

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YENİ KUŞAK β -LAKTAM ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇLİ
PSEUDOMONAS SUŞLARINDA BULUNAN
 β -LAKTAMAZLARIN "ISOELECTRIC FOCUSING"
YÖNTEMİ İLE TİPLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ

Prof.Dr. Yusuf ÖZBAL

Dr. Selma (DUVAN) GÖKAHMETOĞLU

Araştırma Görevlisi

58748

KAYSERİ - 1997

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	<i>i</i>
KISALTMALAR	<i>iii</i>
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	<i>iv</i>
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
β-laktamazlar	6
β-laktamazların sınıflandırılması	7
β-laktamazların sınıflandırılmasında kullanılan kriterler	8
Bush Jacoby Medeiros sınıflandırması	11
Pseudomonas aeruginosa β-laktamazları	26
β-laktamaz inhibitörleri	28
Klavulanik asit	28
Sulbaktam	28
Tazobaktam	29
BRL 42715	29

MATERYAL VE METOD	30
Pseudomonas suşları	30
Pseudomonaslar'ın Tiplendirilmesi	31
Pseudomonaslar'dan β -laktamazların elde edilmesi.....	32
β -laktamazların izoelektrik noktalarının belirlenmesi.....	33
İzoelektrik noktaların ölçülmesi ve değerlendirilmesi.....	35
Antibiyotik duyarlılık testleri.....	36
Kojugasyon.....	37
Kullanılan özel besiyeri.....	38
BULGULAR	39
β -laktam antibiyotiklere dirençli Pseudomonas suşlarının tiplendirilmesi.....	39
β -laktam antibiyotiklere dirençli Pseudomonas suşlarının izole edildikleri klinikler.....	40
Pseudomonas suşlarında β -laktamaz varlığının belirlenmesi.....	41
β -laktamazların izoelektrik noktalarının belirlenmesi.....	42
Antibiyotik duyarlılık test bulguları.....	43
Pseudomonas suşlarında β -laktamaz tiplerinin belirlenmesi.....	46
TARTIŞMA	49
SONUÇ	65
ÖZET	66
SUMMARY	68
KAYNAKLAR	70

KISALTMALAR

β -laktam	: Beta-laktam
β -laktamaz	: Beta-laktamaz
IEF	: "Isoelectric Focusing"
PBP	: Penisilin bağlayan protein
Vmax	: Maksimum hidroliz hızı
I ₅₀	: Belirli test koşullarında enzimatik aktiviteyi % 50 oranında azaltmak için gereken inhibitör konsantrasyonu
Ki	: İnhibisyon sabiti
p-CMB	: P-kloromerküribenzoat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
MIC	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
GC	: Guanin-sitozin
PSE	: Pseudomonas spesifik enzim
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
PB	: Potasyum fosfat tampon
NCCLS	: National Committee for Clinical Laboratory Standards

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Tablo I	: β -LAKTAM ANTİBİYOTİKLERİN SINIFLANDIRILMASI.....	4
Tablo II	: β -LAKTAMAZ SINIFLANDIRILMASI.....	13
Tablo III	: β -LAKTAMAZLARIN ÇEŞİTLİ β -LAKTAM ANTİBİYOTİKLERE KARŞI AKTİVİTELERİ.....	14
Tablo IV	: ANTİBİYOTİKLERİN HAZIRLANMASINDA KULLANILAN ÇÖZÜCÜ VE SULANDIRICILAR.....	36
Tablo V	: 37 PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞUNUN ÖZGÜL ANTİSERUMLARLA TİPLENDİRİLMESİ.....	40
Tablo VI	: PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARININ İZOLE EDİLDİKLERİ KLİNİKLERE GÖRE DAĞILIMI VE SEROTİPLERİ.....	41
Tablo VII	: β -LAKTAMAZ POZİTİF PSEUDOMONAS'LARDA GÖSTERİLEN ENZİM BANTLARININ SUŞLARA GÖRE DAĞILIMI.....	43
Tablo VIII	: PSEUDOMONAS SEROTİPLERİNDE BELİRLENEN β -LAKTAMAZLARIN İZOELEKTRİK NOKTALARI.....	44
Tablo IX	: PSEUDOMONAS SEROTİPLERİNİN β -LAKTAM ANTİBİYOTİKLER İÇİN MIC DEĞERLERİ.....	45
Tablo X	: PSEUDOMONAS'LARDAN ELDE EDİLEN β -LAKTAMAZLARIN GRUPLANDIRILMASI VE SUŞLARA GÖRE DAĞILIMI	48
ŞEKİL 1	: β -LAKTAMAZLARIN PENİSİLİN ÜZERİNDEKİ HİDROLİTİK ETKİ BÖLGESİ..	7
ŞEKİL 2	: GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE İNDÜKLENEBİLİR AMP C GENLERİN EKSPRESYONUNUN KONTROLÜ İÇİN VARSAYILAN MODEL.....	17
ŞEKİL 3	: PSEUDOMONAS SUŞLARINDA IEF İLE BELİRLENEN β -LAKTAMAZ BANTLARI.....	42

GİRİŞ VE AMAÇ

Beta-laktam (β -laktam) antibiyotikler, gerek hastane içinde gerekse hastane dışında en sık kullanılan antibiyotik türevlerinin başında gelmektedir. Yaygın olarak kullanılan β -laktam antibiyotiklere karşı direncin giderek artması kaçınılmazdır. Bakteriler, farklı mekanizmalarla β -laktam antibiyotiklere direnç geliştirmektedir (1, 2). β -laktam antibiyotiklere karşı oluşan dirençte en sık gözlenen mekanizma, Beta-laktamaz (β -laktamaz) enzimleri ile bu antibiyotiklerin inaktive edilmesidir (2, 3, 4).

β -laktamaz sentezi bakterilerde **plazmid**, **transpozon** yada **kromozom** kontrolündedir (5). β -laktamaz plazmidleri, bakterilerin antibiyotiklere karşı direncinin tüm dünyada hızla yayılmasına yol açmıştır. β -laktamazlara duyarlı antibiyotikler,

β -laktamaz sentezleyen mikroorganizmaların oluşturduğu infeksiyonlarda kullanılmaz hale gelmiştir (6). β -laktamazların tiplendirilmesi, bu enzimler yoluyla oluşan direncin daha iyi anlaşılması ve bunlara karşı önlem alınması açısından gereklidir (7, 8).

Pseudomonas aeruginosa, en önemli hastane infeksiyonu etkenlerinden birisidir (9-11). Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas*'larda hangi enzimlerin daha sık bulunduğunun bilinmesi, tedavide kullanılacak β -laktam antibiyotiklerin seçiminde yol gösterici olacaktır. Etkin olabilecek β -laktamların uygun kullanımı, dirençli bakterilerin seleksiyonunu önleyerek β -laktamaz sentezleyen bakterilerin toplumda yayılmasını engelleyecektir. Bu nedenle, bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastanesi'nde yeni kuşak β -laktam antibiyotiklere dirençli *Pseudomonas* suşlarında β -laktamaz varlığının araştırılması ve belirlenen β -laktamazların "isoelectric focusing" (IEF) yöntemi ile tiplendirilmesi amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

Penisilinin bulunmasıyla infeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan yüzlerce antimikrobiyal antibiyotik geliştirilmiştir. Antibiyotikler; bakterilerde hücre duvarı sentezini önleyerek, protein sentezini önleyerek, sitoplazmik zarın yapı ve fonksiyonunu bozarak, nükleik asit sentezini önleyerek ve kimyasal yapılarındaki benzerlik yoluyla bakteri metabolizmasını bozarak etki göstermektedir. β -laktam antibiyotikler bakteride hücre duvarı sentezini önleyen antibiyotiklerdir (3, 12). Bugüne kadar geliştirilmiş olan β -laktam antibiyotiklerin sınıflandırılması Tablo I'de özetlenmektedir (13, 14, 15).

Tablo I: β -laktam antibiyotiklerin sınıflandırımı**PENİSİLİNLER**

- Doğal Penisilinler: Penisilin G, Prokain Penisilin G, Kristalize Penisilin G, Benzatin Penisilin G ve Penisilin V(fenoksimetil penisilin).
- Penisilinaza Dayanıklı Penisilinler: Metisilin, Nafsilin ve İzoksazolil Penisilinler (Kloksasilin, Dikloksasilin, Flukloksasilin, Oksasilin)
- Aminopenisilinler: Ampisilin, Amoksisilin, Bakampisilin, Siklosilin, Episilin, Hetasilin ve Pivampisilin.
- Antipsödomonal Penisilinler: Karbenisilin, İndanil Karbenisilin (karindasilin) ve Tikarsilin.
- Geniş Spektrumlu Antipsödomonal Penisilinler (üreidopenisilinler): Azlosilin, Mezlosilin ve Piperalsin.
- Amidinopenisilinler: Amdinosilin ve pivamminosilin.
- β -laktamaz İnhibitörlü Kombine Penisilinler: Ampisilin + Sulbaktam, Amoksisilin + Klavulanat, Tikarsilin + Klavulanat ve Piperasilin + Tazobaktam

SEFALOSPORİNLER

- Birinci Kuşak Sefalosporinler: Sefadroksil, Sefazolin, Sefalekssin, Sefaloridin, Sefalotin, Sefapirin, Sefradin,
- İkinci Kuşak Sefalosporinler: Sefaklor, Sefamandol, Sefanisit, Sefarenit, Sefuroksim, Lorakarbef, Sefmetazol, Sefotetan, Sefoksitin
- Üçüncü Kuşak Sefalosporinler: Sefiksım, Sefoperazon, Sefotaksim, Sefpodoksım, Seftazidim, Seftizoksım, Seftriakson

KARBAPENEMLER

- İmipenem, Meropenem, Panipenem ve Biapenem.

MONOBAKTAMLAR

- Aztroenam.

Bakterilerde sitoplazma zarının etrafını çevreleyen, bakteriye şekil veren sert bir bakteri duvarı bulunmaktadır. Bakteri hücre duvarının sertliğini veren murein, peptidoglikan yapıdadır. Bu yapı bir molekül N-asetil glukozamin bir molekül N-asetil muramik asit ve muramik aside bağlı bir peptid zincirinden oluşmaktadır. Gram pozitif bakteri hücre duvarında yüksek oranda teikoik asit ve bazılarında ek olarak polisakkarid molekülleri de bulunmaktadır. Murein tabakanın altında periplazmik aralık ve periplazma altında bakteri sitoplazma zarı vardır. Gram negatif bakterilerde hücre duvarı daha karışık olup fazla miktarda lipid ve protein içermektedir. En dışta lipoprotein ve globüler protein içeren lipopolisakkarid tabakalarının altında murein tabakası bulunur (16, 17). Murein yapının altındaki periplazmik aralıkta lipoprotein bantlar yer almakta ve belirli enzimler işlev yapmaktadır. Bu lipoprotein bantları, altında bulunan sitoplazmik zarla bağlantılıdır.

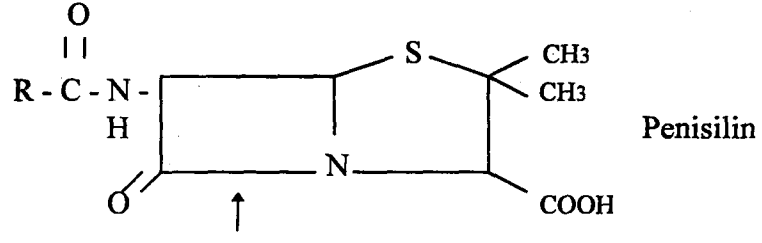
β -laktam antibiyotikler, bakterilerde hücre duvarının sentezini engellemektedir. Bu antibiyotiklerin hedefi, hücre duvarı sentezinin transpeptidasyon evresini katalize eden "penisilin bağlayan proteinler" (PBP)'dir. PBP bakteri membranı üzerinde yer almaktadır. Antibiyotik molekülleri Gram negatif bakterilerde hücre duvarı porinlerinden girdikten sonra birçok engelleri aşarak lipopolisakkarid, murein tabakalarını ve periplazmik aralığı; Gram pozitif bakterilerde ise peptidoglikan tabakayı geçerek PBP'lere ulaşmaktadır (3). β -laktam antibiyotikler PBP'lere bağlanınca PBP'nin kendi substratına bağlanmasını engellemektedir. Böylece bakteri duvar sentezi inhibe olmakta ve osmotik basınç dengesinin bozulmasıyla bakteriler erimektedir. Hücre duvarı sentezi inhibe olan bazı bakteriler yaşamını devam ettirebilmekte ve bunlara L-form bakteriler denilmektedir (16).

Bakterilerde β -laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç; PBP'lerde oluşan değişiklikler, β -laktamaz enzimleri tarafından antibiyotiğin inaktive edilmesi ve, dış membran proteinlerinde oluşan değişiklikler sonucu antibiyotiğin bakteri içine girişinin önlenmesi ile gelişmektedir.

Gram negatif bakterilerde direnç her üç mekanizma ile oluşurken, Gram pozitif bakterilerde sadece enzim ve PBP'lerdeki değişimlere bağlı direnç gelişmektedir (2, 3, 18). *Pseudomonas aeruginosa*, bu mekanizmalardan birkaçını aynı anda kullanarak, β -laktam antibiyotiklere karşı direnç kazanmaktadır. *Pseudomonas aeruginosa*'da permeabilitenin azalması ve β -laktam antibiyotiklerin PBP'lere ulaşamaması mekanizmasıyla oluşan dirençte, dış membran proteini olan F-porinleri rol oynamaktadır (19, 20).

β -LAKTAMAZLAR

Bir bakteri enzimi olan β -laktamazlar ile inaktivasyon, β -laktam antibiyotiklere karşı oluşan dirençte en sık gözlenen mekanizmadır (2, 3). Bu enzimler, β -laktam antibiyotiklerde bulunan amid bağını hidrolize ederek antibakteriyel özelliği olmayan asidik türevler oluşturmaktadır (Şekil 1). Gram negatif bakterilerde β -laktamazlar, dış membran ile sitoplazmik membran arasındaki periplazmik boşlukta bulunmaktadır (3, 4, 18, 21, 22). Gram pozitif bakterilerin β -laktamazları ise genellikle ekzoenzimlerdir ve ortama salınırlar (3, 21).



Şekil 1 : β -laktamazların penisilin üzerindeki hidrolitik etki bölgesi (21).

β -LAKTAMAZLARIN SINIFLANDIRILMASI

1940 yılında penisilinazın bulunmasıyla β -laktamazların ilk sınıflandırılmasının yapıldığı bildirilmektedir (23). 1960'lı yıllara kadar daha çok *Stafilokok*'ların β -laktamazları üzerinde çalışılmış, bu yıllardan sonra ise semisentetik penisilin ve ampisilin, sefalosporinlerden de sefaloridin ve sefalotinin geliştirilmesi ile birlikte Gram negatif bakterilerin β -laktamazları dikkat çekmeğe başlamıştır. Bu, söz konusu β -laktam antibiyotiklere *Stafilokok*'ların duyarlı olmasına karşın, Gram negatif bakterilerin direnç geliştirmesi ve bu direncin plazmid kontrolünde sentezlenen β -laktamazlar nedeniyle kısa sürede yayılmasının sonucu olmuştur (4). β -laktamaz enzimleri eskiden, penisilinaz ve sefalosporinaz olarak ayrılmış ve özgül antiserumları ile de tiplendirilmiştir. Gram negatif bakterilerdeki β -laktamazlar 1973 yılında tekrar sınıflandırılmıştır. Bu sınıflamada β -laktamazların substrat ve inhibisyon profilleri, antiserumlarla reaksiyonları temel alınmış ve β -laktamazlar beş ayrı grupta toplanmıştır. β -laktamazların poliakrilamid jelde "isoelectric focusing" ile tanımlanmasından sonra, 1976 yılında β -laktamazlar tekrar gruplandırılmıştır (24). β -laktamazların moleküler yapısı ile ilgili sınıflandırma 1980'li yıllarda yapılmış ve sınıf A, sınıf B, sınıf C, sınıf D olarak belirlenmiştir (7). Daha sonra sefüroksimi hidroliz eden β -laktamazlar da

gruplandırmaya eklenmiştir. Bush tarafından 1989 yılında, β -laktamazların kromozomal veya plazmid geçişli oluşu, substrat ve inhibisyon profilleri, moleküler ağırlıkları ve moleküler sınıfları, izoelektrik noktalarına göre sınıflandırılmıştır (25). En son yapılan sınıflama ise Bush-Jacoby-Medeiros sınıflamasıdır (7).

β -Laktamazların Sınıflandırılmasında Kullanılan Kriterler

Bugüne değin, daha çok biyokimyasal ve genetik temele dayanan substrat profili, inhibisyon profili, fiziksel özellikleri gibi çeşitli parametreler β -laktamazların tiplendirilmesi için kullanılmıştır. Bunlar içinde substrat profilleri en önemli kriterlerden biridir. Bundan başka inhibisyon profilleri ve fiziksel özellikleri de sınıflama için kullanılmaktadır. Tiplendirilmesi için tanımlanacak enzimin tek bir β -laktamaz aktivitesine sahip olması gerekmektedir. Antibiyotiklere dirençli bakterilerin birçoğunda kromozomal enzimlerin yanında birden fazla β -laktamaz içermesi, β -laktamaz tiplendirmesini güçleştirmektedir (25).

Substrat Profili

Substrat profili, β -laktamazların sınıflandırılması ve tanımlanması için kullanılan birinci parametredir ve enzimin çeşitli β -laktam antibiyotikleri hidroliz etme aktivitesini göstermektedir. β -laktamaz aktivitesi spektrofotometrik, asidimetrik ve iyodometrik yöntemlerle belirlenmektedir (26).

Maksimum hidroliz hızı (V_{max}); substrat profillerinin kıyaslanmasında tercih edilen parametredir (26). Kıyaslamalı substrat profilleri için β -laktam antibiyotikler referans olarak alınmaktadır. Penisilinlerden benzilpenisilin, ampisilin, karbenisilin ve kloksasilin, çeşitli penisilinazlar ve geniş spektrumlu β -laktamazlar arasında ayırım yapılabilmesi için seçilmektedir.

Sefalosporinler için sefaloridin referans olarak seçilmekte, kıyaslama için buna sefalotin eklenmektedir. Birçok β -laktamaz tarafından belirli oranda hidroliz edilebilen sefaloridinin tüm profillerde bulunması önerilmektedir. Yeni "extended spectrum" β -laktamazların çıkışı nedeniyle, bu substratlara sefotaksim ve seftazidim de eklenmektedir. Aztroenam monobaktamları, imipenem de karbapenemleri temsil ettiklerinden, yeni bulunan enzimleri belirlemek için dahil edilmektedir (25).

İnhibisyon Profili

β -laktamazları ayırtetmek için substrat profilleri kadar inhibitör etkileri de önem taşımaktadır. Bu amaçla klavulanik asit, aztroenam ve sulbaktam kullanılmaktadır. Sefalosporinazlar klavulanik asite kıyasla aztroenamla daha güçlü inhibe olurken, geniş spektrumlu β -laktamazların ve penisilinazların genellikle klavulanik asite göre aztroenama afiniteleri zayıftır. Kloksasilin de sefalosporinazlar için iyi bir inhibitör olduğundan β -laktamazların sınıflandırılmasında kullanılmaktadır. İnhibitör aktiviteleri genellikle I_{50} (belirli test koşullarında enzimatik aktiviteyi % 50 oranında azaltmak için gereken inhibitör konsantrasyonu) değeri ile verilmektedir. Aztroenam ve kloksasilin gibi zayıf inhibitörler için inhibisyon verilerinin I_{50} yerine K_i (inhibisyon sabiti) olarak verilmesi daha uygun olarak görülmektedir. Sulbaktam ve klavulanik asit gibi β -laktamaz inhibitörleri için ise I_{50} değeri kullanılarak, inhibitör aktivitelerinin daha kullanışlı kıyaslamaları yapılmaktadır. p-Kloromerküribenzoat (p-CMB) ile inhibisyon, katalitik olarak önemli bir sistein yan grubu olduğunu, etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ile inhibisyon ise enzimin metal iyonuna gereksinmesi olduğunu göstermektedir (25). p-CMB ve EDTA için inhibisyon verileri eski kaynaklarda tek bir

inhibitör konsantrasyonuna dayanarak (+) veya (-) şeklinde verilmiştir. Son yapılan sınıflamada inhibitörler arasına tazobaktam da dahil edilmiştir (7).

Fiziksel Özellikler

Moleküler ağırlığı: Moleküler ağırlıkların belirlenmesinde önceleri jel exclusion (eleme) kromatografisi ve sodyum dodesil sulfat-jel elektroforezi kullanılmaktaydı. Son yıllarda, enzimler saflaştırılarak aminoasit dizileri belirlenmeye başlanmış ve bu yöntem moleküler ağırlıkların belirlenmesinde tercih edilen yöntem olmuştur (25).

İzoelektrik nokta: Enzimlerin izoelektrik noktaları, "isoelectric focusing" yöntemi ile belli pH'da poliakrilamid jellerde oluşturdukları bantlara göre bulunmaktadır. IEF ilk kez 1975 yılında Mathew ve arkadaşları tarafından β -laktamazların sınıflandırımı için kullanılmıştır (24). IEF tekniğinde β -laktamazların saflaştırılması gerekmemekte ve tek bir bakterinin sentezlediği, kromozom yada plazmid kontrolündeki birkaç enzimin ayırdedilebilmesi mümkün olmaktadır (21, 24, 27). İzoelektrik noktaların ölçümünde bir laboratuvaradan diğer laboratuvara değişiklikler olabileceğinden, izoelektrik noktası bilinen β -laktamazları standart enzim olarak kullanarak karşılaştırmalı değerlerin tanımlanması ile en uygun izoelektrik noktaları elde edilir. Benzer enzimlerin izoelektrik noktalarını belirlemek için örnekler jel üzerinde yan yana yürütülmelidir. İki proteinin aynı izoelektrik noktaya sahip olup olmadığını belirlemede kullanılacak diğer teknik ise, ikisini karıştırdıktan sonra tek veya iki bant verip vermediğini değerlendirmektir (25).

Moleküler yapı: Moleküler yapıya göre β -laktamazlar sınıf A, sınıf B, sınıf C ve sınıf D olarak ayrılmaktadır (5, 7).

Sınıf A β -laktamazlar, aktif tarafında serin içeren, tercihen penisilinleri hidroliz eden enzimlerdir.

Sınıf B β -laktamazlar, β -laktamaz aktivitesi için çinko iyonuna gereksinim duyan metalloenzimlerdir.

Sınıf C β -laktamazlar, aktif taraflarında serin içeren sefalosporinazlardır.

Sınıf D β -laktamazlar ise oksasilini hidrolize eden ve aktif tarafında serin içeren β -laktamazlardır.

Yeni aminoasit dizileri veya aktif bölge dizileri belirlendikçe, bu sınıflar rutin olarak kullanılacaktır. Ancak, bugün β -laktamazların çoğu moleküler düzeyde sınıflandırılmamıştır (25). Substrat profiline dayanan fenotipik sınıflandırmada karşılaşılan en önemli sorun, bir nokta mutasyonu ile enzimin substrat ve inhibitör özgülüğünün değişmesine bağlı olarak içinde bulunduğu enzim grubunun değişmesidir. Buna karşın moleküler yapıya göre sınıflandırmanın sabit olduğu ve mutasyonlardan etkilenmediği bildirilmektedir (28).

Bush-Jacoby-Medeiros Sınıflandırması

β -laktamazların en yeni sınıflandırma şeması, 1995 yılında yapılan Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmasıdır (Tablo II). 1989 yılında yapılan Bush sınıflamasında olduğu gibi bu sınıflamada da β -laktamazlar 4 gruba ayrılmıştır (25, 29, 30). Grup 1'de klavulanik asit ile inhibe olmayan sefalosporinazlar, grup 2'de β -laktamaz inhibitörlerine duyarlı olan moleküler sınıf A veya D içinde yer alan enzimler, grup 3'de EDTA ve pCMB dışındaki β -laktamaz inhibitörlerine duyarlı olmayan metallobetalaktamazlar, grup 4'de ise klavulanik asit ile inhibe olmayan penisilinazlar bulunmaktadır. Bush-Jacoby-Medeiros sınıflamasında Bush sınıflamasından farklı olan

2be, 2br, 2f gruplarıdır. TEM ve SHV türü β -laktamazlar devamlı bir artış gösterdiği için, bu enzim türevleri grup 2b'de toplanmıştır. Geniş spektrumlu β -laktamazlar 2b grubu yerine, geniş spektrumlu aktiviteye sahip olduğunu ve 2b grubundan köken aldığını göstermek için 2be grubuna yerleştirilmiştir. 2b grubundaki β -laktamazlardan β -laktamaz inhibitörlerini afinitesi azalmış olanlar, 2br olarak gruplandırılmıştır. Şemaya eklenen üçüncü grup 2f β -laktamazlar, aktif bölgelerinde serin içeren ve klavulanik asitle inhibe olan, karbapenemi hidroliz eden enzimlerdir. Son sınıflandırma tablosunda bir önceki sınıflamaya ek olarak bazı substratlar kullanılmıştır. Örneğin, oksasilin, sefoksitin ve nitrosefin için substrat profilleri, tazobaktam ile inhibisyon profili, grup 2'deki enzimler için metisilin hidrolizi eklenmiştir (7). Gruplandırılan β -laktamazların çeşitli β -laktam antibiyotiklere karşı aktiviteleri Tablo III'de özetlenmektedir.

Tablo II: β -laktamaz sınıflandırması (7)

Bush Jacoby Medeiros	1989 Bush Grubu	Richmond- Sykes	Mitsuhashi* Sınıfı	Molekül Sınıfı	Tercih Edilen Substrat	inhibisyon		Enzimler
						CA**	EDTA	
1	1	Ia, Ib, Id	Csase	C	Sefalosporinler	(-)	(-)	Gram negatif bakterilerin AmpC enzimleri: MIR-1
2a	2a	Yok	PCase V	A	Penisilinler	(+)	(-)	Gram pozitif bakterilerin penisilinazları
2b	2b	III	PCase I	A	Penisilinler, sefalosporinler	(+)	(-)	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2b'	Yok (Sadece IV'deki K1)	CXase	A	Penisilinler, dar ve geniş spektrum sefalosporinler, monobaktamlar	(+)	(-)	TEM-3 ile TEM-26, SHV-2 ile SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	Yok	Yok	Yok	A	Penisilinler	(±)	(-)	TEM-30 ile TEM-36, TRC-1
2c	2c	II, V	PCase IV	A	Penisilinler, karbenisilin	(+)	(-)	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	2d	V	PCase II, PCase III	D	Penisilinler, kloksasilin	(±)	(-)	OXA-1 ile OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
2e	2e	Ic	CXase	A	Sefalosporinler	(+)	(-)	<i>Proteus vulgaris</i> 'in indüklenebilir sefalosporinazları
2f	Yok	Yok	Yok	A	Penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler	(+)	(-)	<i>Enterobacter cloacae</i> 'nin NMC-A'sı <i>Serratia marcescens</i> 'in Sme-1'i
3	3	Yok	Yok	B	Birçok β -laktam, karbapenemler dahil	(-)	(+)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 'nin L1'i, <i>Bacterioides fragilis</i> 'in CcrA'sı
4	4	Yok	Yok	Tanımlanmadı	Penisilinler	(-)	?	<i>Pseudomonas cepacia</i> 'nin penisilinazı

* CSase sefalosporinaz, PCase penisilinaz, CXase sefuroksimi hidrolize eden β -laktamaz

** CA klavulanik asid

Tablo III: β -Laktamazların çeşitli β -laktam antibiyotiklere karşı aktiviteleri (23).

Bush Jacoby Medeiros Grubu	Penisilin	Karbenisilin	Oksasilin	Sefaloridin	Sefotaksim	Aztroenam	İmipenem	Klavulanik Asit ile İnhibisyon
Grup 1	++	±	İnhibitör	+++	+	İnhibitör	-	-
Grup 2a	+++	+	-	±	-	-	-	++
Grup 2b	+++	+	+	++	-	-	-	++
Grup 2be	+++	+	+	++	++	++	-	++
Grup 2br	+++	+	+	+	-	-	-	-
Grup 2c	++	+++	+	+	-	-	-	+
Grup 2d	++	+	+++	+	-	-	-	±
Grup 2e	++	++	-	++	++	++	-	++
Grup 2f	++	+	?	+	+	++	++	+
Grup 3	++	++	++	++	++	-	++	-
Grup 4	++	++	++	V	V	-	-	-

+++ tercih edilen substrat, ++ iyi substrat, + hidroliz ediliyor, ± az hidroliz ediliyor, -dayanıklı, V grup içinde değişken, ? kesin değil

Grup 1

Grup 1 β -laktamazlar, sefaloridin ve sefalotini penisilinlere göre daha hızlı hidroliz eden enzimlerdir (Tablo III). Bunlar sulbaktam veya klavulanik asitle çok az inhibe olurken, aztroenam veya kloksasilinle kuvvetle inhibe olurlar. Moleküler ağırlıkları genelde 30.000 daltondan fazladır ve izoelektrik noktaları çoğunlukla 7'nin üzerindedir. Moleküler seviyede çalışılanların hepsi sınıf C'ye aittir. Bunların birçoğu kromozomal enzimlerdir, fakat içlerinde plasmid geçişli olanlarda vardır (7, 29).

Kromozomal tip 1 β -laktamazlar: *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella*, *Bacterioides* gibi bazı bakterilerde β -laktamazlar indüklenmemektedir (21, 28).

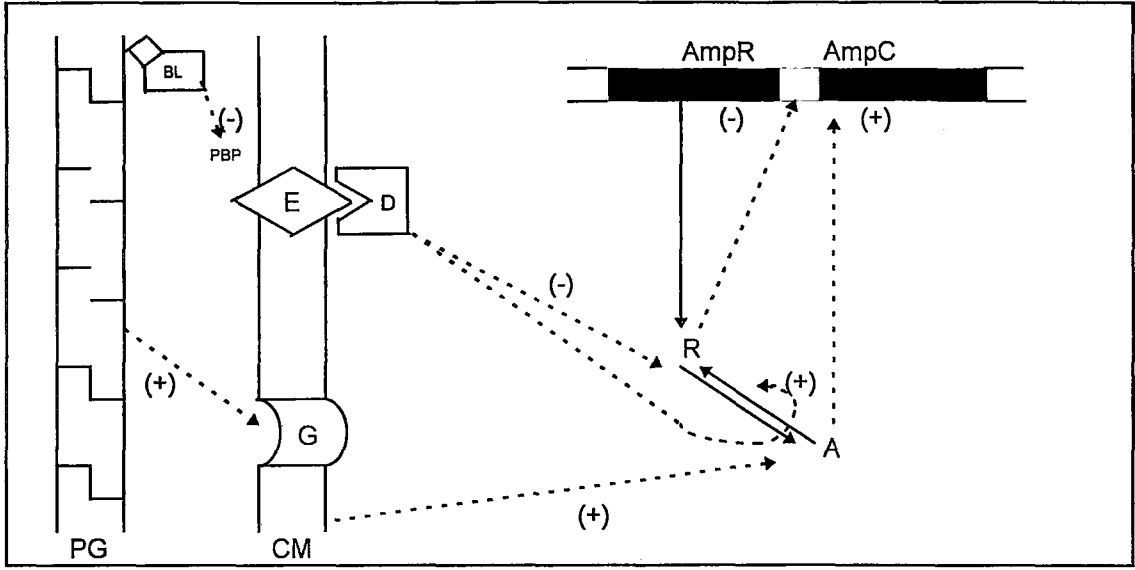
İndüklenebilir enzim sentezi; *Enterobacter*'in çeşitli türleri, *Proteus rettgeri*, *Chromobacterium violaceum*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakterilerde gözlenmektedir (21, 28, 31).

İndüksiyon, bir indükleyici varlığında β -laktamaz sentezinin geçici olarak başlatılmasıdır. Sentezlenen β -laktamaz miktarı indükleyicinin konsantrasyonu ve indüksiyon süresine bağlıdır. Enzim normalde bir repressör mekanizma ile düşük düzeyde sentezlenirken bir β -laktamaz indükleyicisi varlığında bu represyon kalkmakta ve enzim sentezinde büyük bir artış olmaktadır. Ortamdan indükleyici uzaklaştırıldığında enzim sentezi normale dönmektedir (32).

Karbapenemler (imipenem) ve α -metoksi sefalosporinler (sefoksitin, sefmetazol) güçlü indükleyicilerdir. Güçlü indükleyiciler aynı zamanda, hem *in vitro* hem de *in vivo* labil zayıf indükleyicilerin (sefotaksim, tikarsilin) aktivitesini antagonize

edebilir (33, 34). β -laktamaz inhibitörlerinden klavulanik asidin de düşük konsantrasyonlarda indüksiyona yol açtığı belirlenmiştir (32).

Son yıllarda Gram negatif bakterilerdeki kromozomal β -laktamazların indüksiyon mekanizması ayrıntılı olarak açıklanmıştır (Şekil 2). Bu bakterilerin düzenleyici gen birimlerinin (Amp C, Amp D, Amp R, Amp E, Amp G) kontrolünde sentezlenen Amp C, Amp D, Amp R'nin yanında Amp E ve Amp G proteinlerinin önemi belirlenmiştir. Amp C geni β -laktamaz kodlayan yapısal bir gendir. İndükleyici β -laktam antibiyotiğin sitoplazmik membranın üzerindeki penisilin bağlayan proteinlere bağlanmasıyla peptidoglikan sentezi bozulur. Ortaya çıkan peptidoglikan yıkım ürünlerinin periplazmik boşlukta yoğunluğu artmakta ve sitoplazmik membran üzerinde bulunan Amp G adlı proteini etkilemektedir. Duyarlı hale gelen Amp G, Amp R gen kontrolünde sentezlenen baskılayıcı (Repressör R) proteinini etkileyerek baskılayıcı formdan aktivatör (A proteini) protein şekline dönüştürmektedir. Uyarılan Amp R proteini Amp C ekspresyonunu sitümüle etmekte ve β -laktamaz sentezinin artışı sağlamaktadır. İndüksiyonun olmadığı bazal koşullarda Amp D proteini Amp E proteini ile birleşerek Amp R'yi baskılayıcı formda tutmaktadır. Ortamda indükleyici varken Amp G ve Amp D arasındaki denge Amp G lehine bozulmakta ve β -laktamaz indüksiyonu başlamaktadır. Bir mutasyonla Amp D proteini ortadan kalkacak olursa, Amp G'nin etkisinin devamlılık kazanması sonucu Amp C'nin ekspresyonunu süreklendirerek yüksek miktarda β -laktamaz sentezlenmekte ve "derepressed" mutantlar sıklıkla ortaya çıkmaktadır (35).



Şekil 2: Gram negatif bakterilerde indüklenebilir AmpC genlerin ekspresyonunun kontrolü için varsayılan model (35)

Stabil olarak "derepressed" mutantlar, indüklenebilen β -laktamaz sentezleyen bakterilerde 10^{-5} - 10^{-7} sıklıkla ortaya çıkmaktadır (1, 36). β -laktamaz sentezleri indüksiyondan bağımsız olduğu için stabil olarak "derepressed" organizmalar, labil zayıf indükleyicilere (üçüncü kuşak sefalosporinler ve üreidopenisilinler), indüklenebilen β -laktamaz içeren organizmalardan daha dirençlidir. Özellikle labil zayıf indükleyiciler, stabil olarak "derepressed" suşların seleksiyonuna neden olmakta ve bu suşlar tüm popülasyona hakim olmaktadır (32, 37, 38). Yapılan çalışmalarda yeni kuşak sefalosporinlere karşı gelişen dirençte daha çok stabil olarak "derepressed" suşların rol oynadığı belirtilmektedir (39). İndüklenebilen β -laktamaz içeren organizmaların oluşturduğu hastane infeksiyonlarının sayısında son yıllarda büyük artış görülmektedir. Bu antibiyotiklerin kullanımı sınırlanmadıkça bu sorunun giderek artacağı belirtilmektedir (22, 38).

Plazmid kaynaklı Tip I β -laktamaz: *E. coli*'den izole edilen BIL-1, *Klebsiella pneumoniae*'den izole edilen FOX-1, LAT-1, MIR-1, MOX-1 enzimleri ve *Proteus mirabilis*'ten izole edilen Cep-1 enzimleri bu gruptandır (7). Bunlar plazmid aracılığıyla sentezlenmekle birlikte kromozomal β -laktamazlara ait (β -laktamaz inhibitörlerinden etkilenmeme ve sefoksitin ve diğer sefamisin türevlerini hidrolize uğratma gibi) özelliklerini taşımaktadırlar (40-43). Farklı olarak klavulanat ve kloksasilin, MOX-1 aktivitesini inhibe etmektedir (44). Genetik çalışmalar bu enzimlerin kromozomal Amp C geninden köken aldığını göstermektedir (40, 42, 43, 44). Bunlar plazmid üzerinde yer aldıklarında indüklenebilir özelliklerini yitirmektedirler (44, 45).

Grup 2

Substrat profillerindeki farklılıklar nedeni ile grup 2 birkaç alt gruba ayrılmıştır. Çoğu moleküler sınıf olarak A'da yer almaktadır (7).

Grup 2a: Penisilinleri hidroliz etme hızı sefalosporinlere göre daha fazladır (Tablo III). Klavulanik asitle inhibe olurlarken, kloksasilin bu enzimler için etkili bir inhibitör değildir (33). Bu gruptaki enzimlerin çoğu moleküler sınıf A'nın orijinal üyelerini temsil etmektedir. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Citrobacter amalonaticus*, *Eikenella corrodens* ve *Fusobacterium nucleatum*'un enzimleri, *Bacillus cereus*'un kromozomal β -laktamazları, ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın plazmid kontrolündeki NPS-1 enzimi bu grupta yer almaktadır. NPS-1 enziminin izoelektrik noktası 6.5'tir (7, 29).

Grup 2b: Grup 2b, penisilinleri ve sefalosporinleri yaklaşık olarak eşit hızda parçalayan enzimlerdir (7). Bu gruptaki enzimler geniş spektrumlu sefalosporinleri, aztroenam ve imipenemi zayıf hidroliz ederler (Tablo III). Aztroenam ve kloksasiline göre klavulanik asitle daha iyi inhibe olurlar. Moleküler sınıfları A'dır. Geniş alana yayılmış olan plazmid kontrolündeki TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri bu gruptadır (29). TEM β -laktamazları, plazmid kontrolündeki β -laktamazların çoğunu oluşturmaktadır (46). TEM-1 ile TEM-2'nin arasındaki tek fark 1 aminoasittir (47). TEM-1 enzimi, penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidroliz edebilirken, sefotaksim, seftazidim, aztroenam gibi geniş spektrumlu β -laktam antibiyotikleri parçalayamamaktadır. TEM-1 enziminin izoelektrik noktası 5.4 iken TEM-2'ninki 5.6'dır. TEM-2 *Pseudomonas aeruginosa*'dan izole edilen sefotaksim, seftazidim imipenem direnci az olan β -laktamazdır (7, 48).

Amoksisilin ve diğer β -laktamaza duyarlı β -laktam antibiyotiklerin minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC)'lerinin *E. coli*'nin sentezlediği TEM-1 miktarından etkilendiği gösterilmiştir. β -laktamaz arttıkça MIC artmaktadır (49). TEM-1 ve TEM-2'den sonra bu gruptaki en yaygın enzim SHV-1'dir (46). SHV-1 izoelektrik noktası 7.6 olan, sefotaksim, seftazidim, imipenem hidrolizi az olan bir β -laktamazdır. Ayrıca OHIO-1, *Haemophilus influenzae* (H.influenzae)'da saptanan ROB-1, *E. coli*'den izole edilen TLE-1 enzimleri de bu gruptadır (7).

Grup 2be: Seftazidim, sefotaksim veya aztroenam gibi geniş spektrumlu antibiyotikleri hidroliz hızları, benzilpenisilin hidroliz hızının %10'undan fazla ise enzim Bush-Jacoby-Medeiros sınıflamasında grup 2be'ye alınmıştır (7). Bu enzimler, sefamisinleri veya metoksimino sefalosporinleri karbapenemleri veya penemleri

etkilememektedirler (Tablo III) (50). Bu tip geniş spektrumlu enzimler, klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam, gibi β -laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır (47). Moleküler sınıfları A olan bu gruptaki β -laktamazlar klinik olarak problem olmaya başlamıştır.

Grup 2be'nin SHV veya TEM β -laktamazlardan bir veya daha fazla aminoasit değişikliği ile oluştuğu gösterilmiştir (48, 51). TEM ile ilişkili olanların izoelektrik noktaları 5.1 ve 6.5 arasında iken SHV ailesinde olanların izoelektrik noktaları 7.0 ile 8.2 arasındadır (47). TEM-1 tam etkili bir enzimdir ve TEM-1'den aminoasit değişiklikleri ile oluşan diğer TEM türevi enzimler o kadar etkili değildir (52).

Klebsiella pneumoniae'den izole edilen CTX-1 (TEM-3) enziminin izoelektrik noktası 6.3'tür ve sefotaksime karşı yüksek hidrolitik aktivitesi vardır (53). *E.coli*'den izole edilen TEM-4 enziminin izoelektrik noktası 5.9'dur. TEM-4'ün izole edildiği suşlar, seftazidim ve sefotaksime orta düzeyde dirençlidir (46). TEM-6, izoelektrik noktası 5.9 olan bir enzimdir. TEM-6'nın izole edildiği suşun sefotaksime duyarlı olduğu bildirilmektedir (48). TEM-8 izoelektrik noktası 6.0 olan, sefotaksim ve seftazidimi hidroliz eden, imipenemi az hidroliz eden ve β -laktamaz inhibitörlerinden etkilenen bir enzimdir (7).

SHV-2, enzimi izoelektrik noktası 7.6 olan sefotaksim hidroliz edebilen fakat imipenemi parçalamayan bir enzimdir (7). SHV-3, *Klebsiella pneumoniae*'den izole edilen izoelektrik noktası 7.0 olan bir enzimdir. Bu enzimin bulunduğu suşlar sefotaksim ve seftazidime dirençlidir (48).

Kromozomal K1 β -laktamazları aztroenamı hidroliz ettiklerinden dolayı bu gruba dahil edilmişlerdir (29).

Grup 2be'de yer alan enzimlerden biri de PER-1 enzimidir. Bu enzim, ilk kez Türk orijinli hasta izolatlarında belirlenmiştir (54-56). PER-1 enzimi, *Pseudomonas aeruginosa*'dan izole edilen klavulanik asit, imipenem ve sefamisin ile inhibisyona duyarlı, geniş spektrumlu sefalosporinleri hidroliz eden enzimdir. İzoelektrik noktası 5.4'dür. PER-1 enziminde görülen geniş spektrumlu sefalosporinlerin yüksek V_{max} değerleri TEM veya SHV kökenli olanlarda bulunmamaktadır. Hibridizasyon çalışmalarına göre, bu β -laktamazın daha önceden bilinen geniş spektrumlu β -laktamazlardan türemediği gösterilmiştir (54). PER-1 geni kromozomal gibi olmasına rağmen Guanin-Sitozin (GC) toplam yüzdesinin *Pseudomonas aeruginosa* için uygun olmayışı, PER-1 enziminin plazmid kökenli olduğunu göstermektedir (57). Yapılan son çalışmalardan birinde PER-1 enzimlerinin direnç determinantlarının transfer edilebildiği gösterilmiştir (55).

Grup 2br: Grup 2br β -laktamazları β -laktamaz inhibitörlerine az afinitesi olan enzimlerdir (Tablo III). Bu gruptaki enzimlerin izoelektrik noktaları 5.0 ile 5.4 arasında değişmektedir. Grup 2br'deki β -laktamazlar plazmid geçişlidir. TEM-30'dan TEM-36'ya kadar olan TEM enzimleri, TRC-1 enzimi bu gruptadır. Moleküler sınıfları A'dır (7). Grup 2br enzimlerinin β -laktamaz inhibitörlerine affinitesinin TEM-1'e göre daha az olduğu bildirilmektedir (58).

Grup 2c: Karbenisilin hidroliz hızı benzilpenisilinin hidroliz hızının % 60'ından fazlaysa ve kloksasilin veya oksasilin hidroliz hızı benzilpenisilin hızının % 50'sinden azsa, enzim grup 2c'de yer almıştır (7). Bu gruptaki enzimler sefalosporinleri penisiline göre daha yavaş hidroliz ederler. Grup 2c'de bulunan enzimler sefotaksim ve imipenemi hidroliz etmemektedirler (Tablo III). Grup 2c

enzimler sıklıkla klavulanik asitle iyi inhibe olurken, kloksasilin veya aztroenama afiniteleri zayıftır. İzoelektrik noktalar, nötral değerlere düşmeğe eğilimlidir (30). Bu gruptaki enzimlerin moleküler sınıfı A'dır.

Bu gruba ait olan ilk enzimler *Pseudomonas*'ta bulunduğundan "*Pseudomonas spesifik enzim*" (PSE) adı verilmiştir. PSE-1, PSE-2 ve PSE-4 β -laktamazlarının *Enterobacteriaceae*'lerde de bulunduğu gösterilmiştir (46). Bu gruptaki enzimler içinde *Pseudomonas aeruginosa*'da en sık görüleni PSE-1'dir. PSE-1, *Pseudomonas aeruginosa*'dan izole edilen, izoelektrik noktası 5.7 olan bir enzimdir (31). PSE-1 enziminin sefotaksim, seftazidim ve imipenem antibiyotiklerinin substrat hidroliz hızları düşüktür. PSE-3 *Pseudomonas aeruginosa*'dan izole edilen izoelektrik noktası 6.9 olan bir enzimdir. PSE-4 enzimi, izoelektrik noktası 5.3 olan, imipenem hidrolizi az olan β -laktamazdır (30). CARB-3 enziminin izoelektrik noktası 5.75'tir (7). Karbenisilini hidroliz eden sefalosporinlere karşı aktivitesi az olan CARB-4 enziminin izoelektrik noktası 4.3'tür (59).

Bu grupta PSE-1, PSE-3, CARB-3, CARB-4 enzimlerinin yanında SAR-1, AER-1, BRO-1, BRO-2 enzimleri de bulunmaktadır. AER-1, *Aeromonas hydrophila*'dan izole edilen kromozomal geçişli bir β -laktamazdır (7). BRO-1 enzimi *Moraxella catarrhalis*'ten izole edilmiştir (7). Bu enzimin *Moraxella* suşları arasında transfer edilebildiği gösterilmiştir (31). BRO-2 sentezleyen *Moraxella catarrhalis* ve *Moraxella nonliquefaciens* suşlarından, membrana bağlı bir β -laktamaz daha elde edilmiştir. "Isoelectric focusing"te çoklu bant gösteren BRO-1 ve BRO-2'den farklı membrana bağlı bu enzimin, izoelektrik noktası 6.2'dir. Membrana bağlı β -laktamazın BRO-1 ve BRO-2'nin prekürsörü olduğu ileri sürülmektedir (60).

Grup 2d: Kloksasilin veya oksasilin'in hidroliz hızı benzilpenisilin hızının % 50'sinden fazlaysa enzim grup 2d'ye alınmıştır. Bu grupta karbenisilin hidroliz eden enzimler de bulunmaktadır (Tablo III). Bu enzimler klavulanik asitle diğer grup 2 β -laktamazlar kadar iyi inhibe olmamaktadır (7). OXA ve PSE-2 β -laktamazlar 100 mM NaCl ile inhibe olurlar (30). Moleküler sınıfları D'dir. Bu grupta OXA-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, Type A, LRC-1, M-OXA enzimleri bulunmaktadır. Bu grupta *Pseudomonas*'ın M-OXA enzimi, *Aeromonas sobria*'inin OXA-12 enzimleri kromozomal kaynaklıyken, diğerleri plazmid geçişlidir (7). Bu gruptaki enzimler içinde, *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da en çok bulunan enzimler OXA-1 ve OXA-2'dir. Her iki bakteri grubunda PSE-2 ve OXA-3 enzimlerinin görülme sıklığı, OXA-1 ve OXA-2'den sonra gelmektedir (31).

İzoelektrik noktası 7.4 olan OXA-1 enziminin sefotaksime karşı aktivitesi zayıftır. *Pseudomonas* suşlarında bulunan OXA-3 enziminin sefotaksim hidrolizi az olup izoelektrik noktası 7.1'dir (46). OXA-4 ise E.coli'den izole edilen ve izoelektrik noktası 7.5 olan bir enzimdir. *Pseudomonas aeruginosa*'dan izole edilen OXA-5 ve OXA-6 enzimlerinin izoelektrik noktaları 7.6'dır. OXA-5 ve OXA-6 enzimlerinin sefotaksim hidrolizi fazla iken imipenem hidrolizi azdır (7).

Pseudomonas aeruginosa'dan elde edilen PSE-2 (OXA-10), karbenisilin hidrolizinden dolayı PSE-1, PSE-3, PSE-4 β -laktamazlarına benzerken, oksasilin ve kloksasiline karşı etkisiyle OXA grubuna benzemektedir. PSE-2 OXA grubu gibi klorür iyonuyla inhibe olurken, kloksasilinle inhibe olmamaktadır. PSE-2'nin izoelektrik noktası 6.1'dir (61).

Pseudomonas aeruginosa'dan elde edilen OXA-11 enzimi, ülkemizde izole edilen bir suşta tanımlanmıştır. OXA-11 enziminin PSE-2'den sadece 2 aminoasit farkı vardır. TEM ve SHV kökenlerinden potent oksasilinaz oluşuyla ayrılmaktadır. OXA-11'in izoelektrik noktası 6.4'tür (62).

Pseudomonas aeruginosa'dan elde edilen LCR-1 enzimi oksasilini hızlı hidroliz ederken, kloksasilin ve metisilini yavaş hidroliz etmektedir (63).

Son birkaç yıl içinde yeni sefalosporinlerin kullanımının artışı ile oluşan seleksiyon sonucu bu tip enzimlerin sentezlendiği öne sürülmektedir (46).

Grup 2e: 2e grubunda bulunan β -laktamazlar da sefalosporinaz olmalarına karşın, grup 1'dekilerden farklı olarak klavulanik asit ile inhibe olmaktadır (Tablo III). *Bacteroides* enzimlerinin çoğu bu gruptadır. *Bacteroides fragilis*'in CepA enzimi, *Bacteroides uniformis* ve *Bacteroides vulgatus*'un kromozomal CblA ve CfxA enzimleri bu grupta yer almaktadır. *E. coli*'den izole edilen FEC-1 ile *Stenotrophomonas maltophilia*'nın L2 ve *Yersinia enterocolitica*'dan izole edilen Blal enzimleri bu grupta yer alan diğer enzimlerdir. *Proteus vulgaris*'in sentezlediği indüklenebilen sefalosporinaz enzimi de bu gruptadır (7).

Grup 2f: Karbapenemleri hidroliz eden, klavulanik asitle inhibisyonu az olan enzimlerdir (Tablo III). EDTA ile inhibe olmazlar. Bu grupta *E. cloacae*'nin indüklenebilen IMI-1 enzimi, *E. cloacae*'nin kromozomal NMC-A enzimi ve *Serratia marcescens*'in kromozomal Sme-1 enzimi yer almaktadır (7). NMC-A'nın izoelektrik noktası 6.9 iken Sme-1'inki 9.7'dir. Ayrıca IMI-1 enziminin izoelektrik noktası NMC-A enzimiyle aynıdır (64). Her üç enzimin sınıfı A olup aktif tarafında serin bulunan

β -laktamazdır (7). Sınıf A β -laktamazlar arasında, Sme-1 enzimi ile en fazla amino asid uyumunun NMC-A enzimi ile olduğu gösterilmiştir (65).

Grup 3

Metallobetalaktamazlar, β -laktam halkasını hidroliz etmek için aktif tarafta çinko iyonunu kullanırlar. EDTA gibi maddelerle inaktive edilirler. Enzimlerin hiç biri klavulanik asitle inhibe olmamakta ve hiçbirisi aktif serin kalıntısı içermemektedir. Moleküler sınıf B'de yer alırlar (30). Tüm çinko β -laktamazlar, karbapenemlere karşı aktiftirler. Karbapenemleri parçalamalarından ayrı olarak çoğunluğu penisilinazlardır ve monobaktamları hidroliz edemezler (Tablo III) (66). Bu gruptaki enzimlerin izoelektrik noktaları çoğunlukla 7.0'ın üzerindedir. Bu gruptaki en önemli enzimler, *Stenotrophomonas maltophilia*'nın L1 enzimi, *Aeromonas hydrophila*'nın kromozomal enzimleri ve *Bacteroides fragilis*'in CcrA enzimidir. L1 enzimi izoelektrik noktası 6.9 olan, imipeneme dirençli β -laktamaz inhibitörlerinden etkilenmeyen enzimdir. Bu grupta *Pseudomonas aeruginosa*'dan izole edilen plazmid geçişli β -laktamaz bulunmaktadır (7). Bu enzim; imipenemi, oksiminosefalosporinleri, 7 metoksi sefalosporinleri ve penisilinleri hidroliz ederek geniş bir substrat profili göstermektedir. İzoelektrik noktası 9.0'dır (67).

Grup 4

Bu grupta klavulanik asit ile inhibe olmayan penisilinazlar yer almaktadır. Bunların moleküler sınıfı henüz belirlenmemiştir (30). *Alcaligenes faecalis*, *Bacteroides fragilis*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas paucimobilis*, *Clostridium butyricum*'un

kromozomal enzimleri, *E. coli*'nin plazmid kontrolündeki SAR-2 β -laktamazı bu gruba dahil edilmiştir (7).

PSEUDOMONAS AERUGINOSA β -LAKTAMAZLARI

Pseudomonas aeruginosa'da β -laktamaz sentezi kromozomal, plazmid ve transpozon kontrolünde olabilmektedir (19). *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çoğu kromozom kontrolünde β -laktamaz sentez ederler (32, 68). Bu bakteride yeni kuşak β -laktam antibiyotiklere karşı oluşan direncin kromozom kontrolünde sentezlenen β -laktamazlara bağlı olduğu bildirilmektedir (36, 69, 70). Kromozomal enzimler *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çoğunda bulunan ve indüklenebilen enzimdir. Kromozomal Tip 1 β -laktamaz enzimi aktif olarak normalde sentezlenmemekte ancak, sefoksitin ve imipenem gibi güçlü indükleyiciler eklenince veya bir mutasyon sonucu, enzim sentezi stabil "derepresed" hale geçmektedir (8, 19, 34). Kromozomal β -laktamaz üreten suşlar karakteristik olarak; antipseudomonal sefalosporinlere ve β -laktamaz inhibitör kombinasyonlarına dirençli iken, antipseudomonal penisilinlere ya dirençli yada az duyarlılık göstermektedir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın kromozomal β -laktamazlarının bazal seviyesi arttıkça imipenem haricinde antipseudomonal ajanlara direnç artmaktadır (70). Tip 1 Kromozomal β -laktamazlar klavulanik asitle zayıf inhibe olmaktadır (7, 25). Klavulanik asit *Pseudomonas aeruginosa*'da bulunan kromozomal β -laktamazların indükleyicisi gibi davranmaktadır. Sulbaktam ve tazobaktam kromozomal sefalosporinazların zayıf indükleyicisidir (70).

Plazmid geçişli β -laktamazların sıklığı, *Pseudomonas aeruginosa* izolatları arasında % 10-15'den azdır. *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında en sık görülen

plazmid geçişli β -laktamazlar grup 2c'ye ait olanlardır. Bunlar arasında *Pseudomonas aeruginosa*'da PSE-1 ve PSE-4 en sık görülen β -laktamazlardır (8, 70).

Plazmid geçişli β -laktamaz üreten karbenisiline dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatları, diğerk antipseudomonal penisilinlere de dirençlidir. oğunluğusefoperazona dirençli iken diğerk 3. kuşak sefalosporinlere duyarlıdır (70). *Pseudomonas aeruginosa*'daki plazmid geçişli β -laktamazlar arasında 2. sıklıkla, grup 2d'deki oksasilin hidrolize eden β -laktamazlar bulunmaktadır (8). OXA-5, OXA-6, OXA-10 (PSE-2), OXA-11, LCR-1 enzimleri grup 2d'deki *Pseudomonas aeruginosa*'ya ait β -laktamazlardır. Sırasıyla izoelektrik noktaları 7.62, 7.68, 6.1, 6.4, 5.85 (veya 6.5)'dir. İzoelektrik noktası 5.4 olan grup 2be'de yer alan PER-1 enzimi de *Pseudomonas aeruginosa*'dan izole edilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa*'dan elde edilen izoelektrik noktası 5.6 olan TEM-2 enzimi grup 2b'dedir (7). Metallobetalaktamazlar arasında plazmid geçişli, *Pseudomonas aeruginosa*'dan izole edilen, izoelektrik noktası 9.0 olan, imipeneme dirençli bir β -laktamaz bulunmaktadır (7, 67). Grup 2a'da yer alan NPS-1 β -laktamazı da *Pseudomonas aeruginosa*'dan elde edilmiştir (7).

Birçok alışma, dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının artışının, antipseudomonal penisilinin daha sık kullanımıyla bağlantılı olduğunu göstermektedir. *Pseudomonas aeruginosa*, permeabilite değişikliğine veya plazmid geçişli metallobetalaktamaza bağlı olarak *Pseudomonas* infeksiyonunun tedavisi sırasında imipeneme direnç geliştirebilmektedir (70).

β-LAKTAMAZ İNHİBİTÖRLERİ

β-laktamaz enzimleri ile oluşan dirence karşı alınan önlemlerden biri, bu enzimlere dayanıklı β-laktam antibiyotiklerin geliştirilmesi olmuştur (22). Ayrıca β-laktam antibiyotiklerin β-laktamaz inhibitörleri ile kombinasyonlarının, β-laktamaz üreten bakterilerle oluşan infeksiyonların tedavisinde başarılı olduğu gösterilmiştir (71). Klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam, BRL 42715 β-laktamaz inhibitörleridir (72).

Klavulanik Asit

Klavulanik asit tikarsilin ve amoksisilinle kombine edilerek kullanıma sunulmuştur. Bu kombinasyonlar; *in vitro* olarak metisiline duyarlı *S. aureus* ve koagülaz negatif *Stafilokoklar*, *H. influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, yeni geniş spektrumlu β-laktamaz taşıyanları dahil *E.coli* ve *Klebsiella* cinsleri ile *Bacteroides fragilis* dahil tüm anaeroplara β-laktamazları üzerine oldukça etkilidir. Buna karşın Grup 1 indüklenabilir β-laktamaz taşıyan *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Morganella* cinslerinin enzimleri üzerine etkisi yoktur (13, 72). Bu inhibitörün diğer β-laktamaz inhibitörlerinden önemli bir farkı, Tip I β-laktamazları indükleyebilmesidir (72).

Sulbaktam

Sulbaktam, ampisilin ve sefoperazon ile kombine edilerek kullanılmakta ve bu kombinasyon *S. aerus*, *Enterobacteriaceae*, *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria*, *Legionella*, *Bacteroides* ve *Mycobacterium* türlerinin kromozomal ve plazmid geçişli β-laktamazlarına karşı etkili olmaktadır (13, 31). Grup 1 β-laktamaz

taşıyan mikroorganizmalara karşı az da olsa *in vitro* aktivitesi vardır. Klavulanik asitte görülen β -laktamaz induksiyonuna sulbaktam neden olmaz. Sulbaktam, klavulanik asite göre daha geniş spektrumlu β -laktamaz inhibitörüdür. Fakat daha az potenttir (72, 73).

Tazobaktam

Penisilinin β -laktamaz inhibitörü ile kombinasyonlarından en aktif olanı piperasilin-tazobaktam kombinasyonudur (13). Tazobaktamların β -laktamaz inhibisyon spektrumu sulbaktama, potensi klavulanik aside benzemekte ve kromozomal β -laktamazları indüklememektedir (71,73).

BRL 42715

BRL 42715, diğer inhibitörlerden (tazobaktam ve sulbaktam) farklı olarak Grup 1 β -laktamaz taşıyan Gram negatif bakterilere karşı oldukça etkilidir , ancak henüz çalışma aşamasında olan bir inhibitördür(74).

MATERYAL VE METOD

PSEUDOMONAS SUŞLARI

Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastanesi Merkez Laboratuvarı

Mikrobiyoloji Ünitesi'ne gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 170 *Pseudomonas* suşu arasından β -laktam antibiyotiklere dirençli olanlar seçildi. *Pseudomonas* suşlarının sefotaksim ve seftazidime karşı direnci, disk diffüzyon tekniği (Bauer-Kirby) uygulanarak doğrulandı (75). Her iki antibiyotiğe dirençli 38 adet *Pseudomonas* suşu numaralanarak çalışmaya alındı. *Pseudomonas* suşları -20°C 'de gliserinli **Brucella** sıvı besiyerinde çalışıncaya kadar saklandı. Çalışma yapılacağı zaman bu suşların stok kültürlerinden iki kez kanlı agara pasaj edildi. Çalışmaya alınan 38 suşun 10'u yanık sürüntüsü, 9'u idrar, 4'ü yara sürüntüsü, 3'ü pü, 2'si Beyin omurilik sıvısı(BOS), 2'si periton sıvısı, 2'si kan, 2'si nazotrakeal aspirasyon sıvısı, 1'i göğüs tüpü, 1'i kulak

sürüntüsü, 1'i boğaz sürüntüsü, 1'i trakeostomi sürüntü örneklerinden izole edilen *Pseudomonas* suşları idi.

Pseudomonas'ların Tiplendirilmesi

Rutin bakteriyolojik testlerle *Pseudomonas* olarak belirlenen izolatların *Pseudomonas aeruginosa* için selektif bir besiyeri olan **Cetrimide** agara ekimleri yapıldı ve 35°C'de 24 saat enkübe edildi. **Cetrimide** agarda üreyen bakteri kolonilerinden kanlı agara 3 kez arka arkaya pasajları yapıldı ve 42°C'de enkübe edildi (13). Ayrıca bütün suşların **Mueller-Hinton** agara ekimleri yapıldı. **Mueller-Hinton** agarda yeşil pigment yapanlar *Pseudomonas aeruginosa* olarak değerlendirildi (9). Pigmentsiz olan *Pseudomonas*'lar ise API 20 NE uygulanarak tiplendirildi. Çalışmaya alınan dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının serotipleri, polyvalan ve monovalan antiserumlarla lam aglütinasyon yapılarak belirlendi (76).

PSEUDOMONAS SUŞLARINDA β -LAKTAMAZ VARLIĞININ GÖSTERİLMESİ

Sefotaksim/seftazidime dirençli *Pseudomonas*'larda β -laktamaz varlığının gösterilmesinde "Nitrosefin yöntemi" uygulandı (21). Nitrosefine (Oxoid) sulandırıcısı katıldıktan sonra (+) 4°C'de saklandı.

Nitrosefin çözeltisinin 0.1 ml'si "microplate" in bir çukuruna damlatıldıktan sonra test edilecek bakteri kültüründen alınan birkaç koloni bu çözeltiliye eklendi. Eğer bakteri β -laktamaz sentezliyorsa, oda ısısında 10 dakika içinde sarı renkteki çözelti koyu kırmızı renge dönüştü (21).

PSEUDOMONAS'LARDAN β -LAKTAMAZLARIN ELDE EDİLMESİ

Bakterilerden β -laktamaz enzimlerinin elde edilmesi için “Eosin Metilen Blue” besiyerinde üremiş olan bakteri kültüründen alınan 3-4 koloni 10 ml **Mueller-Hinton** sıvı besiyerine ekilerek 35°C'de 18 saat enkübe edildi. Enküasyonu takiben oda ısısında **vortexle** çalkalandı. Eğer imipenemle indüksiyon yapılacaksa bu kültürden 1 ml alınıp önceden 37°C'de ısıtılmış 8 ml **Mueller-Hinton** sıvı besiyerine aktarıldı. Bu kültür 90 dakika 37°C'de enkübe edildikten sonra, 5.25 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda 1 ml imipenem eklenerek indüklenebilen tipte β -laktamazların indüksiyonu sağlandı (77,78). İmipenemin eklenmesiyle 10 ml olan bu sıvı kültür, 37°C'de 4 saat enkübe edildi. Enküasyon süresinin sonunda kültür, oda ısısında **vortex** üzerinde çalkalandı. Daha sonra oda ısısında 5000 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı dökülüp bakteri çökeltisinin üzerine 5 ml pH 7.0 potasyum fosfat tamponu (PB) konarak tekrar santrifüj edildi. Bu işlem bir kez daha tekrarlanıp üst sıvı atıldı ve çökeltinin üzerine 2 ml PB konarak **vortexte** karıştırıldı. Bu süspansiyon küçük şişelere aktarılarak buz içine yerleştirildi. Bakterilerden β -laktamazların hücre dışına çıkarılması için sonikatörde (Cole-Parmer) parçalandı. Sonikasyon işlemi sırasında bakteri süspansiyonundaki enzimlerin sıcaktan etkilenmemesi için sonikasyon 2 dakikalık sürelerle 3 kez tekrarlandı ve süspansiyon buz içinde tutuldu. Elde edilen sonikat 4°C' de 10.000 devir/dakikada 2 dakika santrifüj edildi. Enzimin bulunduğu üst sıvı tüplere alınarak -20°C'de kullanılıncaya kadar dondurularak saklandı (41,77).

BETA LAKTAMAZLARIN IZOELEKTRİK NOKTALARININ BELİRLENMESİ

β -laktamazların izoelektrik noktalarının belirlenmesinde "isoelectric focusing" yöntemi uygulandı (24, 79). IEF için "Sartophor" sistemi (Sartorius Instrumens Ltd.) kullanıldı. IEF çalışması Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları Ünitesi'nde yapıldı. Bu sistemde 2000 volt, 300 miliamper, 100 watt gücünde bir güç kaynağı, bir elektroforez tankı ve bir soğutma sistemi bulunmaktadır.

Stok Jelin Hazırlanışı

Akrilamid	17.5 gr
Bisakrilamid (N-N metilen bisakrilamid)	0.5 gr
Sukroz	25 gr
Distile su	

Akrilamid, bisakrilamid, sukroz tartılarak distile su ile 250 ml'ye tamamlandı ve manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Bu stok karışımdan aşağıdaki jel hazırlandı (24, 78, 79). Jel hazırlanışında kaynak formül laboratuvar koşullarına uyularak modifiye edildi.

Çalışma Jelin Hazırlanışı

Stok jel karışımı	9.0 ml
Ampholyte pH 5-9	0.3 ml
Ampholyte pH 3-10	0.3 ml
Riboflavin (10 mg/ 100 ml)	50.0 μ l
Ammonium persulfat (1 g/10 ml)	15.0 μ l
TEMED	3.0 μ l

Ebatları (10.1 cm x 10.1 cm) olan bir lam üzerine alkol döküldükten sonra plastik tabaka ile kaplandı. Alkolün fazlası kurutma kağıdı ile alındı. Üzerine 0.25 mm yüksekliğinde bir lastik bant yerleştirildikten sonra en üste tekrar aynı ebatta lam konuldu. Oluşturulan bu set mandallarla tutturuldu. Hazırlanan jel, lastik bant ile aralık

sağlanmış olan 2 lamın arasına kabarcık oluşturmada döküldü. Jelin donması için oda ısısında katılaşıncaya kadar takriben 1 saat kadar bekletildi (79).

Anod ve Katod Solüsyonlarının Hazırlanışı:

Anod solüsyonu için 1 M H_3PO_4 kullanıldı. Bu solüsyon, 94.4 ml distile su üzerine 5.6 ml fosforik asit (H_3PO_4 , % 85'lik) eklenerek hazırlandı.

Katod solüsyonu için 25 mM NaOH kullanıldı. 100 ml distile su içine 4 gr (NaOH) eklendikten sonra 4 kez distile su ile dilüe edildi.

IEF Testinin Yapılışı

1) Elektroforez tankın (Sartorius Sartophor system, 150'şer ml) içine bir tarafa anod solüsyonu diğer tarafa katod solüsyonu konuldu.

2) Tankın üzerine soğutma plakası yerleştirildi ve bu plaka çeşme suyuna bağlandı. Böylece soğutma plakasının içinden test süresince çeşme suyu akarak ısınma engellendi.

3) Soğutma plakasının üzerine hızlı ısı transferi için % 1-2'lik Triton-X solüsyonundan 2-3 ml damlatıldı ve kabarcık oluşturmada jel bunun üzerine yerleştirildi.

4) Anod ve katod solüsyonlarıyla teması sağlanan kağıt şeritler, jelin anod ve katod kısımlarına yerleştirildi.

5) Jelin anod tarafına 9 delikli "applicator strip" yerleştirildi. "Applicator strip", örneklerin damlatılması için eşit aralıklarda ve eşit hacimlerde delikler bulunan plastik şerittir.

6) β -laktamaz içeren sıvılardan 10'ar μ l alınarak "applicator strip" deki deliklere damlatıldı. Her test için referans enzim olarak, izoelektrik noktaları bilinen, TEM-1

(5.4), OXA-1 (7.4), SHV-1 (7.6) üç ayrı enzim kullanıldı. Referans enzimlerin yanındaki altı deliğe de izoelektrik noktaları bilinmeyen enzim sıvıları damlatıldı. Böylece her testte 9 ayrı enzim çalışıldı.

7) Anod ve katod taraflarına testin çalıştığını görebilmek için birer damla defibrine koyun kanı damlatıldı.

8) Tankın kapağı kapatılarak tank güç kaynağına bağlandı. Güç kaynağında voltaj 500 volta akım 50 miliampere ve güç 50 watta ayarlandı.

9) IEF işlemi anod ve katod tarafındaki koyun kanı bantları birleşinceye kadar devam etti. Bu işlem bu çalışmada 1.5 saat sürdü.

10) İşlem bittiğinde güç kaynağı kapatıldı ve jel tanktan çıkartılarak beyaz bir kağıdın üzerine yerleştirildi. Bantların görünür hale gelmesini sağlamak için jelin üzerine nitrosetin çözeltisi damlatıldı ve bir baget ile yayıldı. Kırmızı bantlar olarak gözlenen β -laktamaz bantlarının anoda olan uzaklıkları logaritmik kağıtta işaretlendi. Bu yöntemde çıkan bantlar 10 dakika sonra kaybolmakta ve her bant farklı sürelerde çıkabilmektedir. Bu nedenle çıkan bantların seri bir şekilde kaydedilmesi gerekti.

İzoelektrik Noktaların Ölçülmesi ve Değerlendirilmesi

Logaritmik kağıtta işaretlenen bantların izoelektrik noktalarının belirlenmesi, referans enzimler kullanılarak yapıldı. Enzimlerin tanımlanması, izoelektrik noktaları ile birlikte antibiyotik duyarlılık paternleri gözönüne alınarak yapıldı.

Bazı suşlarda β -laktamaz varlığını nitrosetin yöntemi ile gösterilmesine rağmen, bant elde edilemedi. Bunları görünür hale getirmek için jel içine % 0.05 oranında Triton-X katıldı (78, 79).

ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ

Çalışmaya alınan 38 adet *Pseudomonas* suşunun minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) belirlemek için “mikrodilüsyon” yöntemi uygulandı (80). Yapılan testlerde kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanıldı.

Kullanılan Antibiyotikler

Antibiyotik duyarlılık testlerinde 3. kuşak sefalosporinlerden sefoperazon (Pfizer), sefotaksim (Eczacıbaşı), seftazidim (Lilly), karbapenemlerden imipenem (Merck Sharp and Dohme), ayrıca sefoperazon ile kombine olarak sulbaktam (Pfizer) kullanıldı. Antibiyotiklerin 4096 µg/ml’lik konsantrasyonları “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS)’a göre hazırlandı (80). Kullanılan antibiyotikler için gereken çözücü ve sulandırıcı sıvılar Tablo IV’de verilmektedir.

Tablo IV: Antibiyotiklerin hazırlanmasında kullanılan çözücü ve sulandırıcılar (80).

<u>Antibiyotik</u>	<u>Çözücü</u>	<u>Sulandırıcı</u>
Seftazidim	Sodyum karbonat	Su
Sefriakson	Su	Su
Sefoperazon	Su	Su
Sefotaksim	Su	Su
Sulbaktam-Sefoperazon	Su	Su
İmipenem	pH 7 0.01 M PB	pH 7 0.01 M PB

Mikrodilüsyon Yöntemi:

Mikrodilüsyon yönteminde **Mueller-Hinton** sıvı besiyeri kullanılarak U tabanlı “microplate” lerde her antibiyotiğin ayrı ayrı 1024-1 arasında (1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1) katlı sulandırımları yapıldı. Öncelikle bütün kuyucuklara 50’şer µl **Mueller-Hinton** sıvı besiyeri konuldu. Antibiyotik konsantrasyonu istenilen antibiyotik

konsantrasyonunun 4 katı olacak şekilde (4096 µg/ml) hazırlandı ve bütün ilk kuyucuklara 50'şer µl dağıtıldı. Sekizlik (multikanal) otomatik mikropipet kullanılarak antibiyotiğin katlı dilüsyonu 12. kuyucuğa kadar 50'şer µl aktarılarak devam edildi. Antibiyotik konulmayan son 12. kuyucuk kontrol olarak kullanıldı.

Her birinde 0.5 ml **Brain Heart infusion** sıvı besiyeri bulunan tüplere *Pseudomonas* kültürlerinden 3-5 koloni ekim yapıldı ve 35°C'de 4 -8 saat enkübe edildi (81). Enkübasondan sonra bakteri süspansiyonu 10⁷ bakteri/ml içerecek şekilde sulandırıldı. Tüm kuyucuklara 50'şer µl bu bakteri süspansiyonundan eklenerek 37°C'de 18 saat enkübasyona bırakıldı. Enkübasyonu takiben bakteri üreme inhibisyonları değerlendirildi. Bakteri üremesini engelleyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu, antibiyotiğin MIC değerini vermektedir (80).

KONJUGASYON

Konjugasyon işleminde *Pseudomonas* suşları verici, *E. coli* J-53-1 suşu alıcı olarak kullanıldı. *E. coli* J-53-1 nalidiksik asit ve rifampine dirençli iken, sefotaksim, sefoperazon, sefoperazon-sulbaktam, seftazidim ve imipeneme duyarlı idi.

Konjugasyonun Yapılışı:

Pseudomonas ve *E. coli* J-53-1 suşlarından 3-4 koloni alınarak 10 ml **Mueller-Hinton** sıvı besiyerine ekildi ve 37°C'de 1 gece enkübe edildi. Ertesi gün kültürler oda ısısında **vortexte** karıştırıldı. Kültürlerden 1'er ml alınarak 37°C'de 10 ml **Mueller-Hinton** sıvı besiyerine aktarıldı ve 37°C'de 3-4 saat enkübe edildi. *Pseudomonas* ve *E. coli* kültürleri bir tüpte karıştırıldıktan sonra karışım vortexle çalkalandı ve 5000 devir/dakikada 10-15 dakika santrifüj edildi. Çökeltinin üzerine 10 ml pH 7.0 PB

eklenerek Pastör pipeti ile karıştırıldı ve **vortexle** oda ısısında çalkalandı. Eküvyonla her bir kültürden örnek alınarak **Nutrient** agar yüzeyine ekim yapıldı ve bir gece 37°C'de enkübe edildi. **Nutrient** agarda üreyen bakterilerin üzerine 2 ml serum fizyolojik eklendi ve eküvyonla süspanse edildi. Bu süspanسیون Pastör pipeti yardımıyla bir tüpe alındı. Her bir tüpten eküvyonla örnek alınarak içerisinde antibiyotik bulunan 2 ayrı **Mueller-Hinton** agar besiyerine (Birinci **Mueller-Hinton** agar 100 µg/ml nalidiksik asit + 10 µg/ml sefotaksim, ikinci **Mueller-Hinton** agar ise 100 µg/ml nalidiksik asit + 10 µg/ml seftazidim içermektedir) tek koloni düşecek şekilde ekimleri yapıldı. Besiyerleri 37°C'de 1 gece enkübasyondan sonra üreyen kolonilerden "**Eosin Metilen Blue**" besiyerine pasajlar yapıldı ve 1 gece 37°C'de bekletildi. **Eosin Metilen Blue** besiyerinde tipik *E. coli* görünümünde olan suşların *E. coli* olduğunu belirlemek için biyoşimik testler yapıldı ve β-laktamaz sentezleyip sentezlemediği doğrulandı (55, 62).

KULLANILAN ÖZEL BESİYERİ

Cetrimide Agar

Pepton	20 gr
Magnezyum sülfat	1.4 gr
Potasyum sülfat	10 gr
Agar	13.6 gr
Cetrimide	0.3 gr
Gliserol	10 ml
Distile su	1000 ml (82).

Kimyasal maddeler ısıtılarak eritildi. Yaklaşık 5 ml olacak şekilde tüplere dağıtıldı ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

BULGULAR

β -LAKTAM ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇLİ PSEUDOMONAS SUŞLARININ TIPLENDİRİLMESİ

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 170 *Pseudomonas* suşu arasında β -laktam antibiyotiklere (sefotaksim, seftazidim) dirençli olan 38 suş seçildi. Bu 38 suşun herbiri ayrı hastadan alınan klinik örneklerden izole edildi.

Sefotaksim/seftazidime dirençli *Pseudomonas* suşlarının hepsi **Cetrimide** agarda ve 42°C'de üredi. Bu suşlardan 24'ünün **Mueller-Hinton** agarda yeşil pigment oluşturarak üremesi nedeniyle *Pseudomonas aeruginosa* olarak kabul edildi (9). Yeşil pigment oluşturmayan diğer 13 suş ise, API 20 NE ile *Pseudomonas aeruginosa* olarak tiplendirildi. Geriye kalan bir suşun, API 20 NE ile *Pseudomonas cepacia* olduğu belirlendi. β -laktam antibiyotiklere dirençli olan 37 *Pseudomonas aeruginosa* suşu

özgül antiserumlarla da serotiplendirildi. Tiplendirilen 37 *Pseudomonas aeruginosa*'nın 9'unun O11 (% 24.3), 8'inin II (% 21.6), 5'inin O4 (% 13.5), 2'sinin O12 (%5.4) serotipinde olduğu belirlendi. Özgül antiserumlarla 13 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun serotipi belirlenemedi (Tablo V). Numaralandırılan *Pseudomonas*'lardan 1-9 nolu suşların O11, 10-17 nolu suşların II, 18-22 nolu suşların O4, 23-24 nolu suşların ise O12 tipinde olduğu belirlendi. Diğer 25-37 nolu suşlar serotiplendirilemedi.

Tablo V: 37 *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının özgül antiserumlarla tiplendirilmesi.

Suş No	Serotipi	Sayı	%
1-9	O11	9	24.3
10-17	II	8	21.6
18-22	O4	5	13.5
23-24	O12	2	5.4
25-37	Tiplendirilemedi	13	35.2
Toplam	-	37	100

β -laktam Antibiyotiklere Dirençli *Pseudomonas* Suşlarının İzole Edildikleri Klinikler

β -laktam antibiyotiklere dirençli 37 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun 12'si yanık ünitesi, 5'i beyin cerrahi, 3'ü yenidoğan, 2'si genel cerrahi, 2'si çocuk cerrahi, 2'si pediatrik intaniye, 2'si kulak burun boğaz, 1'i pediatrik nefroloji, 1'i göğüs kalp damar cerrahi, 1'i ortopedi, 2'si üroloji, 1'i süt çocuğu, 1'i dermatoloji, 2'si pediatrik hematoloji-onkoloji kliniği hastalarından, *Pseudomonas cepacia* suşu ise infeksiyon kliniğinden izole edildi (Tablo VI).

Tablo VI: *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının izole edildikleri kliniklere göre dağılımı ve serotipleri.

Serotip	011	II	04	012	Tiplendirilemeyen	Toplam
Yanık Ünitesi	4	-	3	-	5	12
Beyin Cerrahi Servisi	-	4	1	-	-	5
Yenidoğan Servisi	1	-	1	-	1	3
Genel Cerrahi	-	-	-	1	1	2
Çocuk Cerrahi	-	1	-	1	-	2
Pediyatri İntaniye	2	-	-	-	-	2
Kulak Burun Boğaz	-	2	-	-	-	2
Pediyatri Nefroloji	-	-	-	-	1	1
Göğüs Kalp Damar Cerrahi	-	-	-	-	1	1
Ortopedi	1	-	-	-	-	1
Üroloji	1	1	-	-	-	2
Süt Çocuğu	-	-	-	-	1	1
Dermatoloji	-	-	-	-	1	1
Pediyatri Hematoloji Onkoloji	-	-	-	-	2	2
Toplam	9	8	5	2	13	37

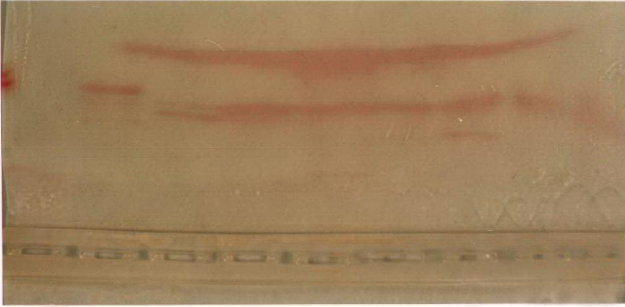
PSEUDOMONAS SUŞLARINDA β -LAKTAMAZ VARLIĞININ BELİRLENMESİ

Nitrosefin yöntemi ile incelenen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas cepacia* (37 *Pseudomonas aeruginosa*, bir *Pseudomonas cepacia*) suşlarının hepsinde β -laktamaz sentezlendiği gözlemlendi (21).

β -LAKTAMAZLARIN İZOELEKTRİK NOKTALARININ BELİRLENMESİ

"Isoelectric focusing" yöntemiyle incelenen 38 *Pseudomonas* suşunun 24'ünde bant gösterilmesine rağmen, 14'ünde enzim bantı gösterilemedi (Şekil 3). İndüklenebilir β -laktamaz enzimleri olabilir düşüncesi ile imipenem ile indüksiyon yapıldı. İndüksiyona rağmen bant gösterilememesi üzerine "unsoluble" enzim araştırmak için % 0.05 oranında Triton-X katıldı (78). Jele Triton-X eklenmesiyle 14 suşun 9'unda bant görülür hale geldi. Geriye kalan 5 suşta β -laktamaz varlığı gösterilmesine rağmen bant elde edilemedi.

"Isoelectric focusing" yöntemiyle 14 *Pseudomonas* suşunda tek bir enzim bantı bulunurken diğer 19 suşta 2 yada daha fazla sayıda β -laktamaz bantı gözlemlendi (Tablo VII). *Pseudomonas* suşlarından 4'ünde izoelektrik noktası 5.4'den küçük, 8'inde izoelektrik noktası 5.4, 29'unda izoelektrik noktası 5.5-7.5 arasında, 4'ünde izoelektrik noktası 7.6, 8'inde izoelektrik noktası 7.6'dan büyük olan enzimler bulundu. *Pseudomonas* serotiplerinde belirlenen β -laktamazların izoelektrik noktaları ve bant sayıları Tablo VIII'de özetlendi.



Şekil 3: *Pseudomonas* suşlarında IEF ile belirlenen β -laktamaz bantları.

İzoelektrik noktası 5.4'den küçük olan enzim bantları 11, 24, 28 ve 38 nolu suşlarda; izoelektrik noktası 5.4 olan enzim bantları ise 18, 19, 20, 23, 27, 32, 34 ve 38 nolu suşlarda bulundu. Referans enzim olarak kullanılan TEM-1 enziminin izoelektrik noktası 5.4'tür. Bu enzim bantları referans olarak kullanılan ve izoelektrik noktası 5.4 olan TEM-1 enzime benzemektedir. İzoelektrik noktası 5.5-7.5 arasında olan enzim bantları 1, 2, 4, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 36 ve 37 nolu suşlarda bulundu. Çalışılan *Pseudomonas*'ların çoğu izoelektrik noktaları 5.5-7.5 arasında olan enzimler içermekte idi. İzoelektrik noktası 7.6 olan enzim bantları 10, 22, 30 nolu suşlarda; izoelektrik noktası 7.6'dan büyük olan enzim bantları ise 1, 12, 19, 20, 21, 22, 36 ve 38 nolu suşlarda bulundu. İzoelektrik noktası 7.6 olan enzim bantları referans olarak kullanılan ve izoelektrik noktası 7.6 olan SHV-1 enzime benzemektedir.

ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TEST BULGULARI

Toplam 37 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun 25'i sefoperazon sulbaktama, 34'ü sefotaksime, 26'sı seftazidime, 17'si imipeneme, 37'si sefoperazona dirençli idi. *Pseudomonas* serotiplerinin β -laktam antibiyotikler için MIC değerleri Tablo IX'da özetlendi. Tek suş olarak izole edilen, imipenem, sefoperazon/sulbaktam gibi antibiyotiklere direnç belirlenemeyen *Pseudomonas cepacia* suşu ise sefotaksim, seftazidim ve sefoperazona dirençli idi.

Tablo VII: β -laktamaz pozitif *Pseudomonas*'larda gösterilen enzim bantlarının suşlara göre dağılımı

Bant Sayısı	Suş sayısı	%	Suş No
Bant Olmayan	5	13.2	3,5,6,9,35
Bant sayısı 1	14	36.9	2,4,7,8,13,14,15,17,25,29, 30,31,33,37
Bant Sayısı 2	14	36.9	1,10,11,12,16,18,19,21,22,23,24,26,32,36
Bant Sayısı 3	4	10.6	27,28,34,38,
Bant Sayısı 4	1	2.4	20
Toplam	38	100.0	

Tablo VIII: *Pseudomonas* serotiplerinde belirlenen β -laktamazların izoelektrik noktaları.

Suş No	Belirlenen Serotipi	β -laktamazların İzoelektrik Noktaları				
		<5.4	5.4	5.5-7.5	7.6	>7.6
1	O11	(-)	(-)	(7.0)	(-)	(7.9)
2	O11	(-)	(-)	(6.3)	(-)	(-)
3	O11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	O11	(-)	(-)	(6.1)	(-)	(-)
5	O11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	O11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
7	O11	(-)	(-)	(7.5)	(-)	(-)
8	O11	(-)	(-)	(6.2)	(-)	(-)
9	O11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
10	II	(-)	(-)	(6.5)	(+)	(-)
11	II	(4.2)	(-)	(6.3)	(-)	(-)
12	II	(-)	(-)	(6.5)	(-)	(7.9)
13	II	(-)	(-)	(6.4)	(-)	(-)
14	II	(-)	(-)	(6.0)	(-)	(-)
15	II	(-)	(-)	(6.5)	(-)	(-)
16	II	(-)	(-)	(6.3) (7.5)	(-)	(-)
17	II	(-)	(-)	(6.0)	(-)	(-)
18	O4	(-)	(+)	(6.9)	(-)	(-)
19	O4	(-)	(+)	(-)	(-)	(8.9)
20	O4	(-)	(+)	(6.0)	(-)	(7.8) (9.8)
21	O4	(-)	(-)	(5.8)	(-)	(8.4)
22	O4	(-)	(-)	(-)	(+)	(9.0)
23	O12	(-)	(+)	(7.3)	(-)	(-)
24	O12	(5.2)	(-)	(5.9)	(-)	(-)
25	Tiplendirilemedi	(-)	(-)	(7.1)	(-)	(-)
26	Tiplendirilemedi	(-)	(-)	(6.0) (7.4)	(-)	(-)
27	Tiplendirilemedi	(-)	(+)	(5.9) (7.5)	(-)	(-)
28	Tiplendirilemedi	(4.5)	(-)	(5.8) (6.0)	(-)	(-)
29	Tiplendirilemedi	(-)	(-)	(7.4)	(-)	(-)
30	Tiplendirilemedi	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
31	Tiplendirilemedi	(-)	(-)	(5.9)	(-)	(-)
32	Tiplendirilemedi	(-)	(+)	(7.0)	(-)	(-)
33	Tiplendirilemedi	(-)	(-)	(7.3)	(-)	(-)
34	Tiplendirilemedi	(-)	(+)	(6.3) (7.1)	(-)	(-)
35	Tiplendirilemedi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
36	Tiplendirilemedi	(-)	(-)	(7.3)	(-)	(7.8)
37	Tiplendirilemedi	(-)	(-)	(7.0)	(-)	(-)
38*	(-)	(4.5)	(+)	(-)	(-)	(7.8)

* *Pseudomonas cepacia*

Tablo IX: *Pseudomonas* serotiplerinin β -laktam antibiyotikler için MIC değerleri

Suş No	Belirlenen Serotipi	MIC Değerleri				
		Sefoperazon	Sefoperazon /Sulbaktam	Sefotaksim	Seftazidim	İmipenem
1	O11	64	32	512	1	1
2	O11	128	128	1024	64	8
3	O11	512	32	>1024	1	8
4	O11	256	64	1024	8	8
5	O11	1024	64	512	4	4
6	O11	>1024	32	>1024	256	8
7	O11	>1024	128	32	>1024	32
8	O11	512	32	1024	1	32
9	O11	>1024	64	1024	512	32
10	II	512	64	1024	512	32
11	II	1024	64	256	>1024	2
12	II	512	128	512	32	16
13	II	>1024	256	512	>1024	8
14	II	>1024	32	512	64	1
15	II	128	64	512	64	8
16	II	512	4	1024	16	2
17	II	>1024	64	256	256	16
18	O4	512	16	1024	256	8
19	O4	>1024	64	>1024	8	16
20	O4	>1024	64	512	128	16
21	O4	>1024	64	1024	128	16
22	O4	512	128	512	512	16
23	O12	512	64	512	512	16
24	O12	512	32	64	1	8
25	Tiplendirilemedi	1024	128	>1024	64	16
26	Tiplendirilemedi	256	4	512	8	4
27	Tiplendirilemedi	>1024	256	512	>1024	4
28	Tiplendirilemedi	>1024	32	256	256	2
29	Tiplendirilemedi	512	32	32	1	4
30	Tiplendirilemedi	1024	64	1024	512	32
31	Tiplendirilemedi	1024	64	64	32	32
32	Tiplendirilemedi	512	8	512	256	8
33	Tiplendirilemedi	1024	64	1024	128	4
34	Tiplendirilemedi	>1024	64	512	32	32
35	Tiplendirilemedi	1024	64	32	16	16
36	Tiplendirilemedi	128	64	128	256	4
37	Tiplendirilemedi	256	64	64	128	64
38*	(-)	>1024	16	512	32	8

* *Pseudomonas cepacia*

PSEUDOMONAS SUŞLARINDA β -LAKTAMAZ TİPLERİNİN BELİRLENMESİ

Pseudomonas suşlarında, bulunan enzimlerin izoelektrik noktaları ve antibiyotiklerin *Pseudomonas*'lara karşı *in vitro* olarak etkileri incelenerek β -laktamazlar gruplandırıldı. Özellikleri birbirine benzeyen enzimlerin gruplandırılmasında Bush-Jacoby-Medeiros sınıflama sistemi uygulandı.

β -laktamaz inhibitörlerinden etkilenmeyen, sefalosporinlere dirençli *Pseudomonas*'larda bulunan ve izoelektrik noktası 7.6'nın üzerinde olan enzimler, grup I enzimleri olarak gruplandırıldı. Grup I enzimleri 1, 12, 19, 20, 21, 22 ve 36 nolu *Pseudomonas* suşlarında bulundu.

β -laktamaz inhibitörlerinden etkilenen, 3. kuşak sefalosporinleri hidrolize eden ve imipeneme duyarlı bazı *Pseudomonas*'lardan elde edilen enzimlerin izoelektrik noktası 5.4, 6.0 ve 6.3 idi. Bu enzimler, izoelektrik noktalarına ve antibiyotiklerden etkilenme durumlarına göre PER-1, TEM-8, ve TEM-3 enzimlerinin özelliklerini taşıdığından, grup 2be içinde gruplandırıldı. Bunlar geniş spektrumlu enzimler olup 14, 16, 18, 26, 28, 32 ve 38 nolu *Pseudomonas* suşlarında bulundu. Referans enzim olarak kullanılan TEM-1 enziminin izoelektrik noktası 5.4, SHV-1 enziminin izoelektrik noktası 7.6 ve OXA-1 enziminin izoelektrik noktası 7.4'dür.

β -laktamaz inhibitörleriyle inhibe olan, sefalosporinlere ve imipeneme duyarlı *Pseudomonas*'ta bulunan enzimlerin izoelektrik noktaları 5.2 ve 5.9 idi. Bu enzimler, izoelektrik noktalarına ve antibiyotiklerden etkilenme durumlarına göre PSE-1 ve PSE-4 enzimlerinin özelliklerini taşıdığından grup 2c enzimleri içinde gruplandırıldı. Bu grup enzimler serotipi O12 olan 24 nolu *Pseudomonas* suşunda bulundu.

β -laktamaz inhibitörleriyle inhibisyonu az, sefalosporinlere dirençli ve imipeneme duyarlı *Pseudomonas*'lardan elde edilen enzimlerin izoelektrik noktaları 6.1, 6.4 ve 7.4 idi. Bu enzimler, izoelektrik noktalarına ve antibiyotiklerden etkilenme durumlarına göre OXA-1, OXA-4, OXA-11 ve OXA-17 özelliklerini taşıdığından grup 2d enzimleri içinde gruplandırıldı. Grup 2d enzimleri, grup 2'de yer alan diğer enzimler kadar klavulanik asitten etkilenmemektedir. Bunların içerisinde referans olarak kullanılan OXA-1 enzimi sefotaksimi hidroliz etmemektedir. OXA-1 enzimi 29 nolu; OXA-4 enzimi 16, 26, 27, 33 ve 36 nolu; OXA-11 enzimi 2, 11, 13 ve 15 nolu; OXA-17 enzimi 4 nolu *Pseudomonas* suşlarında bulundu.

β -laktamaz inhibitörlerinden etkilenmeyen, sefalosporinlere ve imipeneme dirençli bazı *Pseudomonas*'lardan elde edilen enzimlerin izoelektrik noktaları 5.8 ve 7.0 idi. Bu enzimler, izoelektrik noktalarına ve antibiyotiklerden etkilenme durumlarına göre L1 ve grup 3 metallobetalaktamaz özelliklerini taşıdığından grup 3 içinde gruplandırıldı. L1 enzimi, 25, 34 ve 37 nolu; grup 3 metallobetalaktamaz ise 21 ve 31 nolu *Pseudomonas* suşlarında bulundu.

Enzim bantı gösterilen 33 *Pseudomonas* suşunun 7'sinde grup I, 7'sinde grup 2be, 2'sinde grup 2c, 11'inde grup 2d, 7'sinde grup 3 enzimleri bulundu. İzoelektrik noktaları 4.2, 4.5, 5.4, 5.8, 5.9, 6.0, 6.2, 6.3, 6.5, 6.9, 7.0, 7.3, 7.5, 7.6, 7.8 olan 25 kadar enzim bantı tiplendirilemedi. Tiplendirilen enzimler ve dahil olduğu enzim grupları Tablo X'da özetlendi.

Çalışmada konjugasyon testleri ile *Pseudomonas* suşlarında izole edilen enzimlerin plazmid kaynaklı olup olmadığı kesin olarak belirlenemedi.

Tablo X: *Pseudomonas*'lardan elde edilen β -laktamazların gruplandırılması ve suşlara göre dağılımı

Suş no	Enzimler	Enzim Grupları*
1,12,19,20,21,22,36 n=7	Grup 1 enzimler	Grup 1
14,16,18,26,28,32,38 n=7	TEM-3, TEM-8, PER-1	Grup 2be
24 n=1	PSE-1, PSE-4	Grup 2c
2, 4,11,13,15,16,26,27,29,33,36 n=11	OXA-1, OXA-4, OXA-11, OXA-17	Grup 2d
21,25,31,34,37 n=5	L1, diğer Grup 3 enzimi	Grup 3

* Bush-Jacoby-Medeiros sınıflamasına göre.

TARTIŞMA

Bütün bakterilerin değişik tip ve sayıda enzimler içerdęi bilinmektedir. β -laktamaz adı verilen bu enzimler, *Enterobacteriaceae* familyası üyelerinde daha fazla oranda sentezlenmektedir. Bunların bazıları kromozomal, bazıları ekstrakromozomal geçişlidir. *Pseudomonas* suşlarında bulunan β -laktamazlar enterobakteri'lerde sentezlenen β -laktamazlarla aynı özellikleri taşımaktadır. Nonfermantatif bakteriler içinde yer alan *Pseudomonas aeruginosa*'nın her bir serotipinde farklı β -laktamazlar bulunabilmektedir. β -laktamazlar β -laktam antibiyotiklerini hidrolize eden moleküllerdir (2). Kromozomal veya plazmid geçişli ekstrakromozomal enzimler içeren *Pseudomonas*'lar, antibiyotiklere karşı sıklıkla direnç kazanmaktadır. β -laktam antibiyotiklere karşı gelişen dirençte en sık gözlenen mekanizma, bakteriler tarafından

sentezlenen β -laktamaz enzimlerinin antibiyotikleri inaktive etmeleridir. Değişik sayıda β -laktamaz sentezleyen *Pseudomonas* suşlarının farklı antibiyotiklere karşı direnç düzeyleri de farklıdır (1, 3, 4, 50).

Çalışmaya alınan β -laktam antibiyotiklere dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının serotipleri belirlendikten sonra, "nitrosefin yöntemi" ile β -laktamaz varlığı araştırıldı ve bütün suşlarda β -laktamaz bulunduğu gösterildi. Bu suşlarda bulunan β -laktamazlar, IEF yöntemiyle enzimlerin izoelektrik noktaları belirlenerek ve antibiyotiklerden etkilenme durumlarına bakılarak tiplendirildi.

Yapılan çalışmalarda *Pseudomonas aeruginosa* suşları içinde en sık olarak sıklık sırasıyla O6, O11, O16 serotipleri bulunmuştur (76). *Pseudomonas aeruginosa* serotiplerinin belirlenmesi üzerinde bölgemizde ilk kez rapor edilen bu çalışmada, *Pseudomonas*'lar % 24.3 oranında O11, % 21.6 oranında II, % 13.5 oranında O4, % 5.4 oranında O12 olarak serotiplendirildi. Serotipi belirlenemeyen suşların oranı % 35.2 idi. *Pseudomonas aeruginosa* suşları arasında en sık O11 serotipine rastlandı. Bu bulgulara benzer sonuçlandırılan çalışmalar vardır (83, 84). Colom ve arkadaşlarının (39) çalışmalarında ise ilk sırada O6, ikinci sırada O11 serotipleri bulunmuştur. Değişik merkezlerde yapılan diğer bazı çalışmalarda *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında O12 serotipinin görülme sıklığının arttığı ortaya çıkarılmış ve bu suşların çoğunluğunun hem β -laktam antibiyotiklere hem de aminoglikozidlere dirençli olduğu gösterilmiştir (76, 85).

IEF yöntemi ile β -laktamazların saflaştırılmasına gerek olmaksızın tek bir bakterinin sentezlediği, kromozom veya plazmid kontrolündeki birkaç enzim ayırt edilebilmektedir (21, 24, 27). Küçük bir jel üzerinde bantlar arasındaki uzaklık kaydedilirken oluşabilecek milimetrik kaymalar izoelektrik noktalarda farklı değerler

verebileceğinden, enzimlerin tanımlanmasında her enzim için izoelektrik noktaların ± 2 değerleri de gözönüne alınmalıdır (77). β -laktamazların tam olarak tiplendirilmesi için; transfer deneylerinin yapılması, substrat hidrolizi ve inhibisyon kinetiklerinin belirlenmesi, plazmid ve restriksiyon analizlerinin incelenmesi, aynı plazmid üzerinde nakledilebilen aminoglikozid, tetrasiklin, kloramfenikol direnci gibi diğer direnç belirleyicilerinin saptanması ve ayrıca enzimin saflaştırılarak biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi gerekmektedir (26, 47).

Bu çalışmada, 38 *Pseudomonas* suşunun 4'ünde izoelektrik noktası 5.4'den küçük, 8'inde izoelektrik noktası 5.4, 29'unda izoelektrik noktası 5.5-7.5 arasında, 4'ünde izoelektrik noktası 7.6, 8'inde izoelektrik noktası 7.6'dan büyük olan enzimler bulundu. Bu suşların 14'ünde tek, 19'unda 2 veya daha fazla sayıda enzim bantı gözlenirken 5'inde hiçbir enzim bantı bulunmadı.

İzoelektrik noktası 7.7 ve üstünde olan enzimler *Pseudomonas aeruginosa*'nın grup I β -laktamazlarıdır (55). *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çoğu kromozom kontrolünde β -laktamaz sentez ederler (32, 68). Grup I kromozomal β -laktamazlar sulbaktam veya klavulanik asit ile çok az inhibe olurlar (29). Bu β -laktamazlar yeni kuşak sefalosporinleri hidroliz ederken imipenemi parçalamazlar (7). Çalışmamızda, 8 *Pseudomonas* suşunda (1, 12, 19, 20, 21, 22, 36, 38 nolu suşlar) izoelektrik noktası 7.6'dan büyük olan enzim bulundu. Bunlardan 38 nolu suşun sulbaktamdan etkilenmesi, bu suшта bulunan izoelektrik noktası 7.8 olan enzimin grup I β -laktamaz olamayacağını göstermektedir. Çalışmaya alınan 12, 19, 20, 21, 22 nolu *Pseudomonas* suşları imipeneme dirençli

geçirgen olan, diğer β -laktamlara geçirgen olmayan dış membran proteindir. İndüklenebilir veya "derepressed" kromozomal β -laktamazlı D₂ porini olmayan *Pseudomonas aeruginosa*'larda imipenem MIC değerleri 8 ile 32 $\mu\text{g/ml}$ arasındadır. D₂ porini olan indüklenebilir veya "derepressed" β -laktamazı olanlarda MIC 1-2 $\mu\text{g/ml}$ arasındadır (66).

Çalışmamızda 38 *Pseudomonas* suşunun 7'sinde grup I kromozomal enzimler bulundu. Danel ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (55), Türkiye'de izole edilen seftazidime dirençli 14 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun 14'ünde grup I kromozomal β -laktamaz bulunduğu gösterilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa*'da yeni kuşak β -laktam antibiyotiklere karşı oluşan direncin kromozom kontrolünde sentezlenen β -laktamlara bağlı olduğu bildirilmektedir (37, 69, 70). β -laktamaz sentezi indüksiyondan bağımsız olan stabil "derepressed" suşlarda yeni kuşak sefalosporin direncinin, indüklenebilen β -laktamaz sentezleyen suşlardan daha fazla olduğu belirlenmiştir (32). Ayrıca mikrodilüsyon testlerinde indüklenebilir β -laktamlara bağlı direncin gözlenmeyeceği bildirilmektedir (38). Bunlardan dolayı suşlarımızda yüksek düzey sefalosporin direnci olması, bu enzimlerin stabil olarak "derepressed" enzim olma olasılığını arttırmaktadır. Ancak, bu suşlarda söz konusu enzimlerin kromozomal olduğu kesin olarak belirlenmeli ve indüksiyon deneyleri uygulanarak indüklenebilir, ya da stabil olarak "derepressed" suşlar ayırt edilmelidir.

TEM-1 enzimi, penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidroliz ederken, sefotaksim, seftazidim, aztroenam gibi geniş spektrumlu β -laktam antibiyotikleri

parçalayamamaktadır (47). TEM-1 enziminin izoelektrik noktası 5.4'tür (7). Bu çalışmada 8 suşta (18, 19, 20, 23, 27, 32, 34, 38 nolu suşlarda) izoelektrik noktası 5.4 olan enzimler bulundu. Bu suşların hepsinde geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı direnç olması, bu suşlarda bulunan izoelektrik noktası 5.4 olan enzimlerin TEM-1 enzimi olamayacağını göstermektedir. Fakat bu suşların hiçbirinde izoelektrik noktası 5.4 olan enzim tek başına bulunmamaktadır.

Türkiye'de izole edilen seftazidime dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının hepsinde PER-1 enzimi bulunduğu gösterilmiştir (55). PER-1 enzimi; izoelektrik noktası 5.4 olan, geniş spektrumlu sefalosporinleri hidroliz eden, imipenemi hidroliz etmeyen, β -laktamaz inhibitörlerinden etkilenen bir β -laktamazdır (54). *Pseudomonas* suşlarımızdan 19, 20, 23, 34 nolu suşların imipeneme dirençli oluşu ve 27 nolu suşun sulbaktamdan etkilenmemesi, bu suşların içerdiği izoelektrik noktası 5.4 olan enzimlerin PER-1 olamayacağını göstermektedir. Ancak; 18, 32, 38 nolu suşların sulbaktamdan etkilenmesi, imipeneme duyarlı ve sefalosporinlere dirençli oluşu bu suşlardaki enzimin PER-1 enzimi olabileceğini kanıtlamaktadır. Bu suşların hiçbirinde 5.4 izoelektrik noktalı enzimin tek başına bulunmaması, antibiyotik duyarlılık paternleri ile ilgili kesin bir sonuca varılmasını güçleştirmektedir.

Klebsiella pneumoniae'dan izole edilen CTX-1 (TEM-3) enziminin izoelektrik noktası 6.3'tür ve sefotaksime karşı yüksek hidrolitik aktivitesi vardır (53). 16 nolu suşun sefotaksim MIC'nun yüksek oluşu, sulbaktamdan etkilenmesi, bu suşta bulunan enzimin TEM-3 olduğunu göstermektedir. İzoelektrik noktaları uymasına rağmen, 10, 12, 34 nolu *Pseudomonas* suşlarının imipeneme dirençli oluşu; 2, 11, 13, 15 nolu suşların ise sulbaktamdan etkilenmemesi nedeniyle bu suşlarda bulunan enzim

bantlarının TEM-3 olmadığı anlaşılmaktadır. İmipenem direncinin β -laktamazlardan farklı diğer mekanizmalara da bağlı olabileceği düşünülmektedir. Suşlarımızın çoğunda birden fazla enzim bantlarının bulunması antibiyotik duyarlılık paternleri ile ilgili kesin bir sonuca varılmasını güçleştirmektedir.

TEM-8 enzimi, izoelektrik noktası 6.0 olan, sefotaksim ve seftazidim hidrolizi fazla iken imipenem hidrolizi az olan, β -laktamaz inhibitörlerinden etkilenen bir enzimdir (7). *Pseudomonas* suşlarımızdan 8, 17, 20 nolu suşlarda izoelektrik noktaları 6.0-6.2 arasında olan enzimlerin bulunmasına rağmen, bu suşların imipeneme dirençli oluşu ve 4 nolu suşun da sulbaktamla inhibe olmaması nedeniyle bu suşlarda TEM-8 aktivitesi gösteren enzimlerin bulunmadığı anlaşılmaktadır. Ancak, 14, 26, 28 nolu suşların sefotaksime dirençli ve imipeneme duyarlı oluşu bu suşlarda bulunan enzimlerin TEM-8 olabileceğini göstermektedir. İzoelektrik noktaları 6.0-6.2 arasında olan enzimleri içeren 8, 17, 20 nolu suşlardaki enzim bantlarının hangi enzim grubuna dahil olduğu belirlenemedi.

Çalışmamızda, 7 *Pseudomonas* suşunda grup 2be (3'ü PER-1, 3'ü TEM-8, 1'i TEM-3) ile uyumlu β -laktamaz bulundu. Türkiye'de izole edilen seftazidime dirençli 14 *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının 14'ünde PER-1 enzimi bulunduğu gösterilmiştir (55). Nordmann ve arkadaşları PER-1 enzimini ilk önce *Pseudomonas aeruginosa* RNL-1 izolatında tanımlamışlardır (54). RNL-1 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun izole edildiği hasta Ankara'lı olup, tedavi için Paris'e gitmiştir. Ayrıca Türkiye'de izole edilen *Salmonella typhimurium* suşunda da PER-1 enzimi bulunduğu gösterilmiştir (56).

Plazmid kontrolündeki geniş spektrumlu β -laktamazlar 1983 yılından beri dikkat çekmeğe başlamıştır. Bu enzimler ile ilgili araştırmaların sayısı gün geçtikçe artmakta

ve çeşitli ülkelerden geniş spektrumlu β -laktamazlar içeren suşlarla ilgili yayınlara rastlanmaktadır (47, 48). Bu enzimlerin bir özelliği de β -laktam antibiyotikler ile birlikte, amikasin, gentamisin, netilmisin ve tobramisin gibi aminoglikozidlere karşı da direnç taşıyan plazmid kodlamalarıdır (47, 50). Dolayısıyla bu çalışmadaki suşların aminoglikozidlere karşı duyarlılıklarının incelenmesi, bu enzimlerin tanımlanmalarını kolaylaştıracaktır. Geniş spektrumlu enzimler; klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktama duyarlıdırlar (7, 25, 47). Ancak TEM-1 enziminin diğer geniş spektrumlu β -laktamazlarla birlikte bulunması bu enzimlerin β -laktamaz inhibitörlerine duyarlılığını azaltmaktadır (47, 49, 52).

PSE-1, *Pseudomonas aeruginosa*'da bulunan izoelektrik noktası 5.7 olan bir enzimdir (31). O12 serotipli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında PSE-1 enzimi çoğunlukla bulunmaktadır (85). O12 serotipli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının ortak orijinli olduğu bildirilmektedir (86). Pitt ve arkadaşları (85) O12 serotipli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının % 85.7'sinde PSE-1 enzimi bulmuşlardır. Bu çalışmada serotiplendirilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarından 2'sinin serotipinin O12 olduğu ve ancak birinde (24 nolu suş) PSE-1 enzimi olarak adlandırılabilir izoelektrik noktaya sahip enzimin varlığı belirlendi. PSE-1 enziminin sefotaksim, seftazidim ve imipenem antibiyotiklerinin substrat hidroliz hızları düşüktür (7, 30). Serotiplendirilemeyen 31 nolu suшта enzim tek bant olarak aynı izoelektrik noktada belirlenmesine rağmen, MIC düzeyleri incelendiğinde imipeneme dirençli oluşu, PSE-1 enzimi olma ihtimalini zayıflatmaktadır. İmipenem direnci β -laktamazlardan ayrı olarak diğer mekanizmalara da bağlı olabilir (70). PSE-1 ile izoelektrik noktaları uyumlu enzim bantları olan 21, 27, 28 nolu suşların MIC düzeyleri incelendiği zaman yüksek

düzyeyde sefalosporin direnci olduğu görölmektedir. Direncin bu suşlarda bulunan diğer enzimlere bağlı olabileceği düşünölmektedir. Liu ve arkadaşları (87) 170 *Pseudomonas aeruginosa* suşlarından sadece birinde PSE-1 β -laktamazı bulmuşlardır. Çalışmamızda ise toplanılan 170 *Pseudomonas* suşundan ancak birinde PSE-1 β -laktamazı bulundu. CARB-3; grup 2c'de yer alan, izoelektrik noktası 5.75 olan bir enzimdir (7). Grup 2c'de bulunan enzimler sefotaksim ve imipenemi hidroliz etmemektedirler (23). Suşlarımızda sefotaksim MIC düzeyinin yüksek oluşu bu suşlarda bulunan enzimlerin CARB-3 olamayacağını göstermektedir. TEM-2 *Pseudomonas aeruginosa*'dan elde edilen, izoelektrik noktası 5.6 olan, sefotaksim, seftazidim imipenem hidrolizi az olan β -laktamazdır (7, 48). Suşlarımızda sefotaksim ve seftazidim MIC düzeylerinin yüksek oluşu TEM-2 aktivitesine uymamaktadır. *Pseudomonas aeruginosa*'dan izole edilen LCR-1 enziminin izoelektrik noktası 5.85'dir (7). LCR-1 enziminin sefotaksim ve imipenem hidroliz hızının düşük olduğu belirlenmiştir (63). Suşlarımızın sefotaksim MIC düzeyleri incelendiğinde, sefotaksime karşı aktivitenin yüksek oluşu nedeniyle enzimlerin LCR-1 ile uyumlu olmadığı görölmektedir. *E. coli*'den izole edilen TEM-4 enziminin izoelektrik noktası 5.9'dur ve TEM-4'ün izole edildiği suşlarda seftazidim ve sefotaksime orta düzeyde direnç gözlenmiştir (48). Suşlarımızda sefotaksim ve seftazidime yüksek düzeyde direnç gözlenmesi, TEM-4 aktivitesine uymamaktadır. TEM-6, izoelektrik noktası 5.9 olan bir enzimdir. TEM-6'nın izole edildiği suşın sefotaksime dirençli olduğu belirlenmiştir (7). Suşlarımızın sefotaksime dirençli oluşu enzimlerin TEM-6 olma ihtimalini zayıflatmaktadır.

Pseudomonas aeruginosa'dan izole edilen PSE-4 enzimi, izoelektrik noktası 5.3 olan, imipenem hidrolizi az olan β -laktamazdır (30, 31). 24 nolu suşın imipeneme

duyarlı oluşu bu suшта bulunan izoelektrik noktası 5.2 olan enzimin PSE-4 olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada jelde bantlar arasındaki uzaklık kaydedilirken oluşabilecek milimetrik kaymalar izoelektrik noktalarda farklı değerler verebileceğinden, enzimlerin tanımlanmasında her enzim için izoelektirik noktaların ± 2 değerleri gözönüne alındı.

Bu çalışmada bir suшта (24 nolu suş) bulunan 2 enzimin grup 2c (biri PSE-1, biri PSE-4) ile uyumlu olduğu bulundu. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında bulunan konstitüf β -laktamazlarla yapılan çalışmalarda, karbenisilinazlar (grup 2c) İngiltere'de % 44.2, Fransa'da % 53.7, İspanya'da % 58.6, Hollanda'da % 14.3 oranında bulunmuştur (8). Livermore ve arkadaşları (46) *Pseudomonas aeruginosa* serotip O16 ile PSE-4 enzimi arasında bir ilişki olduğunu göstermişlerdir.

İzoelektrik noktası 7.4 olan enzimlerden biri OXA-1'dir (46). OXA-1 enziminin β -laktamaz inhibitörleriyle TEM-1 kadar iyi inhibe olmadığı gösterilmiştir (58). OXA-1 enziminin sefotaksime karşı aktivitesi azdır (46, 61) Çalışmamızda 8 suшта (7, 16, 23, 26, 27, 29, 33, 36 nolu suşlar) izoelektrik noktası 7.3-7.5 arasında olan enzimler bulundu. Bunlardan 7, 29 ve 33 nolu suşlarda tek bant, 16, 23, 26, 27 ve 36 nolu suşlarda ise birden fazla bant şeklinde enzimlerin olduğu gözlemlendi. *Pseudomonas* suşlarımızdan 16, 23, 26, 27, 33 ve 36 nolu suşların sefotaksime ve 7 nolu suşın imipeneme dirençli oluşu bu suşlarda bulunan enzimlerin OXA-1 enzimi olmadığını; 29 nolu suşın sefotaksime ve imipeneme duyarlı oluşu ise bu suшта bulunan enzimin OXA-1 olduğunu kuvvetle göstermektedir.

OXA-4 *E. coli*'den izole edilen, izoelektrik noktası 7.5 olan bir enzimdir (7). OXA-4, 5, 6, 7'de sefotaksim hidrolizi OXA-1, 2, 3'e göre daha fazla olmaktadır (4, 46).

Pseudomonas suşlarımızdan 16, 26, 27, 33 ve 36 nolu suşların sefotaksime dirençli ve imipeneme duyarlı oluşu bu suşlardaki enzimlerin OXA-4 enzimi olduğunu; 7 ve 23 nolu suşlarda imipeneme direnç görülmesi, bu suşlarda bulunan enzimlerin OXA-4 enzimi olmadığını göstermektedir. Ancak *Pseudomonas*'larda görülen imipenem direnci β -laktamazlardan farklı mekanizmalara bağlı olabilir (70).

Pseudomonas aeruginosa'dan izole edilen ve izoelektrik noktası 6.4 olan OXA-11 enzimi, penisilinleri ve yeni kuşak sefalosporinleri hidroliz ederken sefoksitin ve karbapenemi parçalamamaktadır. OXA-11 enzimi ilk kez Türkiye'de izole edilen bir suşta tanımlanmıştır (62). Bu çalışmada 8 *Pseudomonas* suşunda izoelektrik noktası 6.3-6.5 arasında olan enzim bantı bulundu. Bunlardan 2, 13, 15 nolu 3 suşta tek bant, 10, 11, 12, 16 ve 34 nolu suşlarda birden fazla bant gözlemlendi. *Pseudomonas* suşlarından 2, 11, 13, 15 nolu suşların üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli, imipeneme ise duyarlı oluşu OXA-11 enzim aktivitesine uymaktadır. Bunlardan 10, 12, 34 nolu suşların imipeneme dirençli oluşu, 16 nolu suşun seftazidime duyarlı oluşu bu suşlardaki enzimlerin OXA-11 olmadığını göstermektedir.

Son yıllarda Türkiye'de izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarından elde edilen OXA-14, OXA-16 ve OXA-17 enzimlerinin OXA-10 (PSE-2) enziminin varyantları olduğu anlaşılmıştır (88, 89, 90). OXA-14 enziminin OXA-10 enziminden farkı 1 aminoasit iken, OXA-16 ve OXA-17 enzimlerinin OXA-10'dan farkı ise 2 aminoasittir. OXA-14 ve OXA-16 enzimleri, izoelektrik noktası 6.2 olan β -laktamaz inhibitörlerinden etkilenmeyen, seftazidimi hidroliz ederken imipenemi parçalamayan enzimlerdir (88, 89). OXA-17 enzimi ise OXA-14 ve OXA-16'den farklı olarak seftazidimi hidroliz etmemektedir (90).

İzoelektrik noktası 6.0-6.3 arasında olan enzim içeren suşlardan 4, 8, 16 ve 26 nolu suşların seftazidime duyarlı oluşu, 14 ve 28 nolu suşların sulbaktamdan etkilenmesi, 8, 17, 20 ve 34 nolu suşların imipeneme dirençli oluşu, bu suşlarda bulunan enzimlerin OXA-14 ve OXA-16 olamayacağını göstermektedir.

2 ve 11 nolu suşların imipeneme duyarlı ve seftazidime dirençli oluşu nedeniyle bu suşlarda bulunan enzimlerin OXA-14 veya OXA-16 olabileceği düşünüldü. Seftazidime duyarlı olan suşlardan 16 ve 26 nolu suşların sulbaktamdan etkilenmesi, 8 nolu suşun ise imipeneme dirençli oluşu, bu suşlarda bulunan enzimin OXA-17 olamayacağını göstermektedir. Bu suştaki imipenem direnci β -laktamazlardan farklı mekanizmalara bağlı olabilir (70). Antibiyotik duyarlılık paternleri incelendiğinde 4 nolu suшта bulunan enzimin OXA-17 olabileceği kanaatine varıldı.

Çalışmamızda 33 *Pseudomonas* suşunun 11'inde grup 2d (1'inde OXA-1, 5'inde OXA-4, 4'ünde OXA-11, OXA-17) ile uyumlu β -laktamazlar bulundu. Bazı Avrupa ülkesindeki *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında bulunan konstitüf β -laktamazlarla yapılan çalışmalarda, İngiltere ve Fransa'da oksasilinazlar (grup 2d) % 27.9-% 30.9 oranında bulunmuştur (8). *Pseudomonas aeruginosa*'da bulunan aynı grup enzimlerden PSE-2 β -laktamazı, Türkiye'de ve bazı dış kaynaklı merkezlerde izole edilmesine rağmen bu çalışmada ele alınan *Pseudomonas*'larda gösterilemedi (55, 61).

Stenotrophomonas maltophilia'dan izole edilen L1 enzimi izoelektrik noktası 6.9 olan, imipenemi hidroliz eden, β -laktamaz inhibitörlerinden etkilenmeyen enzimdir (7). *Pseudomonas* suşlarımızdan 1, 18 ve 32 nolu suşlarda bulunan izoelektrik noktası 7.0 olan enzim, bu suşların imipeneme duyarlı olması nedeniyle L1 enzimi değildir. Ancak; 25, 34 ve 37 nolu suşların imipeneme dirençli oluşu ve sulbaktamdan etkilenmemesi, bu

suşlarda bulunan enzimin L1 enzimi olabileceğini göstermektedir. Kesin grup 3 metallobetalaktamaz diyebilmek için ileri testlerin yapılması gerekmektedir.

Grup 3 metallobetalaktamazda yer alan *Flavobacterium odoratum*'dan izole edilen kromozomal geçişli β -laktamazın izoelektrik noktası 5.8'dir (7). Tek enzim bantı olarak belirlenen 31 nolu suş ile 2 enzim bantı belirlenen 21 nolu suşların imipenem dirençli olması ve sulbaktamdan etkilenmemesi, bu suşlardaki enzim bantlarının grup 3 enzimi olabileceğini düşündürmektedir. Kesin bir sonuca varmadan önce, enzim sentezinin kromozom ya da plazmid kontrolünde olduğunun ayırt edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada 5 *Pseudomonas* suşunda grup 3 metallobetalaktamaz enzimleri bulundu. Ancak enzimlerin EDTA ile inhibisyonu gösterilebilseydi, enzimleri tanımlamamız daha kolay olurdu. Bu suşlardan 2'sinde (21 ve 31 nolu suşlar) bulunan enzimlerin izoelektrik noktası 5.8; diğer suşlarda (25, 34, 37 nolu suşlar) bulunan grup 3 metallobetalaktamazlardan L1 enziminin ise izoelektrik noktası 6.9'dur. Bunlardan 34 nolu suşta bulunan 3 enzimin izoelektrik noktaları sırasıyla 5.4, 6.3 ve 7.1 idi. Bu suştaki imipenem direncinin izoelektrik noktası 7.1 olan metallobetalaktamaz grubunda yer alan enzimden dolayı olduğu kabul edilirse, izoelektrik noktası 5.4 ve 6.3 olan enzimler tanımlanırken imipenem direnci gözardı edilebilir. Bu suşta yüksek seftazidim direnci gözlenmemesi izoelektrik noktası 5.4 ve 6.3 olan enzimlerin PER-1 ve OXA-11 enzimler olamayacağını, fakat sefotaksime direncinin yüksek olması nedeniyle izoelektrik noktası 6.3 olan enzimin CTX-1 (TEM-3) enzimi olabileceğini göstermektedir. Bu suşta görülen sefalosporin direncinin CTX-1 enzime bağlı olduğu

düşünülürse, izoelektrik noktası 5.4 olan enzimin TEM-1 olabileceği kanaatine varılabilir.

SHV-1 izoelektrik noktası 7.6 olan, sefotaksim, seftazidim, imipenem hidrolizi az olan bir β -laktamazdır (7). Çalışmamızda üç suşta (10, 22, 30 nolu suşlar) izoelektrik noktası 7.6 olan enzim bulundu. 30 nolu *Pseudomonas* suşunda tek enzim bantı, 10 ve 22 nolu suşlarda ise birden fazla enzim bantı gözlemlendi. Bu 10, 22 ve 30 nolu suşların sefotaksim, seftazidim ve imipeneme dirençli oluşu bu suşlarda bulunan enzimlerin SHV-1 enzimi olamayacağını göstermektedir. Gür (77) 16 *Klebsiella* suşundan 8'inde SHV-1 enzimi bulmuştur. Gülay ve arkadaşları (91) 44 *Klebsiella* suşlarında en çok SHV-1 (% 84.1) enzimi bulunduğunu gözlemişlerdir. SHV-2 enzimi izoelektrik noktası 7.6 olan sefotaksimi hidroliz edebilen ama imipenemi parçalamayan bir enzimdir (7). *Pseudomonas* suşlarından 10, 22, 30 nolu suşların imipeneme dirençli oluşu, bu suşlarda bulunan enzimlerin SHV-2 enzimi olamayacağını göstermektedir.

Pseudomonas aeruginosa'dan izole edilen grup 2d'de yer alan OXA-5 ve OXA-6 enzimlerinin de izoelektrik noktası 7.6'dır (7). OXA-5 ve OXA-6 enzimlerinin sefotaksim hidrolizi fazla iken imipenem hidrolizi azdır (5, 46). Bu 10, 22, 30 nolu suşların sefotaksime dirençli olmasına rağmen, bu suşlarda imipeneme direnç saptanması ile, suşlarda bulunan enzimlerin OXA-5 ve OXA-6 enzimleri olamayacağı sonucu çıkmaktadır. Bunlardan 10 ve 22 nolu suşlarda birden fazla enzimin bulunması, antibiyotik duyarlılık paternleri ile ilgili kesin bir sonuca varılmasını güçleştirmektedir.

Pseudomonas suşlarında sık rastlanan PSE-2, PSE-3, TEM-2, OXA-3 enzimlerine suşlarımızda rastlanmadı. Bunların içinde en önemlisi PSE-2 enzimidir. PSE-2 *Pseudomonas aeruginosa*'dan izole edilen, izoelektrik noktası 6.1 olan,

sefotaksim seftazidim ve imipenem hidrolizi az olan bir enzimdir (61). Bu çalışmada 8 suşta (8, 14, 17, 20, 26, 28, 34 nolu suşlar) izoelektrik noktası 6.0-6.2 olan enzim bulundu. Bunlardan 8, 14, 17, 20 nolu suşlarda bulunan enzimler tiplendirilemedi. Suşların MIC düzeyleri incelendiğinde, sefotaksim ve seftazidime direnç saptanması bu suşlarda bulunan enzimlerin PSE-2 enzimi olmadığını göstermektedir, fakat Danel ve arkadaşları (55), 14 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun 5'inde PSE-2 enzimi bulmuşlardır. Philippon ve arkadaşları (59), *Pseudomonas aeruginosa*'dan izole edilen izoelektrik noktası 4,3 olan, karbenisilini hidroliz eden, sefalosporinlere karşı aktivitesi az olan CARB-4 β -laktamazını tanımlamışlardır. İzoelektrik noktası 4.2-4.5 arasında olan enzim içeren 11, 28, 38 nolu suşlarda yüksek düzeyde sefalosporin direnci olması bu suşlardaki enzimin CARB-4 enzimi olamayacağını göstermektedir. İzoelektrik noktası 5.4'den küçük olan enzim, suşların hiç birinde tek başına bulunmadı. Bu suşlardaki sefalosporin direncinin diğer β -laktamazlara bağlı olduğu düşünülmektedir. Bunların dışında, bazı *Pseudomonas* suşlarında (1, 7, 8, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 27, 28, 30, 32, 34, 38) bulunan ve izoelektrik noktası 4.2, 4.5, 5.4, 5.8-6.0, 6.2, 6.3-6.5, 6.9, 7.0, 7.3-7.5, 7.6 ve 7.8 olan enzimler tiplendirilemedi. Bunların kesin tiplendirilebilmesi için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Pseudomonas aeruginosa yanık infeksiyonlarında önemli bir etkidir (92). Çalıştığımız 37 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun 12'si yanık ünitesinden izole edildi. Bu 12 suşun 5'inin serotipi belirlenemezken, 4'ünün O11, 3'ünün O4 serotipinde olduğu gözlemlendi (Tablo VI). Yanık ünitesinde izole edilen serotipi O11 olan 4 suşun (3, 7, 8, 9 nolu suşlar) sentezlediği β -laktamazların izoelektrik noktaları incelendiğinde, 7 nolu suşta izoelektrik noktası 7.5 olan enzimin bulunduğu görülürken 8 nolu suşta bulunan

enzimin izoelektrik noktasının 6.2 olduğu belirlendi. *Pseudomonas* suşlarımızdan 7 ve 8 nolu suşlarda bulunan enzimlerin izoelektrik noktalarının farklı oluşu, bu suşların aynı suş olamayacağını göstermektedir. 3 ve 9 nolu suşlarda ise β -laktamaz varlığı gösterilmesine rağmen herhangi bir enzim bantı belirlenemedi. Bu durumda 3 ve 9 nolu suşların aynı suş olabileceği kanaatine varılabilir. Yanık ünitesinden izole edilen serotipi O4 olan suşlarda bulunan enzimlerin izoelektrik noktalarının aynı olmaması bu suşların aynı suşlar olamayacağını göstermektedir.

Bu çalışmada Beyin Cerrahi Servisi'nden izole edilen 5 *Pseudomonas aeruginosa* suşlarından 4'ünün II, birinin O4 serotipinde olduğu belirlendi. *Pseudomonas* suşlarımızdan 10, 12, 14 ve 17 nolu suşlarının serotipleri II idi. Bu suşlarda bulunan enzimlerin izoelektrik noktaları incelendiğinde 14 ve 17 nolu suşlarda izoelektrik noktası 6.0 olan enzimlerin bulunduğu görülmektedir (Tablo VIII). Suşlarda bulunan enzimlerin tiplendirilmesi sırasında, enzimlerin izoelektrik noktalarına ve suşların antibiyotiklere karşı direnç paternlerine bakıldığı zaman, 14 ve 17 nolu suşlarda aynı β -laktamazın bulunmadığı ve bu suşların aynı suş olmadığı görülmektedir. 10 ve 12 nolu suşlarda izoelektrik noktası farklı olan enzimlerin bulunması, bu suşların da aynı suş olamayacağını göstermektedir. Hastanede belli serotiplerin fazla bulunması durumunda suşların aynı suş olup olmadığını belirlemek için ileri testlerin (DNA/DNA hibridizasyon) yapılması faydalı olacaktır.

Bütün bu bulgular, yeni kuşak sefalosporinlere dirençli *Pseudomonas*'lardaki direncin β -laktamazlara bağlı olduğunu kanıtlamaktadır. Yeni kuşak sefalosporinlerin kullanımına bağlı olarak bakterilerde geniş spektrumlu enzimlerin sentezinin artması, bakteriyel infeksiyonların tedavisini güçleştirmektedir. *Pseudomonas* infeksiyonlarında

antibiyotik kullanımı sınırlanmadıkça bu tip sorunların çıkması mümkündür. Birçok suşta birden fazla enzimin bulunması, β -laktamazlara bağlı direncin birçok farklı β -laktam antibiyotiğe karşı oluşabileceğini ve bu antibiyotiklere karşı gelişen direncin gelecekte daha büyük boyutlara ulaşabileceğini göstermektedir. β -laktamaza bağlı karbapenem direnci klinik olarak önemli örneklerde hala nadir görülmektedir. Bu durum gelecek için korkutucu olabilir (66). Çalışmamızda, β -laktamazların çeşitliliğini gösterme açısından yararlı olan IEF yöntemi uygulanmış ve bu yöntem β -laktamazların tanımlanmasına, sınıflandırmasına olanak vermiştir. Klinik örneklerden izole edilen bakterilerde bulunan β -laktamaz tiplerinin bilinmesi, tedavide kullanılacak β -laktam antibiyotiklerin seçiminde yol gösterici olacaktır.

SONUÇ

Pseudomonas'larda bulunan kromozomal veya ekstrakromozomal enzimlerin antibiyotikleri kolaylıkla hidroliz etmeleri sonucunda, *Pseudomonas* infeksiyonlarında antibiyotiklerin *in vivo* olarak etkisi gittikçe azalmaktadır. Bu çalışmada, yeni kuşak β -laktam antibiyotiklere dirençli *Pseudomonas* suşlarında bulunan β -laktamazlar, izoelektrik noktalarına ve antibiyotiklerin *Pseudomonas*'lara karşı *in vitro* olarak aktivitelerine göre tiplendirildi. Bu suşlarda yeni kuşak sefalosporinlere ve diğer β -laktam antibiyotiklere karşı direncin farklı grup içinde yer alan β -laktamazlara bağlı olduğu gösterildi. "Isoelectric focusing" yönteminin β -laktamazların tanımlanmasına ve gruplandırılmasına olanak verdiği, belirlenen β -laktamazların tedavide antibiyotik seçiminde yol gösterici olabileceği sonucuna varıldı.

ÖZET

Yeni kuşak β -laktam antibiyotiklere dirençli 38 *Pseudomonas* suşunda, β -laktamaz varlığı araştırıldı. β -laktamazlar, "isoelectric focusing" yöntemi ile izoelektrik noktaları belirlenerek ve β -laktam antibiyotiklere duyarlılıkları incelenerek tiplendirildi.

Çalışma grubunu oluşturan *Pseudomonas*'lardan 37'si *Pseudomonas aeruginosa*, biri *Pseudomonas cepacia* idi. Özgül antiserumlarıyla serotiplendirilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarından 9'unun O11, 8'inin II, 5'inin O4, 2'sinin O12 serotipinde olduğu belirlendi ve 13 suş tiplendirilemedi.

Çalışmaya alınan suşların hepsinde β -laktamazların sentezlendiği gösterildi. "Isoelectric focusing" yöntemi ile bazı suşlarda enzim bantları gözlenemezken, bazılarında 1, 2 veya daha fazla enzim bantı olduğu görüldü. Bu enzim bantlarının

izoelektrik noktaları < 5.4 , 5.4 , $5.5-7.5$ arasında, 7.6 ve > 7.6 olarak gruplandırıldı. Ayrıca *Pseudomonas* suşlarının β -laktam antibiyotikler için MIC değerleri belirlendi. *Pseudomonas*'ların antibiyotiklere karşı *in vitro* olarak etkilerine ve içerdikleri enzimlerin izoelektrik noktalarına göre β -laktamazlar gruplandırıldı. *Pseudomonas* suşlarından 7'sinin grup I, 7'sinin grup 2be, 1'inin grup 2c, 11'inin grup 2d ve 5'inin grup 3 β -laktamaz içerebileceği düşünöldü.

Klinik örneklerden izole edilen yeni kuşak sefalosporinlere dirençli *Pseudomonas*'larda bulunan β -laktamaz tiplerinin bilinmesi tedavide uygulanacak β -laktam antibiyotiklerin seçiminde yol gösterici olacaktır.



SUMMARY

Typing of β -lactamase enzymes by "Isoelectric Focusing" in *Pseudomonas* strains that are resistant to newer β -lactam antibiotics.

Production of β -lactamase of 38 *Pseudomonas* isolates that are resistant to newer β -lactam antibiotics were investigated. The β -lactamases were typed according to isoelectric point values of β -lactamases determined by "isoelectric focusing" and susceptibility to β -lactam antibiotics of *Pseudomonas* isolates.

Of the *Pseudomonas* isolates 37 were *Pseudomonas aeruginosa* and one of them was *Pseudomonas cepacia*. *Pseudomonas aeruginosa* isolates were serotyped with available antisera. The serotypes of 9 *Pseudomonas aeruginosa* isolates were O11, 8 were II, 5 were O4, 2 were O12. The serotypes of 13 isolates were non-typable.

β -lactamase expression was detected in all of *Pseudomonas* isolates. It was observed that there was no enzyme band in some isolates with "isoelectric focusing", besides 1, 2 or more enzyme bands were seen in some isolates. The isoelectric points of enzyme bands were grouped as <5.4, 5.4, 5.5-7.5, 7.6 and >7.6. MIC values to β -lactam antibiotics of *Pseudomonas* isolates were investigated. The β -lactamases were grouped according to *in vitro* susceptibility of *Pseudomonas* isolates to antibiotics and the isoelectric points of the enzymes. It was suggested that 7 of the isolates had group 1 enzymes, 7 of them had group 2be, 1 of them had group 2c, 11 of them had group 2d and 5 of them had group 3 enzymes.

The characterization of β -lactamase patterns of *Pseudomonas* isolates that are resistant to new generation cephalosporins will be useful for the right choice of β -lactam antibiotics that will be applied for treatment.

5. Mayer KH, Opal SM, Medeiros AA: Mechanism of antibiotic resistance. In: Mandell GL, Bennett John E, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, New York 1995, pp 212-225.
6. Acar JF, Minozzi C: Role of β -lactamases in the resistance of Gram-negative bacilli to β -lactam antibiotics. Rev. Infect Dis, 1986; 8 (suppl 5): 482-486.
7. 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.
8. Philippon A: Beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*, in: Livermore DM (ed), Beta-lactamases: Current perspectives. Proceedings of a satellite symposium, Third European Congress of Clinical Microbiology, Theracom Ltd., Hampshire 1988, pp 63-81.
9. Gilligan PH: *Pseudomonas* and *Burkholderia*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds), Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, 1995, pp 509-519.
10. Korten V: Hastane infeksiyonları. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds), İnfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevi, 1996, ss 281-288.
11. Türegün S. Hastane infeksiyonlarında rol oynayan mikroorganizmalar ve Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastanesindeki durum. Yüksek Lisans Tezi, Kayseri 1989.
12. Özbal Y: Antibiyotiklerin etki mekanizmaları ve bakterilerin antibiyotiklere direnç oluşturması. Erciyes Tıp Dergisi 1992, Ek-1: 110-119.

13. Yao JOC, Moellering RC. Antibacterial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover RH (eds), *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington, 1995, pp 1281-1307.
14. Topçu AW: Penisilinler. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, *İnfeksiyon Hastalıkları*. Nobel Tıp Kitabevi, 1996, ss 130-137.
15. Yüce K: Antibiyotikler ve İnfeksiyon Hastalıklarında Tedavi. Bilgehan Basımevi, İzmir 1988, ss 8-36.
16. Levy J, Campbell JJR, Blackburn TH (eds): *Introductory Microbiology*. John Wiley, New York, 1973, pp 37.
17. Nicos TI, Einsenstein BI: Bacterial diseases introduction. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Churchill Livingstone, New York, 1995, pp 1752-1754.
18. Chambers HF, Neu HC: Penicillins. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), *Principles and Practice of Infectious Disases*, Churchill Livingstone, New York 1995, pp 233-246.
19. Pitt TL: Pseudomonas. In: Parker MT, Collier LH (eds), *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*, 8 th edition. Vol 2. Edward Arnold, London, 1990, pp 255-273.
20. Gofrey AJ, Bryan LE: Penetration of β -lactams through Pseudomonas aeruginosa porin channels. *Antimicrob Agents Chemother*, 1987; 31: 216-221.
21. Neu H: Antibiotic inactivating enzymes and bacterial resistance, In: Lorion V (ed), *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 2 nd edition, Williams and Wilkins, Baltimore 1986, pp 757-785.
22. Medeiros AA: β -lactamases-past, present and future. In: Livermore DM (ed), *Beta-lactamases: Current perspectives*. Proceedings of a satellite Symposium,

Third European Congress of Clinical Microbiology, Theracom Ltd. Hampshire 1988, pp 1-11.

23. Gür D: β -laktamazların sınıflandırılması. *Flora*, 1996; 2: 80-86.
24. Mathew M, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW: The use of Analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. *J. Gen. Microbiol* 1975; 88: 169-178.
25. Bush K: Characterization of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989; 33: 259-263.
26. Bush K, Sykes RB: Methodology for the study of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 1986; 30: 6-10.
27. Mathew M, Harris AN: Identification of β -lactamases by analytical isoelectric focusing: Correlation with bacterial taxonomy. *J. Gen. Microbiol*, 1976; 94: 55-62.
28. Livermore DM: β -lactamases in Laboratory and Clinical resistance, *Clin Microbiol Rev*, 1995; 8: 557-584.
29. Bush K: Classification of β -lactamases: Groups 1, 2a, 2b and 2b'. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989; 33: 264-270.
30. Bush K: Classification of β -lactamases: Groups 2c, 2d, 2e, 3 and 4. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 271-276.
31. Bryan LW, Godfrey AJ: β -lactam antibiotics: Mode of action and Bacterial resistance. In: Lorian V (ed), *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Third edition, Baltimore, 1991; pp 599-664.
32. Livermore DM: Clinical significance of β -lactamases Induction and stable derepression in Gram-negative rods. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1987; 6: 439-445.

33. Curtis NAC, Eisenstadt RL, Rudd C, et al: Inducible Type I β -lactamases of Gram-negative bacteria and resistance to β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, 1986; 17: 51-61.
34. Phillips I, Shannon K: Class I β -lactamases induction and derepression. *Drugs*, 1989; 37: 402-407.
35. Bennett PM, Chopra I: Molecular basis of β -lactamase induction in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993; 37: 153-158.
36. Gür D: Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. Topçu AW, Söyletir C, Doğanay M (eds), *Infeksiyon Hastalıkları*. Nobel Tıp Kitabevi, 1996, ss 183-190.
37. Sanders WE, Sanders CC: Inducible β -lactamases: Clinical and epidemiologic implications for use of newer cephalosporins. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 830-838.
38. Sanders CC, Sanders WE: Clinical importance of inducible Beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Eur. J. Clin Microbiol* 1987; 6: 435-443.
39. Colom K, Fdz-Aranguiz A, Suinaga E, et al: Emergence of resistance to Beta-lactam agents in *Pseudomonas aeruginosa* with Group I Beta-lactamases in Spain. *Eur J Clin Microbiol infect Dis*. 1995; 14: 964-971.
40. 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*. 1990; 34: 2200-2209.
41. Payne DJ, Woodford N, Amyes SGB: Characterization of the plasmid mediated β -lactamase BIL-1. *J Antimicrob Chemother*, 1992; 30: 119-127.
42. Leiza MG, Perez-Diaz JC, Ayala J, et al: Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new Amp C-type

- plasmid mediated β -lactamase with two molecular variants. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 38: 2150-2157.
43. Tzouveleki LS, Tzelepi E, Mentis AF: Nucleotide sequence of a plasmid-mediated cephalosporinase Gene (*bla_{LAT-1}*) found in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; 38: 2207-2209.
 44. Horii T, Arakawa Y, Ohta M, et al: Plasmid-mediated Amp C-type β -lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad-spectrum β -lactams, including moxalactam. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993; 37: 984-900.
 45. Vahaboğlu MH, Mülazımoğlu L, Erdem İ ve ark: Taksim Hastanesi'nde β -laktam antibiyotiklere karşı gelişen direncin sürveyansı. *Klinik Derg*. 1993; 2: 79-82.
 46. Amyes SGB: Plasmid mediated β -lactamases: Relative clinical importance In: Livermore DM (ed), β -lactamases: current perspectives. Proceedings of a satellite symposium, Third European Congress of clinical Microbiology, Theracom LTD, Hampshire 1988, pp 31-49.
 47. Phillippon A, Labia R, Jacoby G: Extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1131-1136.
 48. Jacoby GA, Medeiros AA: More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1697-1704.
 49. Wu PJ, Shannon K, Phillips I: Effect of hyperproduction of TEM-1 β -lactamase on in vitro susceptibility of *Escherichia coli* to β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 494-498.
 50. Phillippon A, Arlet G, Lagrange PH: Origin and impact of plasmid mediated extended-spectrum β -lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1994; 13 (suppl 1): 17-29.

51. Gür D, Pitt TL, Hall LMC, et al: Diversity of *Klebsiella* with extended-spectrum β -lactamases at a Turkish University Hospital. *J Hospital Infect*, 1992; 22: 163-178.
52. Jacoby GA: Genetics of extended-spectrum β -lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1994; 13 (suppl 1): 2-11.
53. Sirot D, Sirot J, Labia R, et al: Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, identification of CTX-1, a novel β -lactamase. *J. Antimicrob Chemother*, 1987; 22: 323-334.
54. Nordmann P, Ronco H, Naas T, et al: Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993; 37: 962-969.
55. Danel F, Hall LMC, Gür D, et al: Transferable production of PER-1 β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Chemother*, 1995; 35: 281-294.
56. Vahaboğlu H, Dodanlı S, Eroğlu 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.
57. Nordmann P, Naas T: Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994; 38: 104-114.
58. Zhou XY, Bordon F, Sirot D, et al: Emergence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing TEM-1 derivatives or an OXA-1 β -lactamase conferring resistance to β -lactamase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994; 38: 1085-1089.

59. Phillippon AM, Paul GC, Thabaut AP, et al: Properties of a novel carbenicillin-hydrolyzing β -lactamase (CARB-4) specified by an IncP-2 plasmid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1986; 29: 519-520.
60. Steingrube VA, Wallace RJ, Beuliev D: A membrane-bound precursor β -lactamase in strains of *Moraxella Catarrhalis* and *Moraxella nonliquefaciens* that produce periplasmic BRO-1 and BRO-2 β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31: 237-244.
61. Phillippon AM, Paul GC, Jacoby GA: Properties of PSE-2 β -lactamase and genetic basis for its production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1983; 24: 362-369.
62. Hall LMC, Livermore DM, Gür D, et al: OXA-11 an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1983; 37: 1637-1644.
63. Yang Y, Bush K: Letters to the editor, Oxacillin hydrolysis by the LCR-1 β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995; 39: 1209.
64. Nordmann P, Mariotte S, Naas T, et al: Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene in to *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993; 37: 939-946.
65. Naas T, Vandel L, Sougakoff W, et al: Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing Class A β -lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994; 38: 1262-1270.
66. Livermore DM: Carbapenemases: The next generation of β -lactamases. *ASM News* 1995; 59: 129-135.

67. Watanabe M, Iyobe S, Inove M, et al: Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991; 35: 147-151.
68. Sanders CC: Novel resistance selected by the new extended-spectrum cephalosporins: A Concern. *J Infect Dis* 1983; 147: 585-589.
69. Sanders CC, Sanders WE: Type I β -lactamasas of Gram-negative bacteria: Interactions with β -lactam antibiotic. *J. Infect Dis.* 1986; 154: 792-800.
70. Sanders CC, Sanders WE: β -lactam resistance in Gram-negative bacteria: Global trends and clinical impact. *Clin Infect. Dis.* 1992; 15: 824-39.
71. Payne DJ, Cramp R, Winstanley DJ, et al: Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam against clinically important β -lactamasases. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994; 38: 767-772.
72. Akova M: Beta-laktam/Beta-Laktamaz inhibitörü kombinasyonu antibiyotikler. Akalın HE: Klinik uygulamada Antibiyotikler ve diğer antimikrobiyal ilaçlar. Güneş Kitabevi, Ankara, 1994, ss 144-153.
73. Chambers HF, Neu HC, Other β -laktam antibiotics. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone, New York 1995, pp 264-272.
74. Zhou XY, Kitzis MD, Gutmann L: Role of cephalosporinase in carbapenem resistance of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993; 37: 1387-1389.
75. Bilgehan H: Antibiyotikler ve Mikroorganizmalar, Klinik Mikrobiyolojik tanı, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir, 1992, ss 135-171.
76. Patzer J, Dzierzanowska D: The resistance patterns and serotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from children. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28: 860-875

77. Gür D: Yeni kuşak Beta-laktam antibiyotiklere direnç oluşturan Beta-laktamazların "Isoelectric focusing" yöntemi ile tiplendirilmesi. Doktora Tezi, 1990, Ankara
78. Livermore DM (co-ordinator): β -lactamase, workshop, London Hospital Medical College, 1990.
79. Righetti PR, Gionazza E, Gelfi G, Chiari M: Isoelectric focusing. In: Hames BD, Richkwood D (eds), Gel Electrophoresis of Proteins. 1990, pp 149-216.
80. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Fourth Information Supplement, NCCLS Document M7-A2, NCCLS, Villanova, Pa, 1992.
81. Hindler J: Broth Microdiluting testing. In: Isenberg HD (ed), Clinical microbiology Procedures Handbook. Vol I . American Society for Microbiology, Washington, 1992, pp 5. 2. 1-5. 2. 29.
82. Finegold SM, Baron EJ: Formulas and preparation of culture media and reagents. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 7 th edition, 1986, pp 859-900.
83. Sisson PR, Freeman R, Gould FK, et al: Strain differentiation of nosocomial isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by prolysis mass spectrometry. J Hosp Infect 1991; 19: 137-140.
84. Correo CMC, Tibana T, Filho GPP: Vegetables as a source of infection with *Pseudomonas aeruginosa* in a University and Oncology Hospital of Rio de Janeiro. J Hosp Infect 1991; 18: 301-306.
85. Pitt TL, Livermore DM, Miller G, et al: Resistance mechanisms of multiresistant serotype O12 *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Europe. J Antimicrob Chemother, 1990; 26: 319-328.

86. Pitt TL, Livermore DM, Pitcher D, et al: Multiresistant serotype O12 *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a common strain in Europe. *Epidem Inf* 1989; 103: 565-576.
87. Liu PYF, Gür D, Hall LCM, et al: Survey of the prevalence of β -lactamases amongst 1000 Gram-negative bacilli isolated consecutively at the Royal London Hospital. *J. Antimicrob Chemother.* 1992; 30: 429-447.
88. Danel F, Hall LMC, Gür D, et al: OXA-14, another extended spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995; 39: 1881-1884.
89. Danel F, Hall LMC, Gür D, et al: OXA-16: a new OXA-10-related β -lactamase giving ceftazidime resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from Turkey. 36 th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 15-18 September 1996, New Orleans Louisiana., Poster no: c-27.
90. Danel F, Hall LMC, Gür D, et al: Multiple secondary β -lactamases, including a new OXA-10 mutant in two Turkish *Pseudomonas aeruginosa* isolates. First European Congress of Chemotherapy, 14-17 May 1996, Glasgow, Scotland, Poster no: T-119
91. Gülay Z, Amyes SGB, Yuluğ N: Hastane enfeksiyonlarından soyutlanan *Klebsiella pneumoniae* suşlarının β -laktam antibiyotiklere duyarlılığının ve β -laktamaz tiplerinin incelenmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni* 1996; 30: 1-11.
92. Barron JE, Peterson LR, Finegold SM: Nonfermentative Gram-negative bacilli and coccobacilli, Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology 9 th ed. The CU Mosby Company, St. louis, 1994, pp 386-405.