arkadaşlarının⁹ yaptığı bir çalışmada, 1995-1999 yılları arasında tiplendirilen toplam 194 nozokomiyal *Enterobacteriaceae* suşunun %11.8'inde ESBL üretimi gösterilmiştir. Japonya'da *E.coli* ve *K.pneumoniae*'da ESBL üretimine bağlı β -laktam direnç oranları çok düşük düzeylerdeydi. Bu düşük insidans, bu ülkede sefamisin ve karbapenemlerin yoğun kullanımı ile açıklanabilir⁴. Son yıllarda yapılan ve Japonya'dan 196 farklı kuruluşun verilerini içeren bir çalışmaya göre, *E.coli*'lerin %0.1'inden ve *K.pneumoniae*'ların %0.03'ünden azında ESBL üretimi saptanmıştır. Asya'da ise aynı oranlar %4.8 ile %12 arasında değişmektedir³³.

ESBL üreten mikroorganizmaların yayılmasını önlemede seçilecek en başarılı yol, tedavide kullanılan ajanı farklı bir sınıf geniş spektrumlu antibiyotik ile değiştirmek gibi görünmektedir. Bu gibi durumlarda değiştirilen antibiyotiğin yerine getirilecek en başarılı iki ajan imipenem ve piperasilin-tazobaktamdır. Türkiye'de yapılan çok merkezli bir çalışmada, 749 aerop Gram negatif izolatın antibakteriyel duyarlılıkları araştırılmış ve %75'ik bir oran ile imipenemin en etkili antimikrobiyal olduğu saptanmıştır³⁴.

ESBL üreten mikroorganizmaların yol açtığı enfeksiyon ve salgınları saptamada pek çok araştırmacı "pulsed-field gel electrophoresis" (PFGE) gibi moleküler metodları kullanmaktadır. Bu suşların epidemiyolojisini araştırmada tercih edilen diğer yöntemler arasında; plazmid profili, ribotiplendirme, "random amplified polymorphic DNA" (RAPD) ve "arbitrarily primed PCR" yer almaktadır. Bu tür salgınlar genellikle yoğun bakım ünitesinde başlamakta ve genel yayılım yolları ile hastanelerin diğer kliniklerine sıçramaktadır. Sıklıkla salgının kaynağı olan ESBL üreten mikroorganizma saptanamamaktadır. Bununla birlikte bu bakterilerin epidemiyolojisi ile ilgili bazı ilginç veriler de mevcuttur. Örneğin Fransa'da bir hastanede yeni doğum yapmış altı kadın ile iki yenidoğanda SHV-5 taşıyan seftazidime dirençli bir *K.pneumoniae* suşu izole edilmiştir. Yapılan plazmid profili ve PFGE çalışmalarında, suşların hepsinin kontamine bir ultrasonografi jelinden üretilen *K.pneumoniae* ile aynı olduğu ortaya konmuştur¹¹.

SONUÇ

Özellikle son 15 yıl içinde ESBL'ler ilginç bir bilimsel araştırma konusu olmaktan çıkıp, büyük tıbbi önem taşıyan bir gerçek haline gelmiştir. Sıklıkla plazmidler üzerinde kodlanmaları ve bu nedenle suşlar arasında kolaylıkla yayılmaları büyük

sorun oluşturmaktadır. ESBL taşıyan klinik izolatları saptamak için çok sayıda metod önerilmektedir. Günümüzde ESBL taşıyan *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerini tedavi için önerilen en uygun ajan imipenemdir, bunun dışında fazla bir seçenek bulunmamaktadır. Tüm bu özellikleri nedeniyle ESBL üreten mikroorganizmalar 21. yüzyıl boyunca hem klinisyen hem de mikrobiyologları uğraştırmaya devam edecek gibi görünmektedir.

KAYNAKLAR

1. Gülay Z: Antimikrobiyal İlaçlara Direnç, s: 91-108, Ustaçelebi Ş (ed), Klinik Mikrobiyoloji Kitabı, 1999, Güneş Kitabevi, Ankara.
2. Knox JR: Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases: Mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995, 39: 2593-2601.
3. Morris D, O'Hare C, Glennon M, Maher M, Corbett-Feeney G, Cormican M: Extended-spectrum β -lactamases in Ireland, including a novel enzyme, TEM-102. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47: 2572-2578.
4. Gniadkowski M: Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect* 2001, 7: 596-608.
5. Gür D: Bakterilerde Antibiyotiklere Karşı Direnç, s: 182-191, Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (ed), Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Kitabı, Cilt 1, 2. baskı, 2002, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
6. Rupp ME, Fey PD: Extended spectrum beta lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*: Considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs* 2003, 63: 353-365.
7. Bodey GP: Beta-lactam resistance today and tomorrow: A global issue, p: 4-11. In: Inoue M (ed), Issues and Answers in Beta-Lactam Resistance. Proceedings from the First Net Care Meeting, Monte Carlo. October 1999 (Clinical Monograph S). Cambridge Medical Publications, West Sussex, UK.
8. Kim YK, Pai H, Lee HJ, et al: Bloodstream infections by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: Epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46: 1481-1491.
9. Akata F, Tatman-Otkun M, Ozkan E, Tansel O, Otkun M, Tugrul M: Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases produced by nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* in Trakya University Hospital, Turkey. *New Microbiol* 2003, 26: 257-262.
10. Sturenburg E, Mack D: Extended-spectrum beta-lactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* 2003, 47: 273-295.
11. Bradford PA: Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001, 14: 933-951.
12. Rolinson GN: Forty years of β -lactam research. *J Antimicrob Chemother* 1998, 41: 589-603.
13. Akova M: Regional differences in beta-lactam resistance, p: 12-21. In: Inoue M (ed), Issues and Answers in Beta-Lactam Resistance. Proceedings from the First Net Care Meeting, Monte Carlo. October 1999 (Clinical Monograph S). Cambridge Medical Publications, West Sussex, UK.
14. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA: A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995, 39: 1211-1233.
15. Lee N, Yuen KY, Kumana CR: Clinical role of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. *Drugs* 2003, 63: 1511-1524.
16. Fiett J, Palucha A, Miaczynska B, et al. A novel complex mutant β -lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiellae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, 44: 1499-1505.
17. Nordmann P: Trends in beta-lactam resistance among *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis* 1998, 27 (Suppl 1): 100-106.

18. Kwon NY, Kim JD, Pai HJ: The resistance mechanisms of beta-lactam antimicrobials in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Korean J Intern Med 2002, 17: 94-99.
19. Pai H, Choi EH, Lee HJ, Hong JY, Jacoby GA: Identification of CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. J Clin Microbiol 2001, 39: 3747-3749.
20. Acikgoz ZC, Gulay Z, Bicmen M, Gocer S, Gamberzade S: CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase in a *Shigella sonnei* clinical isolate: First report from Turkey. Scand J Infect Dis 2003, 35: 503-505.
21. Danel F, Hall MC, Gur D, Livermore DM: OXA-16, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase, from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Antimicrob Agents Chemother 1998, 42: 3117-3122.
22. Vahaboglu H, Ozturk R, Akbal A, Saribas S, Tansel O, Coskunkan F: Practical approach for detection and identification of OXA-10-derived ceftazidime-hydrolyzing extended-spectrum β -lactamases. J Clin Microbiol 1998, 36: 827-829.
23. Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, et al: Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: A nationwide multicenter study. Antimicrob Agents Chemother 1997, 41: 2265-2269.
24. Vahaboglu H, Dodanli S, Eroglu C, et al: Characterization of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* strains: Molecular epidemiology of PER-1 producing isolates and evidence for nosocomial plasmid exchange by a clone. J Clin Microbiol 1996, 34: 2942-2946.
25. Vahaboglu H, Hall LMC, Mulazimoglu L, Dodanli S, Yildirim I, Livermore DM: Resistance to extended-spectrum cephalosporins, caused by PER-1 β -lactamase, in *Salmonella typhimurium* from Istanbul, Turkey. J Med Microbiol 1995, 43: 294-299.
26. Jacoby GA, Han P: Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1996, 34: 908-911.
27. Thompson KS, Sanders CC: Detection of extended-spectrum β -lactamase in members of the family *Enterobacteriaceae*: Comparison of the double-disk and three dimensional tests. Antimicrob Agents Chemother 1992, 36: 1877-1882.
28. Ozakin C, Sinirtas M, Sevgican E, Kazak E, Gedikoglu S: Comparison of the E-test method with an automated bacterial identification and antimicrobial susceptibility detection system for screening extended-spectrum beta-lactamase producers. Scand J Infect Dis 2003, 35: 700-703.
29. Sanders CC, Peyret M, Moland ES, et al: Ability of the VITEK 2 Advanced Expert system to identify β -lactam phenotypes in isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 2000, 38: 570-574.
30. Rebuck JA, Olsen KM, Fey PD, Langnas AN, Rupp ME: Characterization of an outbreak due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric intensive care unit transplant population. Clin Infect Dis 2000, 31: 1368-1372.
31. Tzelepi E, Magana C, Platsouka E, et al: Extended-spectrum β -lactamase types in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in two Greek hospitals. Int J Antimicrob Agents 2003, 21: 285-288.
32. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Strachounski L: Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2003, 47: 3724-3732.
33. Siu LK, Lu PL, Hsueh PR, et al: Bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric oncology ward: Clinical features and identification of different plasmids carrying both SHV-5 and TEM-1 genes. J Clin Microbiol 1999, 37: 4020-4027.
34. Aksaray S, Dokuzoguz B, Güvener E, et al: Surveillance of antimicrobial resistance among Gram-negative isolates from intensive care units in eight hospitals in Turkey. J Antimicrob Chemother 2000, 45: 695-699.