

BEYAZ PEYNİRDEN İZOLE EDİLEN *STREPTOCOCCUS FAECALIS*'LERİN BETA-LAKTAMAZ ENZİM VARLIĞINI GÖSTEREN BİR ARAŞTIRMA

THE RESEARCH ON THE PRESENCE OF BETA-LACTAMASE ENZYME OF *STREPTOCOCCUS FAECALIS* ISOLATED FROM WHITE CHEESE

Güven URAZ¹, Seza ARSLAN²

1) Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

2) Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji

ÖZET: Çeşitli süt işletmelerinden sağlanan beyaz peynir örneklerinden 20 *Streptococcus faecalis* izole edilmiştir. İodometrik Test yöntemi ve beta-laktamaz enzimi ile çalışılan 20 *Streptococcus faecalis*'in 2'si beta-laktamaz pozitif bulunmuş, geriye kalan 18 *S. faecalis* ise beta-laktamaz negatif çıkmıştır.

Daha sonra 2 beta-laktamaz pozitif *S. faecalis*'in Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) ile beta-laktamaz enzim varlığı kontrol edilmiştir. Ayrıca, penisilin-G ile antibiyotik duyarlık testi yapılmıştır. Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) yöntemiyle de beta-laktamaz pozitif çıkan 2 *S. faecalis*, penisilin-G'ye karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç beta-laktamaz testlerini desteklemiştir.

SUMMARY: Twenty *Streptococcus faecalis* were isolated from the samples of white cheese which had been obtained from different dairies. In the study of iodometric test method 2 of 20 *Streptococcus faecalis* were found positive beta-lactamase. The rest of the bacteria, 18 *Streptococcus faecalis* were negative beta-lactamase.

Later, the presence of beta-lactamase enzyme in 2 beta-lactamase positive *Streptococcus faecalis* was confirmed by using Chromogenic Cefalosporin Test (Nitrocefim). Besides, antibiotic sensitive test with Penicilline-G was applied. Two *Streptococcus faecalis* which were determined beta-lactamase positive by the method of Chromogenic Cefalosporin Test (Nitrocefim) were found to be resistant against Penicillin-G. The result was supported to the test of beta-lactamase.

GİRİŞ

Beta-laktamaz birçok türü olan bir enzim grubudur. Bu enzim, genetik kontrole (kromozom veya plazmid aracılığı ile oluştuklarına), substrat profiline ve inhibitör profiline göre çeşitli biçimlerde sınıflandırılmıştır. 1973'te hidroliz edilen antibiyotik tipine göre (substrat profiline göre) yapılan Richmond-Sykes sınıflaması daha sonra genetik kontrolü da dikkate alarak değiştirilmiştir. Sykes-Matthew sınıflandırması adı verilen bu sınıflandırmaya göre beta-laktamazlar kromozom-aracılı ve R-plazmidi-aracılı olarak iki ana gruba ayrılmışlardır. Bunlardan birincisi substratın tipine göre üç alt gruba ve ikincisi iki alt gruba bölünmüştür (KAYAALP, 1987; MEDEIROS, 1984).

Sentezi kromozom aracılığıyla kontrol edilen birinci gruptaki enzimler bakteri türlerine spesifiktirler ve buna göre adlandırılırlar. Hem Gram pozitif, hem de Gram negatif bakterilerde bulunurlar. Bunlardan substrat olarak sefalosporinlere etkili olan Richmond-Sykes Sınıf I enzimleri (gerçek sefalosporinazlar) *E.coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter* indol-pozitif *Proteus*, *Serratia*, *Yersinia*, *Providencia*, *Acinetobacter* ve *Pseudomonas*'lar gibi gram negatif aerobik basiller tarafından üretilirler.

Sınıf II beta-laktamazlar (gerçek penisilinazlar) *Staphylococcus* ve *Proteus* türlerinde bulunur.

Sınıf IV beta-laktamazlar geniş bir substrat spektrumu gösterirler hem penisilinleri, hemde sefalosporinleri parçalarlar. Bu alt gruptaki enzimler *Klebsiella* türleri, *E. coli*, *Enterobacter*'lerden izole edilmişlerdir (BAUERFEIND, 1986; KAYAALP, 1987; MEDEIROS, 1984).

Sentezi R-plazmidleri ile kontrol edilen ikinci ana gruptaki betalaktamazlar, plazmidlerin bir bakteri türünden diğerine kolayca geçebilmeleri nedeniyle türe değil, plazmide özgüdürler. Bunların iki alt grubundan birine ait (Sınıf III) enzimlerin substrat spektrumu geniştir. Penisilinler ve sefalosporinler arasında ayırım yapmazlar. *Enterobacteriaceae* grubu gram negatif bakterilerden elde edilen ve ilk izole edilen beta-laktamazlar olan TEM-1 ve TEM-2 enzimleri de bu alt gruptadırlar. Gram negatif aerobik bakterilerde en yaygın bulunan ve en fazla dirençlilik rolü oynayan beta-laktamaz türlerdir. Bu türler *E. coli*,

Shigella, *Salmonella*, *Haemophilus influenzae* ve *Pseudomonas*'tır. *Staphylococcus*'larda penisiline direnç gelişmesinde de plazmidler rol oynarlar (BAUERNFEIND, 1986; KAYAALP, 1987; MEDEIROS, 1984).

Streptococcus faecalis'in de staphylococcal beta-laktamaz sentezlediği saptanmıştır. Bu beta-laktamazın plazmide bağlı olduğu tespit edilmiş ama henüz enzimin sınıflandırılması yapılmamıştır (MEDEIROS, 1984).

MURRAY ve MEDERSKI-SAMARAJ (1983) *S. faecalis*'in in vitro penisilin direnci için transfer edilebilir beta-laktamaz kullanarak yeni bir mekanizma geliştirmişlerdir. Deneyleri sırasında beta-laktamaz enzim aktivitesini tayin etmek için Kromojenik sefalosporin Test (Nitrosetin), İodometrik Test (Nişasta-İyodin) ve Asidometrik metod olmak üzere üç yöntem kullanmışlardır. Araştırmacılar penisilin direncini ve beta-laktamaz aktivitesini iki plazmidle transfer etmişlerdir. Böylece *Streptococcus* türünde plazmide bağlı penisilin direncini göstermişlerdir.

MURRAY ve MEDERSKI-SAMARAJ (1986) çalışmalarında *S. faecalis*'in Staphylococcal orijinli plazmide bağlı beta-laktamaz enzimini in vitro olarak incelemişler, *S. faecalis*'in beta-laktamaz enziminin penisilin ve ampsilin'i inhibe ettiğini tespit etmişlerdir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırma materyali çeşitli süt işletmelerinden sağlanan 0-10 hafta arasında olgunlaşma süresi geçiren beyaz peynir örnekleridir. Toplam 36 beyaz peynir örneği çalışılmıştır. Bu amaçla laboratuvara steril kavanozlarda getirilen beyaz peynir örneklerinden 10 gr alınmış steril porselen havanda sıcaklığı 45°C olan 90 ml stisodyum sitrat ile iyice ezilerek 10^{-1} oranında beyaz peynir süspansiyonu hazırlanmıştır.

PCA ve Slanetz-Bartley besiyerine 10^{-1} dilüsyondan 0.1 ml ekilmiştir. 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. PCA ve Slanetz-Bartley besiyerinde üreyen *S. faecalis*'le in identifikasyonunda metilen blue, % 6.5 NaCl'de üreme, gelatin, nişasta, eskulin, arginin dehidrolaz, sükröz, laktöz, mannitol, arabinoz, rafinoz fermentasyonu testleri kullanılmıştır (DEIBEL, 1974; KONEMAN, 1988).

Testler sonucunda adlandırılan bakteriler saf kültür olarak % 0.2 çözünebilir nişasta içeren Nutrient agar besiyerinde yeniden üretilmişlerdir. Üreyen koloniler üzerine iodometrik test çözeltisi damlatılmıştır. Çözeltinin damlatılmasından hemen sonra iyot, nişastaya bağlanarak kolonilerin çevresinde kısa bir süre içinde renk, koloniden çevreye doğru genişleyen halkalar halinde kaybolur (WASHINGTON, 1985).

İodometrik Test yöntemiyle beta-laktamaz pozitif bulunan 2 *S. faecalis* tekrar Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosetin) yöntemine göre yeniden test edilmiştir.

Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosetin) yöntemiyle bakterilerin beta-laktamaz enzimleri araştırılırken Oxoid firmasının "Beta-lactamase Identification Sticks BR 66 nolu" ürünleriyle çalışılmıştır. Bu amaçla PCA besiyerinde üretilen saf kültürlerle çubuklar halinde bulunan stiklerin sarı kısımları dokundurulmuştur. Stik uçları dokundurulan bakteriler beta-laktamaz pozitif ise renk değiştirirler. 5-15 dakika içinde sarıdan kırmızıya doğru renk değiştiren bakteriler beta-laktamaz pozitif olarak adlandırılmıştır (BAUER, 1970).

Her iki test sonucunda beta-laktamaz pozitif bulunan *S. faecalis*'lerin penisilin-G ile antibiyogram testleri yapılarak penisilin-G'ye dirençleri kontrol edilmiştir.

İodometrik Test ve Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosetin) yöntemleri, penisilin duyarlılık testleri sonucunda beta-laktamaz pozitif bulunan *S. faecalis*'lere ofloksasin, klindamisin, amikasin, klavulanat amoksisilin, sefazolin ve gentamisin antibiyotikleri tarafından duyarlılık testleri yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testlerinde Müeller-Hinton besiyeri kullanılmış ve sonuçlar Kirby-Bauer yöntemiyle değerlendirilmiştir (BAUER, 1970).

BULGULAR

Çeşitli süt işletmelerinden sağlanan 36 beyaz peynir örneğinden 20 *S. faecalis* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İodometrik Test yöntemiyle beta-laktamaz enzimi araştırılan 20 *S. faecalis*'in 2'si beta-laktamaz bakımından pozitif sonuç vermiştir. Geriye kalan 18 *S. faecalis* beta-laktamaz negatif çıkmıştır.

Çizelge 1. Beyaz Peynir Örneklerinden İzole Edilen Beta-laktamaz Pozitif *S. faecalis* Bakterileri

Beyaz peynir örneklerinden izole edilen beta-laktamaz pozitif <i>Streptococcus faecalis</i> bakterileri	İodometrik Test yöntemiyle beta-laktamaz pozitif bulunan <i>S. faecalis</i> 'ler	Kromojenik sefalosporin Test (Nitrosetin) yöntemiyle beta-laktamaz pozitif bulunan <i>S. faecalis</i> 'ler	Penisilin-G ile yapılan duyarlılık testinde dirençli bulunan <i>S. faecalis</i> 'ler
6 nolu örnek	+	+	Dirençli
7 nolu örnek	+	+	Dirençli

Beta-laktamaz pozitif *S. faecalis*'lerin izolasyonunu gerçekleştirdiğimiz beyaz peynir örneklerinde bu bakterilerle beraber beta-laktamaz enzimi pozitif bulunan *S. aureus*'lar da tespit edilmiştir. Bu bulgular plazmid aracılığıyla taşınabilen beta-laktamaz enzim aktivitesini hatırlatmaktadır.

Çizelge 2. Beta-Laktamaz Pozitif Olarak Değerlendirilen 2 *S. faecalis*'in Antibiyogram Sonuçları

Test Edilen Antibiyotikler	<i>Streptococcus faecalis</i> bakterilerinin antibiyogram sonuçları		
	Hassas	Orta	Dirençli
OFLOKSASİN	2	-	-
KLAVULANAT AMOKSİSİLİN	1	1	-
KLİNDAMİSİN	-	-	2
AMİKASİN	-	-	2
SEFAZOLİN	1	1	-
GENTAMİSİN	-	-	2
PENİSİLİN-G	-	-	2

Çizelge 2'de görülen beta-laktamaz pozitif *S. faecalis*'ler penisilin-G ile test edildiğinde penisiline % 100 dirençli oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca bu *S. faecalis*'ler klindamisin, amikasin ve gentamisin'e % 100 dirençli bulunmuştur. Bununla beraber Sefalosporine ve Klavulanat-Amoksisiline hassas ve orta derecede hassas olarak saptanmışlardır.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Literatürde *S. faecalis*'lerin in vitro koşullarda plazmidlere bağlı geliştirilen enzim aktivitesinden bahsedilmektedir. Bununla beraber araştırmamız sonuçlarında iki *S. faecalis* izolatın beta-laktamaz enzim aktivitesi bulunmuştur. Bu enzim aktivitesi iki test yöntemiyle ve penisilin-G antibiyotiği ile kontrol edilmiştir. Her üç sonuç beta-laktamaz varlığını doğrulamıştır. Anılan *S. faecalis*'lerin izole edildiği beyaz peynir örneklerinden beta-laktamaz pozitif *Staphylococcus*'ların da izole edilmesi, plazmidler aracılığıyla taşınabilen beta-laktamaz enzim aktivitesinin aynı ortamda üreyen bakterilere geçebileceğini hatırlatmaktadır.

MURRAY ve MEDERSKI-SAMARAJ (1983) *S. faecalis*'lere plazmidler aracılığıyla taşınabilen beta-laktamaz enzim aktivitesini taşıdıklarını göstermişlerdir. Bu bulgularda bizim çalışmamızı doğrulamaktadır. Gene aynı araştırmacılar tarafından yapılan bir başka çalışmada *S. faecalis*'leri penisilin'e

ve ampicilin'e dirençli bulurken sefalosporinlere karşı duyarlı bulmuşlardır (MURRAY, 1986). Bizim araştırma sonuçlarımızda penisilin'e ve amikasin'e dirençli tespit edilen beta-laktamaz pozitif iki *S. faecalis*'den birisi sefazolin'e duyarlı ve diğeri orta derecede duyarlı tespit edilmiştir. Bu antibiyogram sonuçları anılan araştırmacıların doğrultusundadır. Ancak çalışmamızda beta-laktamaz inhibitörleri olarak bilinen klavulanat-amoksisilin'e *S. faecalis* izolatlarından birisi duyarlı diğeri orta derecede duyarlı bulunmuştur.

Ofloksasin'e karşı plazmid aracılı direnç oluşması şimdiye kadar literatürde gösterilmemiştir. Sadece kromozom aracılı direnç oluşmaktadır. Bu durum gözönüne alındığında araştırmamız sonucunda tespit edilen *S. faecalis* izolatlarının ofloksasin'e % 100 duyarlı tespit edilmesi bu bilgiler doğrultusundadır.

Sonuçta beta-laktamaz pozitif olarak tespit edilen *S. faecalis*'ler üzerinde düşünülmesi gereken olgulardır.

KAYNAKLAR

- BAUER, A.W., KIRBY, W.M.M., SHERRIS, J.C., TRUCK, M., 1970. Antibiotic susceptibility testing a standardized single disk method, Am. J. Clin. Path. 45. (4), 493.
- BAUERNFEIND, A., 1986. Classification of beta-lactamases. Reviews of Infectious diseases, 8 (suppl. 5), 470-481.
- DEIBEL, R.H., SEELEY, H.W., 1974. "*Streptococcus*", Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ed. Buchanan, R.E., and Gibbons, N.E., 8 th ed. 490-509 The Williams and Wilkins Company Baltimore.
- KAYAALP, S.O., 1987. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Cilt 1, 4. baskı, Toraman Matbaası, 592-773.
- KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., DOWELL, J.R. 1988. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 3 th ed. J.B. Lippincott. Philadelphia 840 sayfa.
- MEDEIROS, A.A., 1984. Beta-lactamase, British Medical Bulletin, 40. (1), 18, 27.
- MURRAY, B.E., MEDERSKI-SAMARAJ, B., 1983. Transferable betalactamase a: new mechanism for in vitro penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*, J. Clin. Invest, 72, 1168-1171.
- MURRAY, B.E., MEDERSKI-SAMARAJ, B., 1986. In vitro studies of plasmid-mediated Penicillinase from *Streptococcus faecalis* suggest a *Staphylococcal* origin, J. Clin. Invest. 77, 289.
- WASHINGTON, J.A., 1985. Laboratory Procedures in Clinical Microbiology, 2 nd edition United States of America 885 sayfa.