

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**ENTEROBACTERIACEAE KLİNİK İZOLATLARINDA BETA
LAKTAMAZ AKTİVİTESİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

GÜL BAYRAM ABİHA

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. NURAN DELİALİOĞLU

MERSİN-2013

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**ENTEROBACTERIACEAE KLİNİK İZOLATLARINDA BETA
LAKTAMAZ AKTİVİTESİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

GÜL BAYRAM ABİHA

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. NURAN DELİALİOĞLU

Bu tez çalışması Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-SBE TM (GB)
2011-1 DR nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 36

MERSİN-2013

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “Enterobacteriaceae Klinik İzolatlarında Beta Laktamaz Aktivitesinin Fenotipik Ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması” başlıklı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27/06/2013

Prof. Dr. Fatih KÖKSAL

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Nuran DELIALIOĞLU

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışman

Prof. Dr. M. Sami SERİN

Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Jüri üyesi

Prof. Dr. Candaş ÖZTÜRK

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Jüri üyesi

Doç. Dr. Feza OTAĞ

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Jüri üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 22/07/2013 tarih ve 2013.1.134 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Ş. NECATİ İLMAZ



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince her konuda yardımlarını ve desteğini esirgemeyen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ'a ve başta tez danıŐmanım Sayın Prof. Dr. Nuran DELİALİOğLU olmak üzere değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK, Prof. Dr. Gönül ASLAN, Sayın Doç. Dr. Feza OTAğ ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Seda TEZCAN'a eğitim ve öğretimime katkılarından dolayı teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Tez çalıŐmam boyunca laboratuvar ortamında sonsuz destek ve katkılarını gördüğüm tüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çalıŐanlarına teŐekkürlerimi sunarım.

YaŐamımın her döneminde olduğu gibi çalıŐmalarım sırasında da teŐvik ve desteğini gördüğüm eŐim ve aileme teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Enterobacteriaceae</i>	4
2.1.1. Sınıflandırma	5
2.1.2. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri.....	5
2.1.3. Kültür özellikleri.....	7
2.1.4. Biyokimyasal Özellikleri	7
2.1.5. Antijen Yapı.....	8
2.1.6. Virulans ve Patogenite Özellikleri.....	9
2.1.6.1. Adezinler.....	9
2.1.6.2. Endotoksin	10
2.1.6.3. Enterotoksin	10
2.1.6.4. Shigatoksin ve Shigatoksin benzeri (Shigalike) toksinler	10

2.1.6.5. Hemolizinler	11
2.1.6.6. Sideroforlarla Demir Kazanımı	11
2.1.6.7. Kapsül	11
2.1.7. Dirençlilik	12
2.1.8. Plazmidler	12
2.1.9. Patogenez	13
2.1.10. Yaptığı Hastalıklar	13
2.1.11. Tedavi	14
2.1.12. <i>Escherichia coli</i>	15
2.1.12.1. Epidemiyoloji.....	16
2.1.12.2. Tedavi.....	17
2.1.13. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
2.1.14. Tedavi	18
2.2. Beta Laktam Antibiyotikler	19
2.2.1. Penisilinler	20
2.2.1.1 Doğal penisilinler.....	20
2.2.1.2. Aminopenisilinler	21
2.2.1.3. Karboksipenisilinler.....	22
2.2.1.4. Üreidopenisilinler	22
2.2.1.5. Penisilinaza Dirençli Penisilinler (Antistafilokoksik Penisilinler)	22
2.2.2. Sefalosporinler	23
2.2.2.1. Birinci Kuşak Sefalosporinler.....	23
2.2.2.2. İkinci Kuşak Sefalosporinler	23
2.2.2.3. Üçüncü Kuşak Sefalosporinler	24
2.2.2.4. Dördüncü Kuşak Sefalosporinler	25
2.2.3. Monobaktamlar	25

2.2.4. Karbapenemler.....	26
2.3. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç.....	26
2.3.1. İlacın Hedefine Etkin Konsantrasyonda Ulaşmasının Engellenmesi	27
"2.3.2. Hedef PBP Moleküllerinin Değişmesi	27
2.3.3. İlacı İnaktive Eden Beta- Laktamazların Üretimi.....	28
2.4. Beta-Laktam/Beta-Laktamaz İnhibitör Kombinasyonları	28
2.5. Beta Laktamaz Yapısı ve Sınıflandırılması	29
2.5.1 Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar	32
2.5.2. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazların Tarihçesi	33
2.5.2.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Tipleri.....	33
2.5.2.1.1. TEM.....	34
2.5.2.1.2. SHV	35
2.5.2.1.3. CTX-M.....	35
2.5.2.1.4. OXA.....	38
2.5.3. Metallo Beta Laktamazlar.....	39
2.5.4. GSBL'lerin Laboratuvar Tanısı	40
2.5.4.1. Kombine Disk Yöntemi	40
2.5.4.2. Çift Disk Sinerji (ÇDST) Testi	41
2.5.4.3. E-test Yöntemi	41
2.5.4.4. Otomatize Sistemler (Vitek, MicroScan, BD Phoenix).....	42
2.5.4.5. Moleküler Teknikler	42
2.5.4.5.1. Repetitive Extragenic Palindromic Elements PZR (Rep-PZR)	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	45
3.1. Gereçler.....	45
3.1.1. Çalışma Grubu ve Örnekler	45
3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler	45

3.2. Bakteriyolojik Tanı İçin Kullanılan Besiyerleri ve Boyalar	47
3.2.1. %5 Kanlı Agar'ın Hazırlanması	47
3.2.2. Eosin Methylene Blue Agar'ın (EMB) Hazırlanması.....	47
3.2.3. Mueller Hinton Agar'ın Hazırlanması	48
3.2.4. Triple Sugar Iron Agar'ın (TSI) Hazırlanması	48
3.2.5. Lysine Iron Agar'ın (LIA) Hazırlanması	48
3.2.6. Simmonds' Sitrat Agar'ın Hazırlanması.....	49
3.2.7. Üre Agar'ın Hazırlanması.....	49
3.2.8. Sülfat, İndol, Hareket besiyeri (SIM) Besiyerinin Hazırlanması.....	49
3.2.9. Besiyerlerinin Kalite Kontrolü.....	50
3.2.10. Gram Boyama	50
3.2.11. Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar	51
3.2.11.1. 10X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) Tamponu Stok Solüsyonu	51
3.2.11.2. Elektroforez Yürütme Tamponu (1X TBE).....	51
3.2.11.3. Yükleme Tamponu (Loading Buffer)	51
3.2.11.4. Etidyum Bromid (Et-Br).....	52
3.2.11.5. Agaroz Jel Solüsyonu	52
3.3. Hasta Örneklerinin Kültürü ve Değerlendirmesi	52
3.3.1. İzole Edilen Suşlara Çift Disk Sinerji Testi Yönteminin Uygulanması	54
3.3.2. İzole Edilen Suşlara Kombine Disk Difüzyon Yönteminin Uygulanması ...	55
3.3.3. İzole Edilen Suşlara E-test Yönteminin Uygulanması	55
3.4. Moleküler Yöntemle İzolatlarda Antibiyotik Direnç Genlerinin Saptanması.....	56
3.4.1. DNA İzolasyonu	56
3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	56
3.4.2.1. Amplifikasyon Koşulları.....	59
3.4.2.2. Elektroforez	59

3.4.3. rep-PZR Yöntemi (Diversilab)	60
3.4.3.1. REP-PZR Diversilab Sistemi ile Moleküler Tiplendirme	60
3.4.3.2. DNA İzolasyonu	60
3.4.3.2.1. DNA Ekstraksiyonunun Yapılışı	61
3.4.3.2.2. DNA Miktarlarının Ölçülmesi	62
3.4.3.3. Rep-PZR Uygulaması	62
3.4.3.4. Diversilab DNA Labchip Uygulaması.....	63
3.4.3.4.1. Jel-Boya Matriks Hazırlanması	63
3.4.3.4.2. Çip Yükleme	64
3.4.3.5. İzolatların Rep-PZR Parmak İzi İlişkilerinin Değerlendirilmesi	65
4. BULGULAR.....	66
4.1. Örneklerin Değerlendirilmesi	66
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları	67
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları	71
4.4. Rep PZR Sonuçları	78
5. TARTIŞMA	89
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	99
7. KAYNAKLAR	101
ÖZGEÇMİŞ	112

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. CTX-M Genotiplerinin Küresel Yayılımı	38
Şekil 4.1. Çift Disk Sinerji Testi.....	70
Şekil 4.2. Kombine Disk Testi.....	70
Şekil 4.3. E-test.....	71
Şekil 4.4. CTX-M grup 1 Tipi Beta Laktamaz Üreten İzolatların Elektroferez Görüntüsü	73
Şekil 4.5. TEM ve OXA Tipi Beta Laktamaz Üreten İzolatların Elektroferez Görüntüsü	74
Şekil 4.6. LAT Tipi Beta Laktamaz Üreten İzolatların Elektroferez Görüntüsü	74
Şekil 4.7. PER Tipi Beta Laktamaz Üreten İzolatların Elektroferez Görüntüsü.....	75
Şekil 4.8. KPC Tipi Beta Laktamaz Üreten İzolatların Elektroferez Görüntüsü	75
Şekil 4.9. OXA-48 Tipi Beta Laktamaz Üreten İzolatların Elektroferez Görüntüsü	76
Şekil 4.10. Aac(6')Ib Genine Sahip İzolatların Elektroferez Görüntüsü.....	76
Şekil 4.11. QnrS Genine Sahip İzolatların Elektroferez Görüntüsü.....	77
Şekil 4.12. Qepa Genine Sahip İzolatların Elektroferez Görüntüsü... ..	77
Şekil 4.13. Ana Klon I Dendogram	80
Şekil 4.14. Ana klon I Benzerlik Matriksi.....	81
Şekil 4.15. Ana klon II Dendogram.....	82
Şekil 4.16. Ana Klon II Benzerlik Matriksi.....	82
Şekil 4.17.Üçüncü Klon Dendogram.....	83
Şekil 4.18. Üçüncü Klon Benzerlik Matriksi	83
Şekil 4.19. Dördüncü Klon Dendogram	84
Şekil 4.20. Dördüncü Klon Benzerlik Matriksi	84
Şekil 4.21. Beşinci Klon Dendogram	85
Şekil 4.22. Beşinci Klon Benzerlik Matriksi	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. <i>Enterobacteriaceae</i> Ailesinin Sınıflandırması	6
Çizelge 2.2. Enterobakterilerin Mac Conkey ve Koyun Kanlı Agarda Koloni Görünümleri.....	8
Çizelge 2.3. Enterobakterilerin İzolasyonunda Çok Kullanılan Besiyerleri	8
Çizelge 2.4. Enterobakterilerin Çabuk İdentifikasyonu İçin İpuçları.....	9
Çizelge 2.5. Çeşitli Enterobakteri Türlerinin Sıklıkla Oluşturduğu Enfeksiyonlar.....	14
Çizelge 2.6. <i>E. coli</i> 'nin Virulans Faktörleri.....	15
Çizelge 2.7. <i>E. coli</i> ile Gelişen Gastroenteritler	16
Çizelge 2.8. Beta Laktam Grubu Antibiyotikler.....	20
Çizelge 2.9. Beta Laktamazların Fonksiyonel ve Moleküler Sınıflandırması.....	31
Çizelge 2.10. CTX-M Grubu Enzimlerin Yıllara göre Epidemiyolojisi	37
Çizelge 2.11. GSBL'ler İçin Tarama Testi Olarak Önerilen İnhibisyon Zon Değerleri	41
Çizelge 3.1. Antibiyotik İnhibisyon Zon Çapları	54
Çizelge 3.2. Beta Laktamaz Gen Bölgesi İçin Primerler.....	57
Çizelge 3.3. Karbapenemaz Gen Bölgesi İçin Primerler	58
Çizelge 3.4. Kinolon Gen bölgesi için Primerler.....	58
Çizelge 3.5. Rep-PZR'de Bir Örnek İçin Hazırlanan Reaksiyon Karışımı	62
Çizelge 3.6. Rep-PZR Amlifikasyon Koşulları	63
Çizelge 4.1. <i>E. coli</i> ve <i>K. pneumoniae</i> Suşlarının İzole Edildiği Klinik Örnekler	66
Çizelge 4.2. İzolatların Kliniklere Göre Dağılımı	67
Çizelge 4.3. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları	68
Çizelge 4.4. GSBL Pozitiflik Oranının Yöntemlere Göre Dağılımı.....	69
Çizelge 4.5. İzolatlarda Saptanan Beta laktamaz Enzimleri.....	72
Çizelge 4.6. İzolatlarda Saptanan Karbapenemaz Enzimleri	72
Çizelge 4.7. İzolatlarda Saptanan Kinolon Direncinden Sorumlu Gen Bölgeleri	73
Çizelge 4.8. Ana klonlardaki Örneklerin Özellikleri.....	79
Çizelge 4.9. Aynı Klonda Yer alan Suşların Antibiyotik Duyarlılık Profilleri	86
Çizelge 5.1. GSBL Üretimi İle İlgili Türkiye'de Yapılmış Çalışmalar.....	90

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AK:	Amikasin
AMC:	Amoksisilin Klavulonik Asit
ATM:	Aztroneam
CAZ:	Seftazidim
CIP:	Siprofloksasin
CLSI:	The Clinical and Laboratory Standards Institute
CTX:	Sefotaksim
CXM:	Sefuroksim
DNA:	Deoksiribonükleik asit
FOX:	Sefoksitin
GN:	Gentamisin
GSBL:	Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar
IPM:	İmipenem
LEV:	Levofloksasin
LPS:	Lipopolisakkarit
MEM:	Meropenem
PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MHA:	Mueller Hinton Agar
OXA :	Oxacillin
PBP:	Penisilin Bağlayan Proteinler
PER-1:	<i>Pseudomonas</i> extended resistance-1
SHV:	Sulfhydryl variable
TBE:	Tris-Borik Asit-EDTA
TEM-1:	Temoniera-1
YBÜ:	Yoğun Bakım Ünitesi

ÖZET

Enterobacteriaceae Klinik İzolatlarında Beta Laktamaz Aktivitesinin Fenotipik Ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması

Enterobacteriaceae türlerinde bulunan beta-laktamaz enzimi beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek birçok antibiyotiğe dirence sebep olmaktadır.

Çalışmada, 109 *E. coli* ve 24 *K. pneumoniae* suşunun GSBL aktivitesinin çeşitli fenotipik yöntemlerle tespit edilmesi ve genotipik yöntemlerle beta laktamaz ve kinolon direncinden sorumlu gen bölgelerinin belirlenmesi, ek olarak da GSBL pozitif olarak saptanan 100 *E. coli* suşunun rep-PZR ile klonal ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çift sinerji testi ile *E.coli* suşlarının 107'si (%96,4) pozitif ve ikisi (%3,6) negatif, *K. pneumoniae* suşlarının 23'ü pozitif (%95,7) ve biri (%4,3) negatif, E-test ile *E.coli* suşlarının 102'si (%93) pozitif ve yedisi (%7) negatif, *K. pneumoniae* suşlarının 22'si (%92) pozitif, 2'si (%8) negatif, kombine disk difüzyon testi ile *E.coli* suşlarının 108'i (%99,08) pozitif, biri (%0,92) negatif, *K. pneumoniae* suşlarının 23'ü (%95,7) pozitif ve biri (%4,3) negatif olarak saptandı. Suşların 114'ünde (%85) CTX-M grup 1 enzimi, 43'ünde (%32,1) TEM tipi, 44'ünde (%32,8) OXA tipi, 31'inde hem TEM hem OXA tipi ve bir izolatta hem TEM hem SHV tipi beta laktamazlar saptandı. Kinolon direncinden sorumlu *aac(6')-Ib-cr* gen bölgesi ise 82 *E. coli* (%75,3), 15 *K. pneumoniae* (%62,5) suşunda pozitif olarak saptandı. Rep-PZR Diversilab yöntemi ile tiplendirilen 100 *E. coli* izolatından ikisi ana klon (1 ve 2) olmak üzere toplam 5 farklı klon (1-5) elde edildi. Sonuç olarak, klinik örneklerden izole edilen enterik bakterilerin çoğunluğunda beta-laktamaz ve kinolon direnç genleri saptanmıştır. Bu direnç genlerinin bakteriler arasında klonal olarak yayılımının önlenmesi için gerekli tedbirlerin alınması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: *E. coli*, *K. pneumoniae*, geniş spektrumlu beta laktamaz, polimeraz zincir reaksiyonu, rep-PZR.

ABSTRACT

Investigation of Beta Lactamase Activity in *Enterobacteriaceae* Clinic Isolates with Phenotypic and Genotypic Methods

Beta lactamase enzyme, found in *Enterobacteriaceae* species, hydrolyze beta lactam antibiotics and causes antibiotic resistance.

In this study, we aimed to detect ESBL activity with several phenotypic methods in 109 *E. coli* and 24 *K. pneumoniae* strains and determine gene regions responsible for beta lactamase and quinolone resistance with genotypic methods, in addition to this, investigation of clonal relationship in ESBL positive 100 *E. coli* strains with rep-PCR.

With double disc synergy test 107 *E.coli* (96,4%) strains were positive and two were (3,6%) negative, 23 *K. pneumoniae* strains were positive (95,7%) and one was (4,3%) negative, with E-test 102 *E.coli* strains were (93%) positive and seven were (7%) negative, 22 (92%) *K. pneumoniae* strains were positive, two (8%) negative, with combine disc diffusion test 108 (99,08%) *E.coli* strain were positive, one (0,92%) was negative, 23 (95,7%) *K. pneumoniae* strains were positive and one (4,3%) was negative. CTX-M group 1 enzyme was in 14 (85%) strains, TEM was in 43 (32,1%) strains, OXA in 44 (32,8%), both TEM and OXA in 31 strains, and both TEM and SHV were in one strain detected. *aac(6')-Ib-cr* gene region responsible for quinolone resistance was found positive in 82 *E. coli* (75,3%), 15 *K. pneumoniae* (62,5%) strains. 100 *E. coli* isolates identified by rep-PCR Diversilab method, was acquired in totaly five different clons (1-5) including two main clones. Finally, beta-lactamase and quinolone resistance genes were established in most of the enteric bacteria isolated from clinic samples. It is required to take necessary precautions to prevent clonal spread of these resistance genes in bacteria.

Key words: *E. coli*, *K. pneumoniae*, extended spectrum beta lactamase, polymerase chain reaction, rep-PCR.

1. GİRİŞ

Enterobacteriaceae; insanda enfeksiyon etkeni olarak sıklıkla izole edilen, çok sayıda bakteri cinsini ve türünü içeren bir ailedir. *Enterobacteriaceae* ailesinde tıbbi önemi olan birçok bakteri türü yer almaktadır. Bu ailedeki bakterilerin birçoğu insan ve hayvanların bağırsak florasında, bitkilerde, toprakta ve suda yaygın olarak bulunmaktadır (1). Bu ailede yer alan mikroorganizmaların, insanda sepsisemi, menenjit, cerrahi yara enfeksiyonları, pnömoni, idrar yolu enfeksiyonları gibi hemen her doku ve organı tutan enfeksiyonların büyük bir kısmından, sorumlu olduğu bildirilmiştir. *Enterobacteriaceae* ailesindeki önemli cinsler: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Yersinia*, *Morganella*, *Serratia*, *Providencia* olarak sıralanmaktadır (2).

Son yıllarda birçok antibiyotik direnç mekanizmasının birlikteliği ile klinikte kullanılan tüm antibiyotiklere dirençli bakterilere rastlanmaktadır. Özellikle direnç genlerinin plazmitler ile aktarılabilir olması ve bu plazmitler üzerinde çok sayıda antibiyotik direnç geninin bir arada bulunabilmesi, direncin hızla yayılması yanında, birçok antibiyotiğin de klinik kullanımdan kaldırılmasına neden olmuştur (3). Antimikrobiyal direnç son yıllarda tüm dünyada hastanede yatan hastalarda anlamlı derecede artmıştır. Direnç gelişiminin en önemli nedenlerinden birisi antibiyotiklerin aşırı ve uygunsuz kullanımudur. Hastane ortamında bulunan bakterilerin toplum kökenli enfeksiyon etkeni olan bakterilere göre daha dirençli oldukları bilinmektedir. Bunun en önemli nedeninin özellikle son 35–40 yıl içinde geliştirilen antibiyotiklerin hastane ortamında yaygın olarak kullanılması olduğu düşünülmektedir. Beta-laktam grubu antibiyotikler çeşitli Gram negatif ve Gram pozitif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanıldığı için bu antibiyotiklere karşı direnç oluşumu sık görülmektedir. Gram pozitif bakterilerde en sık görülen beta-laktam direnç mekanizması Penisilin Bağlayan Protein (PBP) değişimleri iken Gram negatif bakterilerde antibiyotiği inaktive eden beta laktamaz enzimlerinin üretimidir (4). Birçok Gram negatif bakteri cinsi doğal olarak kromozomal genler tarafından kodlanan beta-laktamazlar üretmektedir. Son yirmi yıllık dönemde çok sayıda yeni beta-laktam

antibiyotik geliştirilmiş ancak tedaviye giren her yeni antibiyotikle birlikte farklı türde beta-laktamaz grupları da ortaya çıkmıştır (5).

Beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hale getiren beta-laktamaz enzimi üretimi, başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından birisidir. Bugüne kadar 350'ye yakın beta-laktamaz enzimi tanımlanmıştır. Bunların yaklaşık 150 tanesi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlardır (GSBL) (3). GSBL'ler, Gram negatif çomaklarda bulunan, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama karşı dirençten sorumlu olan enzimlerdir. Özellikle *Klebsiella* türleri ve *Escherichia coli* başta olmak üzere, GSBL üretimi ve patojen bakteriler arasında hızla yayılımı, son yıllarda tedavide ciddi sorunlar oluşturmaktadır (6).

GSBL sentezleyen *E. coli* ve *Klebsiella* suşları çoğunlukla birçok antibiyotiğe dirençli olduklarından bu mikroorganizmalar ile gelişen enfeksiyonlarda tedavi seçenekleri kısıtlıdır. GSBL üreten mikroorganizmalara bağlı birçok epidemiy bildirilmiş olup GSBL üretiminin klinik yanıtı olumsuz etkilediği ve GSBL üreten mikroorganizmalara bağlı bakteriyemilerde mortalitenin arttığı farklı araştırmalarda gösterilmiştir (7).

Plazmitler aracılığı ile beta-laktamlar, makrolitler, aminoglikozitler gibi birçok antibiyotik grubuna direnç geliştiği bilinmekle birlikte, 1998 yılına kadar kinolon grubu antibiyotiklere plazmitler aracılığı ile direnç gelişebileceği kesin olarak bilinmemekteydi (8,9). Ancak ilk kez 1998 yılında ABD'nde çoklu antibiyotik direncine sahip bir *Klebsiella pneumoniae* suşunda plazmit aracılı kinolon direncine neden olan *qnr* (quinolon resistance) geninin saptanmasının ardından dünya genelinde bu konuda yapılmış çalışmalar hızla artmıştır (10,11). Ülkemizde plazmit aracılı kinolon direnci 2005 yılında yapılan bir çalışma ile ilk kez gösterilmiş, sonrasında da farklı merkezlerde bu tip direncin varlığını gösteren çalışmalar yapılmıştır (12). Daha sonra İstanbul, Ankara, İzmir, Kuzey Doğu Anadolu'dan plazmitte kodlanan çeşitli (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aaa(b)-Ib-cr*) kinolon direnç genleri bildirilmiştir (13,14,15).

Nozokomiyal enfeksiyonlar; hastanede kalış süresini uzatan ve ek tedavi maliyetlerini arttıran morbidite ve mortalitesi yüksek enfeksiyonlardır. Hastanelerin yoğun bakım üniteleri (YBÜ) hastane geneline göre invaziv girişimlerin daha sık uygulandığı dirençli mikroorganizmaların daha çok izole edildiği birimlerdir. Hastane

genelinde hastane enfeksiyon insidansı %5-10 iken YBÜ'nde bu oran %20-25 olarak bildirilmektedir (16). Nozokomiyal enfeksiyonlar için risk grubunda yer alan hastalar; vücut direncinin yeterli olmadığı prematüre ve yeni doğanlar, yaşlılar, operasyon geçirenler, immün sistemi baskılanmış olanlar, yanıklı ve travmalı hastalar, metabolik bozukluğu ve malignitesi olan hastalardır. Ventilatörle ilişkili pnömoniler, üriner sistem enfeksiyonları, bakteriyemi ve kateter enfeksiyonları ile cerrahi alan enfeksiyonları YBÜ'de en sık görülen nozokomiyal enfeksiyonlardır (17). Üriner sistem enfeksiyonlarının nozokomiyal enfeksiyonlar içerisinde birinci sırada yer aldığı ve nozokomiyal enfeksiyonların %40-60'ını oluşturduğu bilinmektedir. Üriner sistem enfeksiyonları yoğun bakım ünitelerinde pnömonilerle beraber en sık görülen iki enfeksiyondan biridir (18). Hastaların yaklaşık %80'inde üretral kateter kullanımı geri kalanlarda sistoskopi ve diğer ürolojik girişimler bu enfeksiyonların kaynağı olarak gösterilmiştir (19). Etken mikroorganizmaların çoğu hastanın kendi bağırsak florasından köken almakla birlikte hastane ortamından kolonize olan mikroorganizmalar enfeksiyona yol açabilmektedir. *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis* ve *Pseudomonas aeruginosa* kısa süreli kateterizasyonlarda; *Providencia stuartii*, *P.mirabilis*, *E. coli*, *Morgenella morganii* ise uzun süreli kateterizasyonlarda sık rastlanan etkenler olarak sıralanmaktadır (20). Türkiye'de 2007 yılında yapılan MYSTIC (Meropenem yearly susceptibility test information collection) çalışmasının verilerine göre *K. pneumoniae* suşlarının % 40,5'i ve *E. coli* suşlarının %15,3'ü GSBL-pozitif bulunmuştur (21). Yine aynı yıl 13 merkezin katıldığı HITIT-2 surveyans çalışmasında hastanede yatan hastalardan izole edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında GSBL oranları %42 ve %41,4 bulunmuştur (22).

Bu çalışmada, yatan hastalardan izole edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarının GSBL aktivitesinin çeşitli fenotipik yöntemlerle tespit edilmesi ve genotipik yöntemlerle beta laktamaz ve kinolon direncinden sorumlu gen bölgelerinin belirlenmesi, ek olarak da GSBL pozitif olarak saptanan 100 *E. coli* suşunun rep-PZR ile klonal ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae ailesi; tıbbi olarak önem taşıyan Gram negatif çomakların en büyük ve en heterojen topluluğudur. Kırktan fazla cins ve yüzlerce tür ve alt tür tanımlanmıştır. Bu türler biyokimyasal özelliklerine göre, antijenik yapılarına, DNA-DNA hibridizasyon ve 16S rRNA dizilimlerine göre sınıflandırılmışlardır (22).

Enterobacteriaceae tüm dünyada toprakta, suda, bitkilerde, insan dahil olmak üzere çoğu hayvanların doğal bağırsak florasında sıklıkla bulunan organizmalardır. Bu bakteriler insanda bakteriyemilerin %30-35'i, idrar yolu enfeksiyonlarının %70'den fazlası ve intestinal enfeksiyon gibi birçok hastalığın sebebi olabilirler. Bazı mikroorganizmalar (örnek: *Salmonella typhi*, *Shigella* türleri, *Yersinia pestis*) sadece insanda hastalık yaparken bazıları (örnek: *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. mirabilis*) normal komensal floranın elemanı olarak fırsatçı enfeksiyonlara neden olurlar. *Enterobacteriaceae* ile ilişkili enfeksiyonlar hayvan rezervuardan (örnek: *Salmonella* ve *Yersinia* türleri); taşıyıcı insandan (örnek: *Shigella* türleri, *Salmonella* serotip Typhi) ya da duyarlı bir bireyde endojen yayılım (örnek: *E. coli*) yoluyla bulaşabilir ve vücudun genel olarak her bölgesinde (santral sinir sistemi, alt solunum yolu, kan, sindirim sistemi ve üriner sistemde) enfeksiyona neden olabilirler (23).

Enterobakteri ailesindeki çoğu bakteriler şu özellikleri paylaşırlar:

- a. Gram negatif basil olmak
- b. Sporsuz olmak
- c. Peritriş kirpiklerle hareketli ya da hareketsiz olmak
- d. Pepton ya da et özlü besiyerinde NaCl ve bir başka madde ilavesi olmadan üremek
- e. Mac Conkey agarda iyi üremek
- f. Aerop ve anaerop ortamların her ikisinde üreyebilmek
- g. Glukozdan fermentasyonla asit oluşturmak ve bunun yanı sıra çoğunlukla gaz yapmak

- h. Katalaz pozitif olmak
- i. Oksidaz negatif olmak
- j. Nitratı, nitrite çevirmek
- k. DNA'da Guanin+Sitozin (G+C) oranının % 39–59 arasında olması

2.1.1. Sınıflandırma

Enterobakterilerin sınıflandırılma ve adlandırılmasında son zamanlara kadar biyokimyasal fizyolojik ve antijenik fenotip özellikleri kullanılmaktaydı (24). Günümüzde bu fenotip özelliklerini güçlendirmek için DNA benzerlik verileri de kullanılmaktadır (25). Çizelge 2.1'de Enterobakterilerin sınıflandırması verilmiştir (26).

2.1.2. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Enterobakteriler küçük (0,5-3,0 µm), Gram negatif, sporsuz basillerdir. Hareketli olanlarında peritriş kirpikler vardır. Bu özellikle kutupsal kirpikli olan *Pseudomonas* ve *Vibrio*'lardan ayrılırlar. *Klebsiella* ve *Shigella* cinsleri ile *Y. pestis* hareketsizdir. *Y. enterocolitica* ve *Y. pseudotuberculosis* 37 °C de hareketsizdir, fakat 25 °C de hareketlidir.

Enterobakteriler, çok sayıda, ortak yapısal özeliğe sahiptir:

- ❖ Sitoplazma zarını saran sert hücre duvarı,
- ❖ Çift sarmallı DNA dan oluşan tek kromozom,
- ❖ Ökaryotik ribozomlardan daha küçük ve daha az karmaşık ribozomlar,
- ❖ Oksidatif metabolizma için mitokondri yokluğu,
- ❖ Protein sekresyonu için endoplasmik retikulum yokluğu (23).

Çizelge 2.1. Enterobacteriaceae Ailesinin Sınıflandırması

Familya	Cins	Tür
I. Escherichieae	I. Escherichia II. Shigella	<i>E. coli</i> , <i>E. blatae</i> , <i>E. vulneris</i> , <i>E. fergusonii</i> , <i>E. hermannii</i> <i>S. dysenteriae</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. sonnei</i>
II. Edwardsiellae	Edwardsiella	<i>E. tarda</i> , <i>E. hoshina</i> , <i>E. ictaluri</i>
III. Salmonelleae	Salmonella	<i>S. typhi</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. paratyphi A</i> , <i>S. enteridis</i> , <i>S. gallinarum</i> , <i>S. pullorum</i>
IV. Citrobacteriaceae	Citrobacter	<i>C. freundii</i> , <i>C. diversus</i> , <i>C. amalonaticus</i>
V. Klebsielleae	I. Klebsiella II. Enterobacter III. Hafnia IV. Serratia	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. ozanae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. rhinoscleromatis</i> , <i>K. planticola</i> , <i>K. terrigena</i> , <i>K. omithinolytica</i> <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. agglomerans</i> , <i>E. amnigenus</i> , <i>E. sakazakii</i> , <i>E. gergoviae</i> , <i>E. dissolvens</i> , <i>E. taylora</i> , <i>E. nimipressuvali</i> , <i>E. nimipressuvalis</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>E. hormaechei</i> <i>H. alvei</i> <i>S. marcencens</i> , <i>S. lique</i> , <i>S. liquefaciens</i> , <i>S. rubidaea</i> , <i>S. fonticola</i> , <i>S. odorifera</i> , <i>S. plymuthica</i> , <i>S. ficaria</i>
VI. Proteeae	I. Proteus II. Morganella III. Providencia	<i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. pennei</i> , <i>P. myxofaciens</i> <i>M. morganii</i> <i>P. alcalifaciens</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. rustigianii</i>
VII. Yersinieae	I. Yersinia	<i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>Y. pestis</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. frederiksenii</i> , <i>Y. kristensenii</i> , <i>Y. intermedia</i> , <i>Y. ruckeri</i> , <i>Y. aldovae</i>
VIII. Erwinieae	I. Erwinia	<i>E. amylovora</i> , <i>E. carotovora</i>
Herhangi bir aile içine yerleştirilmemiş cinsler	Arsenophonus Budvicia Buttiauxella Cedecea Kluyvera Leclercia Leminorella Moellerella Obesumbacterium Pantoea Pragia Rahnella Tatumella Xenorhabdus Yokonella	

2.1.3. Kültür özellikleri

Enterobakteriler fakültatif anaeropturlar. En iyi 35-37°C'de ve CO₂'siz ortamda ürerler. Bazı türler (*Serratia* ve *Yersinia*) düşük ısılarda (1-5°C) da üreyebilirler. Koloniler 18-24 saat sonra görünür hale gelirler. Birçok laboratuvar, enterobakterilerin üretimi için kanlı ve çikolata agar gibi selektif olmayan besiyerlerini ve Mac Conkey agar gibi selektif besiyerlerini kullanırlar (27). Bunlar; yara, solunum yolları, idrar, steril vücut sıvıları ve kandan enterobakterileri izole etmek için kullanılır. Çikolata ve kanlı agarda büyük gri düz koloniler yaparlar. Kanlı agarda çoğu suşlar hemoliz yapmaz. Fakat *E. coli*'nin bazı suşları kuvvetli bir hemolizin ürettiğinden, kanlı agarda hemoliz yaparlar. Mac Conkey agarda laktozu fermente eden türler, laktoz fermentasyonu sonucu oluşan asit nedeniyle pembe-kırmızı koloniler meydana getirirler. Kristal viyole çöker ve nötral kırmızısı, asit pH'da kırmızıya döner. Laktoz negatifler Mac Conkey'de temiz, renksiz koloniler oluştururlar. Safra ve kristal viyole, Gram pozitif bakterilerin üremesini engellemek için, besiyerine konulmuştur. Çizelge 2.2'de bazı enterobakteri cinslerinin Mac Conkey ve koyun kanlı agarda oluşturdukları kolonilerin görünüm ve büyüklükleri görülmektedir. Enterobakterilerin izolasyonunda en çok kullanılan besiyerleri Çizelge 2.3'de gösterilmiştir (26).

2.1.4. Biyokimyasal Özellikleri

Enterobakteriler fakültatif anaerob mikroorganizmadır. Tüm enterobakteriler oksidaz negatiftir; glukozu fermente ederler, nitratları nitritlere indirgerler, fakat alginatı eritmezler. Enterobakteri ailesindeki cinslerin ve türlerin karbonhidrat fermentasyonları farklıdır. Fermente edebildikleri karbonhidratların ve oluşan son ürünlerin farklı oluşu, cins ve türlerin identifikasyonunda kullanılır. Enterobakterilerin identifikasyonunda çok eski yıllardan beri kullanılan I M V I C testi; indol reaksiyonu (I), metil kırmızı reaksiyonu (M), voges-proskauer reaksiyonu (V) ve sitrat reaksiyonu (C) olmak üzere dört reaksiyondan oluşan bir testtir. Örneğin *E. coli*'nin I M V I C testi (+ + - -), *Klebsiella*'nın IMVIC testi ise (- - + +) dir. Çizelge 2.4'de enterobakteri ailesindeki belirli cinslerin çabuk identifikasyonu için ipuçları özetlenmektedir (1, 26).

Çizelge 2.2. Enterobakterilerin Mac Conkey ve Koyun Kanlı Agarda Koloni Görünümleri

Tipik Görünüm ve Büyüklük		
Cins veya tür	Mac Conkey agar	Koyun kanlı agar
<i>Salmonella ve Shigella</i>	Renksiz, düzgün, 2-3 mm	Düzgün, 2-3 mm
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Renksiz, < 1 mm	Düzgün, < 1 mm
<i>Escherichia coli</i>	Pembe, kırmızı genellikle presipite olmuş safra ile çevrelenmiş, 2-3 mm	Düzgün (bazı suşlar beta hemolitik) 2-3 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pembe, mukoid, 3-4 mm	Mukoid, 3-4 mm
<i>Enterobacter</i>	Pembe, Klebsiella kolonileri kadar mukoid değil	Düzgün, 3-4 mm
<i>Proteus vulgaris</i> ve <i>Proteus mirabilis</i>	Renksiz, yassı, hafifçe yayılabilen, 2-3 mm	Dalga dalga yayılarak petriyi kaplayabilen
<i>Providencia, Morganella</i>	Renksiz, yassı, 2-3 mm	Yassı, 2-3 mm

Çizelge 2.3. Enterobakterilerin İzolasyonunda Çok Kullanılan Besiyerleri

Besiyeri		Karbonhidratlar	H₂S incelemesi
Çoğu türlerin üremesi için ayırıcı besiyerleri	Mac Conkey agar EMB	Laktoz Laktoz, Sukroz	- -
Enterik patojenlerin dışkıdan izolasyonu için selektif besiyerleri	HE	Laktoz, Sukroz, Salisin	+
	XLD	Laktoz, Sukroz, Ksiloz	+

2.1.5. Antijen Yapı

Enterobakterilerin belirli türlerinin antijen yapısı, epidemiyoloji ve sınıflandırmada, önemli rol oynar (Örneğin *Salmonella* ve *Shigella*'da). Somatik (O),

kirpik (flagella) (H) ve kapsül (K) antijenleri, ailenin serotiplendirmesinde kullanılan, başlıca antijenlerdir. Bunlar dışında bakteri hücrenin dış yüzeyinde bulunan ECA (*Enterobacteriaceae* Common Antigen), tüm Enterobakterilerde bulunan ortak bir antijendir (1).

Çizelge 2.4. Enterobakterilerin Çabuk İdentifikasyonu İçin İpuçları

Hızlı laktoz fermentasyonu yapanlar	Yavaş laktoz fermentasyonu yapanlar	Laktozu fermente etmeyenler
<p><i>E. coli</i>: Mac Conkeyde pembe, kırmızı, düzgün, visköz olmayan koloniler, hareketli</p> <p><i>Enterobacter aerogenes</i>: Mac Conkeyde pembe, düzgün, viskoz koloniler, hareketli</p> <p><i>Klebsiella pneumoniae</i>: Mac Conkeyde pembe, mukoid, çok viskoz koloniler, hareketsiz</p>	<p><i>Edwardsiella</i></p> <p><i>Serratia</i></p> <p><i>Citrobacter</i></p> <p><i>Arizona</i></p> <p><i>Providencia</i></p> <p><i>Erwinia</i></p>	<p><i>Shigella</i>: Hareketsiz, glukozdan gaz yapmaz</p> <p><i>Salmonella</i>: Hareketli, glukozdan asit ve gaz yapar</p> <p><i>Proteus</i>: Kanlı agarda dalga dalga yayılır, üremeyi hızla hidrolize eder (Amonyak kokusu duyulur)</p>

2.1.6. Virulans ve Patojenite Özellikleri

2.1.6.1. Adezinler

Çoğu Gram negatif bakterilerde fimbria veya pili denen yüzey organelleri vardır. Bunlar bakteri hücrenin yüzeyinden, bütün yönlere ışınal uzanan yapılardır. Heliks şeklinde düzenlenmiş protein parçacıklarından oluşmuştur. Bu organeller bakterinin mukozaya tutunmasını sağlar. Mikroorganizmanın konak dokuya yerleşmesindeki temel basamaktır.

2.1.6.2. Endotoksin

Hücre duvarının LPS'inin Lipid A bölümü, toksik aktiviteden sorumludur. Hayvanlara enjeksiyondan sonra, hayvanda ateş, öldürücü şok, lökositlerde değişiklikler, tümörlerin gerilemesi, enfeksiyonlara karşı konağın yanıtının değişmesi, Sanarelli-Schwartzman reaksiyonu ve çeşitli metabolik değişiklikler gibi çeşitli etkiler oluşturmaktadır. Endotoksinin üriner yol veya yara enfeksiyonlarındaki rolü belirgin değildir, buna karşın Gram negatif bakteriyemili hastalarda ölümlere yol açmaktadır. Enterik bakteriyemili hastaların %30 unda endotoksik şok gelişir ve böyle şoklu hastaların %40–90'ı ölmektedir.

2.1.6.3. Enterotoksin

Genellikle ince bağırsakları etkileyip bağırsak lümenine bol sıvı atımına ve sonuçta da diyareye neden olan toksinlerdir. Kolera toksinine benzerler. Bazı *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* ve *Enterobacter* suşları enterotoksinler salgılamaktadır. *Salmonella* ve *Shigella* enfeksiyonlarında enterotoksinin rolü açık değildir. Bu hastalıkların patogeneğinde dokuya penetrasyon önemlidir.

2.1.6.4. Shigatoksin ve Shigatoksin benzeri (Shigalike) toksinler

Bazı *Shigella* suşları memeli hücrelerinin protein sentezini bozan ve Shigatoksin denen toksinler oluştururlar. Benzer etkili toksinler bazı *E. coli* suşları tarafından da salgılanmaktadır. Bu toksinlerin etkisi ilk olarak vero (Afrika yeşil maymunu) doku hücrelerinde gösterildiği için verotoksin olarak isimlendirilmiştir. Verotoksin salgılayan *E. coli* suşları hemolitik diyare ve hemolitik üremik sendroma yol açarlar.

2.1.6.5. Hemolizinler

Çeşitli enterobakteri suşlarının salgılanan, hücre dışı ürünlerdir. Hemolizinlerin *E. coli*'nin neden olduğu bazı hastalıklarda önemli olduğu gösterilmiştir. Bağırsak dışı enfeksiyonlarından izole edilen *E. coli* suşlarının yarıdan fazlası hemolizin salgılar; oysa gastrointestinal yol enfeksiyonuna yol açan *E. coli* suşlarının sadece %10'u hemolizin yapmaktadır. Çoğu üropatojen *E. coli*'lerde hem P fimbria, hem de hemolizin bulunur. Hemolizinlerin sitotoksik etkileri yalnızca alyuvarlarla sınırlı değildir. Alfa hemolizinler, lenfositlere daha etkin olan sitoksinlerdir. Beta toksinler ise nötrofillerin kemotaksisini ve fagositozunu önlemektedirler.

2.1.6.6. Sideroforlarla Demir Kazanımı

Demir, esansiyel bir gelişme faktörüdür. Dokularda ve mukozalarda serbest demirin düşük yoğunlukta olması, enterobakterilerle oluşan bağırsak dışı enfeksiyonlarda konak savunma faktörlerindedir ve bakteri üremesini önleyicidir. Enterobakteriler konak organizmada canlı kalabilmek ve bağırsak dışı dokulara yayılabilmek için, demir sağlamak üzere, çeşitli mekanizmalar geliştirirler. Bunlardan biri demir bağlamaya çok büyük eğilim gösteren, siderofor denen düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Bakteriler konak organizmada transferin veya laktoferrin gibi demir bağlanmış olan moleküllerden, sideroforlar aracılığı ile demir kazanmaktadırlar (26).

2.1.6.7. Kapsül

Kapsüllü *Enterobacteriaceae* üyeleri fagositozdan hidrofobik hücre yüzeyini iten hidrofilik kapsül antijenleri ile korunur. Bu antijenler antikorların bakteriye yapışmasını engeller, zayıf immünojendirler ve komplemanı aktive etmezler. Ancak

kişide kapsüle karşı spesifik antikorlar gelişirse, kapsülün koruyucu rolü zayıflar (23).

2.1.7. Dirençlilik

Enterobakteriler sporsuzdur. Çoğu düşük konsantrasyonda germisid ve dezenfektanlar ve ısıyla kolayca inaktive olurlar. Fenol türevleri, formaldehit, beta gluteralehit, halojenli bileşikler bakterisit etkilidir. Fakat dörtlü amonyum bileşikleri bakteriyostatik etki gösterebilir. Enterik patojenlerin kontrolünde suların klorlanması etkilidir. Enterobakteriler kuruluğa kısmen duyarlıdır. Fakat yeterli nem olduğunda, çok uzun zaman canlı kalabilirler. Hastanelerde solunum cihazları ve anestezi aletleri enterobakteri enfeksiyonlarının kaynağıdır. Enterobakteriler kardan ve buzdan izole edilmiştir. Enterobakterilerin gıdalarda kontrolü pastörizasyon ve doğrudan pişirme ile sağlanır. Ayrıca bu bakterilerle oluşan enfeksiyonların önlenmesinde kişisel hijyen kurallarına uymak ve el yıkama alışkanlığı çok önemlidir (26).

2.1.8. Plazmidler

Plazmidler bakteri hücresinde kendi kendine replike olabilen kromozom dışı DNA parçalarıdır. Gram negatif bakterilerde sık karşılaşılan plazmidler, direnç plazmidleridir (R plazmidler). Bunlar antibiyotik direncinden sorumludur. İlaç direnci, R-plazmid üzerinde transpozon adı verilen gen paketlerinde bulunur. Tıpta, ziraatte ve veterinerlikte aşırı ölçüde antimikrobiyal madde kullanımı sonucunda R-plazmidler çok sayıda transpozona sahip hale gelmiştir ve bakteriye çok sayıda ilaca direnç fenotipi kazandırır. Çoğu R-plazmidi taşıyan suşlar, diğer suşlara ve türlere konjugasyonla plazmidlerini aktarabilmektedirler. Böylece ilaç direnci kolayca yayılmaktadır (27).

Kolonizasyon faktörleri, enterotoksin, hemolizin gibi virulans faktörlerini kodlayan genler de plazmidlerde bulunur. Virulans faktörleri ve ilaç direnci genleri aynı plazmidde bulunabilir. Bu nedenle R-plazmid üzerindeki baskı ile virulans faktörleri de yayılım gösterir. İlaç direnci olmasa bile birkaç virulans faktörü aynı plazmidde taşınabilir.

Ayrıca enterobakterilerin plazmidleri epidemiyolojik amaçlarla incelenmektedir. Bir bakteri klonunun taşıdığı plazmidlerin sayısı ve büyüklükleri, başka bir klonun plazmidleri ile karşılaştırılarak enfeksiyonların kaynağı ve bulaşma yolları izlenmektedir. Bu sayede çeşitli enterobakteri cinslerine ait çok sayıda salgın aydınlatılmıştır. Ancak plazmid analizleri, biyotiplendirme, serotiplendirme, faj ve bakteriyosin tiplendirmesi gibi fenotipik tiplendirme yöntemleri ile birlikte kullanılırsa, bu yöntemlerin ayırım güçleri daha da artar (26).

2.1.9. Patogenez

Bakteriyel enfeksiyonlar birbirleriyle ilişkili birkaç basamaktan oluşur. İlk basamak organizmanın konağa girişidir. Enterobakterilerin ilk adımı mukoza reseptörlerine tutunma ve gastrointestinal yola yerleşmektir. Enfeksiyonun belirtili döneminde toksin salınımından, dokuya invazyon ve hücrelerde hasara kadar gelişen durumlarla ilgili belirtiler ortaya çıkar. Sonuçta konağın bakterinin her bir ürününe karşı gösterdiği cevap iyileşmeyi sağlar ve aynı zamanda inflamatuvar cevap hastalığının seyrini ve ağırlığını düzenler.

2.1.10. Yaptığı Hastalıklar

Enterobakteriler gastrointestinal yol dışında, vücudun başka bölgelerinde, normalde bulunmazlar. Ürogenital sistem gibi gastrointestinal yol dışındaki bulaştığı, yerleştiği yerlerde önemli enfeksiyonlar yapabilirler. *Shigella* türleri gastrointestinal yol dışında, çok nadir olarak, enfeksiyonlara yol açarlar. *Shigella* türleri hariç enterobakterilerin pek çok türü, sıklıkla bağırsaklar dışında enfeksiyonlara yol açarlar. Bu enfeksiyonlarda üriner yol enfeksiyonları (öncelikle sistit) en sık görülür. Bunun dışında solunum sistemi, yara, kan ve merkezi sinir sisteminde pnömoni, septisemi, menenjit ve abselere neden olurlar (Çizelge 2.5). Enterobakteriler, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında klinik önemi olan izolatların %50'sini, laboratuvarında izole edilen

Gram negatif basillerin %80'ini, bakteriyel gastroenteritlerin %65-70'ini, septisemilerin %50'sini, üriner yol izolatlarının %70'den fazlasını oluşturmaktadır (23).

Çizelge 2.5. Çeşitli Enterobakteri Türlerinin Sıklıkla Oluşturduğu Enfeksiyonlar

Bakteri Türü	Enfeksiyonlar
<i>Escherichia coli</i>	Üriner enfeksiyon, septisemi, neonatal sepsis, menenjit ve diyare
<i>Shigella</i>	Dizanteri, diyare
<i>Edwardsiella</i>	Diyare, yara enfeksiyonu, septisemi, menenjit, tifo benzeri tablo
<i>Salmonella</i>	Tifo, septisemi, diyare
<i>Citrobacter</i>	Yara ve üriner enfeksiyon (fırsatçı ve hastane enfeksiyonları)
<i>Klebsiella</i>	Üriner enfeksiyon, pnömoni, septisemi
<i>Enterobacter</i>	Yara enfeksiyonu, septisemi, üriner enfeksiyon (fırsatçı ve hastane enfeksiyonları)
<i>Serratia</i>	Yara enfeksiyonu, septisemi, üriner enfeksiyon (fırsatçı ve hastane enfeksiyonları)
<i>Proteus</i>	Yara enfeksiyonu, septisemi, üriner enfeksiyon
<i>Providencia</i>	Yara enfeksiyonu, septisemi, üriner enfeksiyon (fırsatçı ve hastane enfeksiyonları)
<i>Morganella</i>	Fırsatçı ve hastane enfeksiyonları
<i>Yersinia pestis</i>	Veba
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	Mesenterik adenit, diyare
<i>Y. enterocolitica</i>	Mesenterik adenit, diyare
<i>Erwinia</i>	Yara enfeksiyonu
<i>Pectobacterium</i>	Yara enfeksiyonu

2.1.11. Tedavi

Yeni antibiyotiklerin keşfine rağmen, enterobakteri enfeksiyonlarının yeterli tedavisi hala zordur. Bu enfeksiyonların tedavisini zorlaştıran çeşitli faktörlerden birisi, hastanın altta yatan hastalığının, tedaviyi güçleştirmesidir. Altta yatan hastalığı

ilgilendiren ölümler görülmektedir. Tedaviyi güçleştiren bir başka faktör, dirençli enterobakteri suşlarının varlığı ve oranının giderek artmakta oluşudur. Yeterli olmayan ve yanlış antibiyotik kullanımları, bakterilerde direnç oranını artırır ve direncin duyarlı organizmalara yayılımına neden olur. Ayrıca enterobakterilerde cinse ve türe özgü antibiyotik dirençleri de (intrinsik direnç) yaygındır (26).

2.1.12. *Escherichia coli*

E. coli, *Escherichia* cinsinin en önemli ve en sık görülen üyesidir. Bu mikroorganizma gastroenterit, idrar yolu enfeksiyonu, menenjit ve sepsis gibi birçok hastalıkla ilişkilidir. Ancak bazı serotiplerin (*E. coli* O157 en fazla hemorajik kolit yapan etkindir) virulansı daha fazladır (28).

E. coli Çizelge 2.6’da gösterildiği gibi çok sayıda virulans faktörüne sahiptir.

Çizelge 2.6. *E. coli*’nin Virulans Faktörleri

Bakteri	Adhezinler	Ekzotoksinler
ETEC	Kolonizasyon faktör antijenleri (CFA/I, CFA/II, CFA/III)	Isıya duyarlı toksin (LT-1); Isıya dayanıklı toksin (STa)
EPEC	“Bundle-forming pili” (Bfp) ; intimin	
EAEC	Aggregatif adherence fimbria (AAF/I, AAF/II, AAF/III)	Enteroaggregatif ısıya dayanıklı toksin (EAST); Plazmid tarafından kodlanan toksin (Pet)
EHEC	Bfp; intimin	Shiga toksin (Stx-1, Stx-2)
EIEC	İnvaziv plasmid antijen (Ipa)	Hemolizin (HlyA)
Üropatojenler	P pili; fimbri	

2.1.12.1. Epidemiyoloji

Gastrointestinal kanalda çok sayıda *E. coli* vardır. Her ne kadar bu bakteriler fırsatçı patojen olsalar da bağırsak perfore olup bakteri peritona geçtiği zaman çoğu *E. coli* gastrointestinal ve ekstraintestinal hastalık yapabilir. Bu özellikleri plazmid aracılı patojenite adacağı ya da bakteriyofaj DNA'sı kökenli özel virulans faktörü edinmelerine bağlıdır. *E. coli*'nin patojen olarak etkinliği şu faktörlerle açıklanabilir:

- ✓ Sepsiste en sık izole edilen Gram negatif bakteridir
- ✓ Toplum ve hastane kaynaklı idrar yolu enfeksiyonunun etkenidir
- ✓ Gelişmekte olan ülkelerde en önemli gastroenterit etkenidir.

Gastroenterit yapan *E. coli* suşları beş büyük gruba ayrılır: ilk üç grup ince bağırsağı tutup sekretuar diyare yaparken, son üç grup primer olarak kalın bağırsağı tutmaktadır (Çizelge 2.7).

Çizelge 2.7. *E. coli* ile Gelişen Gastroenteritler

Organizma	Etkilenen Organ	Hastalık	Patogenez
Enterotoksijenik <i>E. coli</i> (ETEC)	İnce bağırsak	Turist diyaresi; gelişmiş ülkelerde infant diyaresi, sulu diyare, kusma, kramplar, bulantı, ateş	Plazmid kontrolünde ısıya dayanıklı/dayanısız enterotoksinler sıvı-elektrolit aşırı salınımını artırır
Enteropatojenik <i>E. coli</i> (EPEC)	İnce bağırsak	Gelişmemiş ülkelerde infant diyaresi; sulu diyare ve kusma, dışkıda kan görülmez	Plazmid kontrolünde, normal mikrovillus yapısının bozulması ile gelişen A/E histopatolojisi malabsorbsiyon ve diyare ile sonuçlanır
Enteroagregatif <i>E. coli</i> (EAEC)	İnce bağırsak	Gelişmemiş ülkelerde infant diyaresi; sulu diyare, kusma, dehidratasyon, ateş	Plazmid kontrolünde, çomakların agregatif tutunması, mikrovilluslarda kılcalma, mononükleer infiltrasyon ve hemoraji, sıvı emiliminde azalma
Enterohemorajik <i>E. coli</i> (EHEC)	Kalın bağırsak	Sulu ishali takiben kanlıishal (hemorajik kolit) abdominal kramplar, ateş çok az ya da yok; HUS'a ilerleyebilir	Sitotoksik Shiga toksinleri (Stx-1, Stx-2) kontrolünde protein sentezinin bozulması; A/E lezyonları ile intestinal mikrovillus harabiyeti, emilimin azalması

Çizelge 2.7. (Devam) *E. coli* ile Gelişen Gastroenteritler

Organizma	Etkilenen Organ	Hastalık	Patogenez
Enteroinvazif <i>E. coli</i> (EIEC)	Kalın bağırsak	Gelişmekte olan ülkelerde görülür; ateş, kramplar, sulu diyare, dizanteriye dönüşebilir.	Plazmid kontrolünde bağırsak epitelyum hücrelerinin invazyon ve harabiyeti

2.1.12.2. Tedavi

Toplum kökenli üriner sistem enfeksiyonlarının %75-90'ında etken *E. coli*'dir. Tedavide en sık kullanılan antibiyotikler, trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMZ), siprofloksasin, beta-laktamlardır. Ancak üropatojen *E.coli* suşlarında giderek artan direnç oranları nedeniyle tedavi seçenekleri azalmaktadır. Amerika enfeksiyon Hastalıkları Derneği'nin üriner sistem enfeksiyonları tedavi rehberinde TMP-SMZ'nin ancak direnç prevalansının %10-20'den düşük olduğu yerlerde ampirik tedavide kullanılabilmesi belirtilmektedir. Üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan diğer bir ilaç grubu kinolonlardır. Ancak kinolonların yaygın kullanımının bakterilerdeki kinolon direnç oranlarını artırdığına ilişkin birçok çalışma mevcuttur. Üropatojen *E.coli* suşlarında kinolon ve TMP-SMZ direnç oranlarının her ikisinin de yüksek olduğu durumlarda tedavide kullanılacak uygun antibiyotiklerle ilgili çalışmalar devam etmektedir. Komplike olmayan alt üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde fosfomisin veya nitrofurantoin tedavisi ile iyi yanıt alındığı bildirilmektedir (29).

GSBL salgılayan *E.coli* suşlarının oranı toplum ve hastane kaynaklı izolatlarda giderek artış göstermektedir. Ampirik antibiyotik tedavilerinde sefalosporin ya da kinolonların bu bakterilere karşı güvenilirlikleri giderek azaltılmaktadır. Hastane kökenli ciddi ürosepsis olgularında, GSBL oranları yüksek tedavi merkezlerinde ampirik tedavi amacıyla bu ajanlar seçilebilir. Karbapenemlerin ampirik tedavide kullanımı mutlaka sınırlandırılmalı, gereksiz kullanımından kaçınılmalıdır. Bunların aşırı kullanımında GSBL salgılayan suşlarda karbapenem direncini beraberinde getirmektedir (30).

2.1.13. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella cinsi bakteriler, hareketsiz, sporsuz, genellikle kapsüllü, Gram negatif ve *Enterobacteriaceae* ailesinin genel özelliklerini gösteren çomakçıklardır (1). *Klebsiella* cinsinin üyeleri kolonilerinin mukoid görünümünden ve in-vivo olarak mikroorganizmanın artmış virulansından sorumlu olan belirgin bir kapsüle sahiptirler. Bu cinsin en sık izole edilen türleri toplum ve hastane kaynaklı lobar pnömoniye sebep olan *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca*'dır. *Klebsiella* türlerinden kaynaklanan pnömoniler sıklıkla alveolar boşlukların nekrotik yıkımına, kavite ve kanlı balgam oluşumuna neden olurlar (23).

K. pneumoniae, insan sağlığı açısından çok önemli olan nozokomiyal, üst solunum yolu, üriner sistem ve yara enfeksiyonlarının oluşmasında rol alan fırsatçı patojendir (1). *K. pneumoniae* insan kalın barsağında ve %5-10 oranında da üst solunum yollarının normal florasında bulunmaktadır. *Klebsiella* cinsi bakteriler bakteriyemilerin %2'sinde, pnömonilerin %12'sinde ve cerrahi yaraların %3'ünde etken olarak bulunmaktadır (31). Üst solunum yolu ve dışkı florasında bulunabilen *K. pneumoniae* bakterileri, buldukları yerde uygun koşulların oluşması veya yerlerini değiştirerek diğer organ ve sistemlere yerleşmeleri halinde birçok hastalıklara neden olurlar. *K. pneumoniae*, üriner sistem ve nozokomiyal enfeksiyonlara yaygın olarak neden olan bakteriler sıralamasında *E. coli* 'den sonra ikinci sıradadır. (32).

2.1.14. Tedavi

K. pneumoniae antibiyotiklere çok dirençli bir bakteridir. *Klebsiella*'larda aminoglikozidleri modifiye eden enzimler ve bunun sonucu gentamisin, tobramisin, hatta amikasin gibi aminoglikozidlere de yüksek oranda direnç, özellikle hastane suşlarında sıktır. Özellikle bunlar içinde beta-laktam grubu antibiyotikler ile karbapenemler ve kinolonlara direnç geliştirebilen *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında ciddi tedavi sorunları yaşanabilmektedir. Bu suşların beta-laktam grubu antibiyotikler ve kinolonlar dışında diğer antibiyotiklere karşıda artan oranda direnç geliştirebilmeleri

sorunun boyutunu daha da arttırmaktadır. Burada sorumlu tutulan direnç mekanizmaları arasında en önemlisi GSBL enzimleridir (33).

2.2. Beta Laktam antibiyotikler

Beta laktam ajanlar, kimyasal yapılarında ortak bir beta-laktam halkası taşıyan ve hücre duvar sentezini inhibe ederek antibakteriyel etki gösteren geniş bir antibiyotik grubudur. Beta laktam halkasına bağlı yan zincirler ve diğer halkalara göre penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler olmak üzere beş temel gruba ayrılırlar (Çizelge 2.8). Beta laktam antibiyotikler gerek toplum gerekse hastane kökenli enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibakteriyel ajanların başında gelmektedir (34). Tüm beta-laktam antibiyotikler bakterilerde hücre duvarı sentezinden sorumlu penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) transpeptidaz aktivitesini bloke ederek peptidoglikan sentezini engellemek suretiyle etki ederler. Bakterilerin hücre duvarında yer alan peptidoglikan (mürein) tabakası mikroorganizmanın yapısını ve bütünlüğünü sağlar. Peptidoglikan zincir N-asetil muramik asit (NAMA) ve N-asetil glikozamin (NAGA)'dan oluşmuştur. Bu yapılar tetrapeptid bağlarla kafes yapısını meydana getirirler. Bu çapraz bağlantı N-asetil muramik asitin yapısında yer alan D-alanin D-alanin moleküllerinin transpeptidasyon reaksiyonu ile birleşmeleri sonucu oluşur. Transpeptidaz reaksiyonu oluşturan enzimlere penisilin bağlayan proteinler "PBP" adı verilir (35). Beta-laktam antibiyotiklerin temel hedefi penisilin bağlayıcı proteinlerdir. Beta-laktam antibiyotiklerin yapısı ve uzaydaki konfigürasyonları D-alanin D-alanin molekülüne çok benzemektedir. Bu benzerlik beta-laktam antibiyotiklerin PBP ile reaksiyona girmelerini ve D-alanin D-alanin molekülünün yerini alarak transpeptidasyonu engellemelerini sağlar. Sonuçta hücre duvarı sentezi yapamayan bakteri lizise uğrar ve ölür. Beta-laktam antibiyotikler bakterisidal etkilidirler ve bu etkileri yavaştır. Öldürme hızları dozdan çok süreye bağlıdır. Yani, enfeksiyon bölgesinde yüksek konsantrasyondan çok uzun süreli beta-laktam antibiyotik varlığı bakteri ölümünde daha etkilidir. Yalnız üreme fazındaki bakterilere etkilidirler ve maksimum etkileri minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) dört katına çıktıklarında görülür (36).

Çizelge 2.8. Beta Laktam Grubu Antibiyotikler

Beta Laktam Grubu Antibiyotikler	Beta Laktam grubu antibiyotiklere örnek
Penisilinler	Penisilin G, penisilin V Penisilinaz dirençli penisilinler (metisilin, nafsilin, oksasilin, kloksasilin) Aminopenisilinler (ampisilin, amoksisilin) Karboksipenisilinler (karbenisilin, tikarsilin) Üreidopenisilinler (mezlosilin, piperasilin)
Sefalosporinler	1.kuşak (sefazolin, sefalotin, sefaleksim) 2.kuşak (sefuroksim, sefaklor, sefamandol, sefamisinler) 3.kuşak (sefotaksim, seftriakson, sefpodoksım, seftizoksım, sefooperazon, seftazidim) 4.kuşak (sefepim, sefpirom)
Karbapenemler	İmipenem, meropenem, ertapenem
Monobaktamlar	Aztroneam

2.2.1. Penisilinler

1940'lı yıllarda saflaştırılmış olarak klinik kullanıma girmiştir. Tüm penisilinlerin temel yapısını 6-aminopenisilanik asit (6-APA) oluşturur. Bu çekirdek bir beta-laktam halkası ve buna bağlı beşli tiazolin halkasından oluşur. Bu temel yapıya değişik yan zincirlerin eklenmesiyle antibakteriyel etki alanları ve farmakolojik özellikleri farklı birçok penisilin türevi elde edilir (35). Penisilinler beş grupta incelenirler.

2.2.1.1 Doğal penisilinler

Klasik doğal penisilinler penisilin G ve penisilin V'dir (fenoksimetilpenisilin). Penisilin G mide asidinde inaktive olduğundan sadece parenteral yolla kullanılır. Klinik kullanıma uygun üç formu vardır. Kristalize penisilin G hızlı etki ve yüksek serum düzeyi gerektiren durumlarda (menenjit ve endokardit gibi) sadece intravenöz (IV) yoldan uygulanır. Kısa yarılanma ömrüne sahiptir ve bu nedenle sık aralıklarla (4-6 saat aralıklarla) kullanılır. Prokain penisilin G, yüksek kan düzeyi gerektirmeyen buna karşın uzun etki süresi istenen (penisiline duyarlı pnömokok pnömonisi gibi)

durumlarda tercih edilir ve yalnız intramusküler yolla uygulanır. Depo penisilin olarak bilinen benzatin penisilin ise 3-4 haftalık aralıklarla intramusküler (IM) olarak uygulanır. Klasik kullanım alanları arasında sifiliz tedavisi ve akut romatizmal ateş profilaksisi sayılabilir.

Penisilin V (fenoksimetilpenisilin) oral yolla kullanılabilen tek doğal penisilindir. Yüksek serum düzeylerine ulaşamadığından ciddi sistemik enfeksiyonlarda kullanılması önerilmez. Hafif ve orta şiddetteki üst solunum yolu ve yumuşak doku enfeksiyonlarında tercih edilir. Doğal penisilinler başlıca Gram pozitif bakterilere etkilidir. A grubu beta-hemolitik streptokoklarda henüz dünyada penisilin direnci bildirilmemiştir. Diğer streptokoklara da çok etkindir. Ancak, pnömokoklarda penisilin direnci giderek artmaktadır. Orta düzey (MİK: 0.1-1 mg/L) ve yüksek düzey (MİK: 1 mg/L'nin üzeri) olmak üzere iki şekilde görülen pnömokoklardaki penisilin direnci dünyanın değişik ülkelerinde farklılıklar gösterir. Ülkemizdeki orta düzey direnç ortalama %20-25, yüksek düzey direnç ise %1 civarındadır. Orta düzey penisilin direnci, penisilin dozunun artırılmasıyla yenilebilir (menenjitler hariç). Buna karşılık yüksek düzey penisilin direnci varlığında penisilin kullanımı söz konusu olamaz. Stafilokokların ise %90'ından fazlası salgıladıkları penisilinaz enzimi ile penisilinleri inaktive eder. Bu nedenle stafilokoksik olduğu tahmin edilen bir enfeksiyonun ampirik tedavisinde penisilin asla tercih edilmez. Penisilinlerin Gram negatif enterik bakterilere de etkisi yoktur. Yalnız meningokok ve gonokoklara, ayrıca *Bacillus anthracis*, *Clostridium* türleri ve spiroketlere karşı etkindir (36).

2.2.1.2. Aminopenisilinler

Penisilin etki spektrumuna ilaveten *E. coli*, *P. mirabilis*, *Salmonella* ve *Shigella* türleri gibi bazı Gram negatif bakteriler de etki alanına girer. Ayrıca enterokoklara penisiline göre daha etkilidirler. *Listeria monocytogenes*'e etkinliği oldukça iyidir. Beta-laktamaz üreten tüm bakterilere ve *P. aeruginosa*'ya etkisizdirler. Bu grupta ampisilin, amoksisilin bulunmaktadır. Ampisilin hem oral hem parenteral kullanılabilir (35).

2.2.1.3. Karboksipenisilinler

Bu grupta tikarsilin ve karbenisilin bulunmaktadır. Aminopenisilinlerin etki alanına ilave olarak *P. aeruginosa*, *Serratia* ve *Enterobacter* türlerine de etkindir. Tikarsilin ülkemizde yoktur. Karbenisilinün günümüzde oldukça yüksek direnç oranları ve yine yüksek oranlarda tuz içermesi nedeniyle kullanımı yoktur. Sadece karbenisilin indanil sodyum tuzu (karindasilin) yüksek idrar konsantrasyonları nedeniyle üriner sistem enfeksiyonlarında kullanılmaktadır (36).

2.2.1.4. Üreidopenisilinler

Antipsödomonal penisilinler veya geniş spektrumlu penisilinler olarak da bilinirler. Bu grupta bulunan antibiyotikler; azlosilin, piperasilin ve mezlosilin olup, bunlar ampisilinün semisentetik türevleridir. Hepsisi monosodyum tuzu şeklinde kullanılır. Ancak, karboksipenisilinlere oranla içerdikleri tuz miktarı çok daha azdır. Primer etkinlikleri Gram negatif bakteriler ve *P. aeruginosa*'dır. Kullanım alanları Gram negatif bakterilerle oluşan orta ve ciddi şiddetteki enfeksiyonlar ve *P. aeruginosa* enfeksiyonlarıdır (37).

2.2.1.5. Penisilinaza Dirençli Penisilinler (Antistafilokoksik Penisilinler)

Stafilokokların hemen tamamının salgıladığı penisilinaz enzimine dayanıklı olan tek penisilin grubudur. Ayrıca streptokoklara da etkisi vardır. Ama bu etki penisilinden daha iyi değildir. Hemen sadece stafilokok enfeksiyonlarında kullanılır. Bu nedenle antistafilokoksik penisilinler olarak da bilinirler. Ancak, metisiline dirençli stafilokoklara karşı tüm beta-laktamlar gibi bunların da etkisi yoktur. Bu grupta bulunan nafsilin, metisilin, oksasilin, kloksasilin, dikloksasilin ve flukloksasilinden sadece nafsilin ülkemizde bulunur ve parenteral kullanılır. Metisiline duyarlı stafilokok enfeksiyonlarında ilk seçilecek ilaçtır (37).

2.2.2. Sefalosporinler

Sefalosporinler, birçok yönden penisilinlere çok benzeyen ve çok sayıda ilacı içeren bir gruptur. 1945 yılında *Cephalosporium acremonium*' dan elde edilen sefalosporin C, bu grubun ilk örneği olarak bilinir. Kimyasal yapısı bir beta-laktam halkası ve buna bağlı altılı dihidrotiazin halkasından oluşur. Bu temel çekirdek 7-amino-sefalosporinik asittir (7-APA). Bu çekirdekte yapılan modifikasyonlarla çok sayıda sefalosporin türevi üretilmiştir. Sefalosporinler etki spektrumları başta olmak üzere bazı temel özellikleri göz önüne alınarak dört kuşağa ayrılırlar (36).

2.2.2.1. Birinci Kuşak Sefalosporinler

Ülkemizde bu gruptan sefalotin, sefazolin gibi parenteral, sefaleksim, sefadroksil gibi oral ve sefradin gibi hem parenteral, hem de oral kullanılabilen bileşikler bulunmaktadır. Gram pozitif bakterilere en etkili sefalosporin grubudur. Streptokoklara, metisiline duyarlı *S. aureus* ve *S. epidermidis*'e çok etkilidir. Hatta bu nedenle antistafilokoksik sefalosporinler olarak da bilinirler. Ayrıca, enterokoklar tüm sefalosporinlere karşı dirençlidirler. Gram negatif etkinlikleri *E. coli*, *Proteus mirabilis* ve *K. pneumoniae* gibi bakterilerle kısıtlıdır. Bu özellikler göz önüne alındığında, yumuşak doku enfeksiyonları gibi stafilokoksik enfeksiyonlarda ilk seçilecek ilaçlar arasındadır. Ayrıca, idrar yolu enfeksiyonları ve safra yolu enfeksiyonlarında da kullanılabilirler. Duyarlı bakterilerin neden olduğu solunum yolu enfeksiyonları kullanılacakları diğer bir endikasyondur. Ancak, *H. influenzae*'ye etkilerinin iyi olmadığı dikkate alınmalıdır. Sefazolin, cerrahi profilaksinin seçkin ilacıdır.

2.2.2.2. İkinci Kuşak Sefalosporinler

Sefaklor, sefuroksim, sefuroksim aksetil, sefprozil bu gruptandır. Ayrıca, aslında bir sefamisin olan sefoksitin ve bir karbasefemolan lorakarbef de 2. kuşak sefalosporinler arasında sayılır. İkinci kuşak sefalosporinler birinci kuşaklara yakın

veya eşit bir Gram pozitif etkinliğe sahiptir. Bunun yanında Gram negatif etkinlikleri biraz daha fazladır. En önemli özellikleri *H. influenzae*, *S. pneumoniae* ve *M. catarrhalis* gibi solunum yolu patojenlerine olan çok iyi etkinlikleridir. Ancak, sefaklorun *H. influenzae*'ye etkinliği diğerlerinden daha azdır. Sefoksitin ise diğer tüm sefalosporinlerden farklı olarak oldukça iyi bir anti-anaerob etkinliğe sahiptir. Ama akut otitis media ve akut sinüzit gibi üst solunum yolu enfeksiyonları, pnömoni gibi alt solunum yolu enfeksiyonlarında *H. influenzae*, *S. pneumoniae* ve *M. catarrhalis*'e mükemmel etkinlikleri nedeniyle ilk seçenek ilaçlar arasında yer alır. Ayrıca, komplike olmayan üriner sistem enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında da oldukça iyi etkinlik gösterir. Sefoksitin anti-anaerob etkinliği nedeniyle intraabdominal enfeksiyonlar gibi anaerobik patojenlerin söz konusu olduğu enfeksiyonlarda kullanılır (37).

2.2.2.3. Üçüncü Kuşak Sefalosporinler

Sefoperazon, sefotaksim, seftriakson, seftizoksim, seftazidim ve sefodizim yalnız parenteral kullanılan ve ülkemizde bulunan 3. kuşak sefalosporinlerdir. Sefiksim oral kullanılabilen tek 3. kuşak sefalosporindir. Bu grup sefalosporinlerin en etkili olduğu bakteriler Gram negatif çomaklardır. Ancak, *Enterobacter*, *Citrobacter* ve *Serratia* türlerine etkinlikleri sınırdadır ve bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde etkinliklerine güvenilmemelidir. Ayrıca, *P. aeruginosa*'ya sadece seftazidim etkili olup diğerlerinin etkinlikleri yoktur. Gram pozitif bakterilere karşı etkinlikleri 1. kuşaklara oranla oldukça azdır. Sefotaksim Gram pozitif etkinliği en iyi olan 3. kuşak sefalosporindir. En az etkili olan ise seftazidimdir. Hiçbirinin iyi bir anti-anaerob etkinliği yoktur. 3. kuşak sefalosporinler Gram negatif sepsis gibi ciddi enfeksiyonlarda, Gram negatif bakterilerle oluşan hastane kökenli enfeksiyonlarda (nozokomiyal pnömoni, nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonu gibi) genellikle aminoglikozidlerle kombine olarak, beyin-omurilik sıvısına iyi geçtiklerinden ve başlıca menenjit etkenlerinin tümüne etkili olduklarından akut bakteriyel menenjitlerde (Gram negatif basil menenjitleri dahil) kullanılır. *P. aeruginosa* kuşkulu enfeksiyonlarda

seftazidim tercih edilmelidir. Intraabdominal ve pelvis enfeksiyonlarında kullanıldığında mutlaka bir anti-anaerob ilaçla kombine edilmelidirler (38).

2.2.2.4. Dördüncü Kuşak Sefalosporinler

Bu grupta sefepim ve sefpirom bulunmaktadır. Ülkemizde sadece sefepim klinik kullanımdadır. Sefepimin Gram negatif bakterilere etkinliği mükemmeldir. Üçüncü kuşaklardan farklı olarak *Enterobacter* türlerine etkinliği de çok iyidir. *P. aeruginosa*'ya etkinliği en az seftazidim kadardır. Üçüncü kuşaklardan bir diğer farklı yönleri Gram pozitif bakterilere onlardan daha etkili olmalarıdır. Yani daha geniş ve dengeli bir etki alanına sahiptir. Ancak, anti-anaerob etkinliği iyi değildir. Ayrıca, tüm sefalosporinlerde olduğu gibi metisiline dirençli stafilokoklara ve enterokoklara etkinliği yoktur. Sadece parenteral kullanılır (39).

2.2.3. Monobaktamlar

Bu grup antibiyotikler içinde klinik kullanımda olan tek örnek aztreonamdır. Yapısında beta-laktam halkasına ekli başka bir halka bulunmaması ile diğer beta-laktamlardan ayrılır. Aztreonam, özellikle Gram negatif bakterilerin PBP-3'üne yüksek afinite gösterir. Bu nedenle çok güçlü Gram negatif etkinliğe sahiptir. Ayrıca *P. aeruginosa*'ya da iyi etkilidir. Ancak, Gram pozitif bakteriler ve anaerob bakterilere karşı etkinliği hiç yoktur. Geniş spektrumlu olmayan bir antibiyotiktir. Duyarlı Gram negatif bakterilerin neden olduğu bakteremi/sepsis, nozokomiyal pnömoni, nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonları, osteomyelit, septik artritler başlıca klinik kullanım alanlarını oluşturur. Kistik fibrozisli hastalarda *P. aeruginosa*'ya bağlı pnömonilerde mutlaka bir aminoglikozidle kombine olarak kullanılır. Avantajı, aminoglikozidler gibi toksik olmayışıdır. Bir diğer önemli avantajı da penisilinlere allerjisi olan hastalarda da kullanılabilmesidir (33).

2.2.4. Karbapenemler

Günümüzde mevcut antibiyotikler içinde en geniş etki alanına sahip olan gruptur. Karbapenemler tüm beta-laktamlar gibi bir beta-laktam halkası içerir ve beta-laktamaz enzimlerine son derece dayanıklıdır. Bu grupta klinik kullanımda olan iki ilaç imipenem ve daha sonra kullanıma giren meropenemdir. Etki alanları arasında belirgin bir fark yoktur. Meropenemin Gram negatif, imipenemin Gram pozitif etkinliği biraz daha fazladır. Anaeroblara etkinlikleri arasında pek fark yoktur. Her ikisi de Gram negatif enterik bakteriler, non-fermantatif bakterilerden *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* türlerine çok etkindirler. *H. influenzae*, *Neisseria* türlerine de çok etkilidirler. Yalnız, *Burkholderia cepacia*, *E. faecium*, metisiline dirençli *S. aureus* ve *Stenotrophomonas maltophilia* ya etkin değildirler. Gram pozitif bakterilerden streptokoklara, pnömokoklara, stafilokoklara (metisiline duyarlı olanlar) çok iyi etkinlik gösterirler. *Clostridium difficile* dışında hemen tüm anaeroblara karşı çok iyi etkinlikleri vardır. Karbapenem grubu antibiyotikler son derece geniş spektrumlu oldukları için rezerv olarak saklanmalı ve daima son seçenek olarak kullanılmalıdır. Bu geniş spektrum onların genellikle bazı istisnalar dışında tek ilaç olarak kullanılmalarına olanak sağlar. Bu nedenle daha çok kaynağı bilinmeyen sepsis gibi ciddi enfeksiyonların ampirik başlangıç tedavisinde, birden çok bakteri ile oluşan miks enfeksiyonlarda, ciddi *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında, çoğul dirençli Gram negatif bakterilerin neden olduğu hastanede gelişen pnömoni, Gram negatif bakteremi/sepsis, komplike üriner sistem enfeksiyonları, pelvik ve intra-abdominal enfeksiyonlar, tedaviye yanıtız Gram negatif bakteri osteomyelitlerinde ve febril nötropenik hastaların ampirik başlangıç tedavilerinde kullanılırlar (36).

2.3. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç

Bakterilerin antibiyotiklere direnci doğal ve kazanılmış olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Örneğin Gram negatif bakteriler hücre yapılarından dolayı vankomisine doğal dirençlidirler. Benzer şekilde zorunlu anaeroblar aminoglikozidlere, mikoplazma beta-laktam antibiyotiklere genetik olarak dirençlidir (40).

Beta laktam grubu antibiyotiklere direnç üç genel mekanizma ile gelişmektedir:

1- İlacın hedefine etkin konsantrasyonda ulaşmasının engellenmesi

2- Hedef PBP moleküllerinin değişmesi

3- İlacı inaktive eden beta- laktamazların üretimi

1. ve 3. durum Gram negatif bakterilerde, 2. durum ise Gram pozitif bakterilerde daha sık görülmektedir (35).

2.3.1. İlacın Hedefine Etkin Konsantrasyonda Ulaşmasının Engellenmesi

Bu durum ilacın hücre içine alınmasındaki azalmadan veya hedefine ulaşmadan dışarı atılmasını sağlayan aktif pompa sistemlerinden kaynaklanabilir. Hücre membranının geçirgenliğinin azalması Gram negatif bakteriler için önem taşır. Gram negatif bakterilerde beta-laktam molekülleri dış membran proteini (Outer membrane protein – OMP) adı verilen porin proteinlerinden oluşan porlar yoluyla geçer. Bu nedenlere bağlı olarak antibiyotik reseptörlere ulaşamamakta ve etkisini gösterememektedir. *E.coli*'de OMP F ve OMC mutasyonları dirençten sorumludur (36).

2.3.2. Hedef PBP Moleküllerinin Değişmesi

Hedef PBP'lerin yapısındaki değişim sonucunda antibiyotiğin bağlanamaması beta laktam antibiyotiklere dirençte önemli bir diğer mekanizmadır. Bu direnç kromozomal mutasyonlar sonucunda ortaya çıkar. PBP değişimine bağlı direnç, Gram pozitif bakterilerde daha fazla görülmektedir ve günümüzde özellikle *S. pneumoniae*, *S. aureus* ve *E. faecium* gibi türlerin beta laktam ajanlarla tedavisinde sorun oluşturmaktadır. PBP'lerle oluşan dirence örnek, stafilokoklarda metisiline dirençtir. İntrinsek olarak metisiline dirençli stafilokoklar (MRSA), aynı zamanda diğer beta laktam antibiyotiklere de düşük affinite gösteren, farklı bir PBP yapmaktadırlar. Mec A geni beta laktamlara çok düşük oranda bağlanan veya hiç bağlanmayan PBP 2a'nın yapımına yol açmaktadır (42).

2.3.3. İlacı İnaktive Eden Beta- laktamazların Üretimi

Beta laktamazlar, beta laktam halkasındaki siklik amid bağıını parçalayan, böylelikle beta-laktam ajanların etkinliğini ortadan kaldıran enzimlerdir. Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbepenemler, beta laktamaz ailesindeki enzimlerden biri veya birkaçı tarafından inaktive edilebilirler. Beta laktamazlar Gram pozitif bakterilerde hücre dışı enzimler olup hücre dışında faaliyet gösteriler. Gram negatif bakterilerde de periplazmik boşluk içinde yer alırlar. Beta laktamazlar, hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerce üretilmelerine karşın, beta laktamaz yapımı başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere Gram negatif bakterilerin beta laktam direncindeki en önemli mekanizmadır (34).

Günümüzde substrat profili, moleküler yapı, inhibitörlere duyarlılık, hidrolitik etkinlik gibi özellikler açısından farklı 350'ye yakın beta-laktamaz tanımlanmıştır. Özellikle Gram negatif çomaklarca üretilen grup I sefalosporinazlar, grup 2be genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar ve grup 3 metallo-beta laktamazların tüm dünyada yaygın olarak bulunduğu ve klinik tedavi sorunlarına yol açtığı izlenmektedir. A, B, C grubu beta laktamazların aktif merkezinde serin enzimi varken, D grubunda çinko bulunmaktadır (42).

2.4. Beta-Laktam/Beta-Laktamaz İnhibitör Kombinasyonları

Bugün klinik kullanımda olan üç tane beta-laktamaz inhibitörü vardır. Bunlar klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam'dır (36). Sulbaktam ve tazobaktam penisilanik asit sulfon yapısındadır. Daha önce de belirtildiği gibi tüm inhibitörler, tüm beta-laktamaz enzimlerine karşı etkili değildir. Özellikle de Gram negatif bakterilerin kromozomal kaynaklı enzimlerine karşı bu söz konusudur. Klavulanik asit, Stafilkokların plazmid kökenli beta-laktamazlarına, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *M. catarrhalis*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* gibi Gram negatif bakterilerin plazmid kaynaklı beta-laktamazlarına ve *Bacteroides fragilis* başta olmak üzere hemen tüm anaerob bakterilerin enzimlerine karşı etkilidir. Buna karşılık *P.*

aeruginosa, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* ve *Morganella* cinsleri gibi indüklenebilir beta-laktamaz üreten bakterilere karşı etkili değildir. Sulbaktamın etki alanı da klavulanik asit gibidir. Tazobaktam ise diğerlerine ek olarak *Morganella morgani* ve *C. freundii* gibi bakterilere de bir miktar etkilidir. Ayrıca, özellikle *B. fragilis* başta olmak üzere anaerob bakterilerin beta-laktamazlarına en etkili olan inhibitördür. Genel olarak en etkili inhibitör tazobaktamdır. Bunu klavulanik asit ve sulbaktam izler. Ancak, klavulanik asitin beta laktamaz indüksiyonu yapması gibi bir dezavantajı vardır. Diğer ikisi beta-laktamaz indüksiyonuna neden olmazlar (43).

Günümüzde klinik kullanımda olan beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları şunlardır:

- a) ampisilin/sulbaktam
- b) amoksisilin/klavulanik asit
- c) sefoperazon/sulbaktam
- d) tikarsilin/klavulanik asit
- e) piperasilin/tazobaktam (36)

Ampisilin/sulbaktam ve amoksisilin/klavulanik asit daha çok toplumda kazanılmış enfeksiyonların tedavisinde oral veya parenteral yoldan kullanılır. Özellikle *H. influenzae*, *M. catarrhalis* ve *S. aureus* beta-laktamazlarına karşı etkili olmaları nedeniyle akut sinüzit ve akut otitis media gibi üst solunum yolu enfeksiyonları ile pnömoni ve kronik obstrüktif akciğer hastalığının akut alevlenmeleri gibi alt solunum yolu enfeksiyonlarında çok etkilidirler. Ayrıca, stafilokokkal (metisiline duyarlı) yumuşak doku ve deri enfeksiyonları, diyabetik ayak enfeksiyonları, toplum kökenli üriner sistem enfeksiyonlarında enfeksiyonun özelliğine göre oral veya parenteral yoldan kullanılabilirler. Tikarsilin/klavulanik asit, sefoperazon/sulbaktam ve piperasilin/tazobaktam ise ilk iki kombinasyona oranla daha geniş etki alanlı olduklarından hastanede gelişen enfeksiyonlarda kullanılmalıdır (44).

2.5. Beta Laktamaz Yapısı ve Sınıflandırılması

Beta-laktamazlar kromozomal ya da plazmid kontrolünde sentezlenirler. Plazmidler kromozom dışı genetik elemanlar olup direncin yayılmasında çok önemlidirler. Gram negatif bakterilerde direnç genleri plazmidler aracılığı ile konjugasyonla yayılmaktadır (45). Gram pozitif bakterilerde beta-laktamazlar ekzoenzim olarak hücre dışına salgılanırken, Gram negatif bakterilerde enzim periplazmik boşlukta bulunur. Bu nedenle Gram negatif bakterilerde az miktarda enzim bile antibiyotiklerin etkisiz hale getirilmesi için yeterli olmaktadır (46). Bugüne dek bilinen 600 üzerinde farklı beta-laktamaz enzimi bulunmaktadır. Bu enzimlerin bazı özellikleri göz önüne alınarak çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır. Ambler, beta-laktamazları aminoasit ve nükleotid dizilerine göre moleküler olarak, Bush ise biyokimyasal (substrat profili) özelliklerine göre genotipik olarak sınıflandırmışlardır (42). Çizelge 2.9'da en çok kullanılan Bush-Jacoby-Medeiros sınıflaması görülmektedir. Bu sınıflamaya göre Grup 1 (Ambler C) beta-laktamazlar baskılayıcılarına dirençlidir ve kromozomal genler tarafından kodlanır. *Salmonella* dışındaki tüm Gram negatif bakterilerde bulunurlar. Bu enzimlerin sentezi bakteri beta-laktam antibiyotikle karşılaştırıldığında çok arttığından "indüklenebilen beta laktamazlar" olarak da adlandırılırlar. *E. coli* suşlarında giderek artan oranlarda bildirilmektedir. Sefalosporinlerden sefepim grup 1 enzimlere diğer sefalosporinlerden biraz daha dayanıklıdır. Tedavide sefepim ya da karbapenem kullanımı önerilmektedir (39). Grup 2 (Ambler A) beta-laktamazlar ise plazmid tarafından taşınan genler tarafından kodlanmaktadır. Grup 2a, klavulanik asit ile baskılanan penisilinazları içerir ve penisilinleri sefalosporinlere göre daha hızlı hidrolize etmektedirler. *Stafilokoklar*, *Bacillus cereus*, *Citrobacter*, *Eikenella* ve *Fusobacterium* enzimleri bu grupta yer almaktadır (47). Grup 2b'de "Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar" (GSBL) yer almaktadır. Bu enzimler sefalosporinlere ve aztreonama direnci oluşturan ve genetik şifresi plazmidler üzerinde taşınan enzimlerdir. GSBL pozitif bakteriler bu özelliklerini kolayca diğer bakterilere de naklederler. Bu enzimleri taşıyan bakteri türleri tüm dünyada giderek artmaktadır (48). Çoğunlukla bu enzimler TEM ve SHV'den köken almaktadır. Ülkemizde ilk kez 1992'de saptanmış olmakla birlikte son yıllarda başta *K. pneumoniae* olmak üzere birçok Gram-negatif bakteride bulunduğu bildirilmektedir (49). GSBL enfeksiyonlarında karbapenem kullanımı önerilmektedir. Grup 3 (Ambler B) beta-laktamazlar karbapenemleri inaktive eden metallo beta-laktamazlardır.

Aktiviteleri için çinko iyonlarına gereksinimleri olup, baskılayıcılarından etkilenmezler. Bu grup enzimler *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacteroides fragilis* ve *P.aeruginosa*'da bulunmaktadır (47). Grup 4 beta-laktamazlar ise klavulanat ile baskılanmayan penisilinazları içermektedir. Diğer gruplara girmeyen ve henüz yapı analizleri yapılmamış enzimlerdir (48).

Son yıllarda beta laktam antibiyotiklere karşı, bakterilerde büyük direnç artışı olduğu gözlenmektedir. Bugün *Staphylococcus aureus*, *Haemophilis influenzae*, *Enterobacteriaceae* ve *Bacteroides*'lerde bazı beta laktam antibiyotiklere belirli derecelerde direnç gelişimi olduğu gözlenmektedir. *Klebsiella*'ların tüm suşları, kromozomal yolla taşınabilen beta laktamazları üretmektedirler. *Neisseria gonorrhoeae*'nin penisilinaz üreten suşları hemen hemen sadece Uzakdoğu ve Batı Afrika ile sınırlı iken, son yıllarda ABD dahil tüm ülkelerde saptanır olmuştur (50).

Çizelge 2.9. Beta Laktamazların Fonksiyonel ve Moleküler Sınıflandırması

Fonksiyonel Sınıf	Moleküler Sınıf	Substrat	Klavulonik asit tarafından inhibisyon	Enzimler
1	C	Sefalosporinler	Yok	Gram negatif bakterilerin AmpC enzimleri
2a	A	Penisilinler	Var	Gram pozitif bakterilerin penisilinazları
2b	A	Penisilinler, sefalosporinler	Var	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penisilinler, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler, monobaktamlar	Var	GSBL'ler
2br	A	Penisilinler	±	İnhibitörlere dirençli TEM β-laktamazları (IRT)
2c	A	Penisilinler, karbapenisilin	Var	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penisilinler, kloksasilin	±	OXA-1, OXA-11, PSE-2

Çizelge 2.9. (Devam) Beta Laktamazların Fonksiyonel ve Moleküler Sınıflandırması

Fonksiyonel Sınıf	Moleküler Sınıf	Substrat	Klavulonik asit tarafından inhibisyon	Enzimler
2e	A	Sefalosporinler	Var	<i>P. vulgaris</i> 'in indüklenebilir sefalosporinazları
2f	A	Penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler	Var	<i>E. cloacae</i> 'nin NMC-A'sı
3	B	Karbapenemler dahil birçok β -laktam	Yok	<i>S. maltophilia</i> 'nın L1'i, <i>B. fragilis</i> 'in CerA'sı
4	A	Penisilinler	Yok	<i>Burkholderia cepacia</i> penisilinazı

2.5.1 Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar

Beta laktam antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hale getiren beta laktamaz enzimi üretimi, başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından birisidir. Bugüne kadar 350'ye yakın beta laktamaz enzimi tanımlanmıştır. Bunların yaklaşık 150 tanesi genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) olup plazmidik özellikleri nedeniyle bakteriler arasında transfer edilebilirler. GSBL'ler, Gram negatif çomaklarda bulunan, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama karşı dirençten sorumlu olan enzimlerdir. Özellikle *Klebsiella* türleri ve *Escherichia coli* başta olmak üzere, GSBL üretimi ve patojen bakteriler arasında hızla yayılması son yıllarda ciddi sorunlar oluşturmaktadır. GSBL üreten kökenlerle enfeksiyon riski; uzun süre hastanede yatış, yoğun bakım ünitesinde bulunma, idrar, venöz vb. kateter uygulamaları gibi çeşitli girişimler ve geniş spektrumlu beta laktam antibiyotik kullanımı gibi bazı faktörlerle artmaktadır. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak sıklıkları artmakta ve genellikle çoklu ilaç direncine sahip olduklarından tedavide güçlüklerle karşılaşmaktadır (51).

2.5.2. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazların Tarihçesi

İlk beta laktamaz, penisilinin tıbbi tedavide yaygın kullanımının başlamasıyla birlikte bir *E. coli*'de tanımlanmıştır. Gram negatiflerde ilk plazmid ile ilişkili beta laktamaz olan TEM-1 ise 1960'lı yılların başında gösterilmiştir. Orijinal TEM-1 enzimi Yunanistan'da "Temoniera" adındaki bir hastanın kan kültüründen üreyen bir *E. coli* suşunda bulunmuş ve buna ithafen "TEM" adı ile anılmıştır. İlk izolasyondan birkaç yıl sonra TEM-1 beta laktamaz enzimi tüm dünyaya yayılmıştır. TEM ile ilişkili GSBL enzimleri ilk olarak 1984 yılında Fransa'da, sonra da 1988 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde görülmeye başlandı (52). Bu enzim günümüzde *Enterobacteriaceae* ailesinin pek çok üyesinde, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* ve *N. gonorrhoeae* gibi birçok farklı türde bulunmaktadır. *K. pneumoniae* ve *E. coli*'de bulunan bir diğer plazmid ilişkili beta laktamaz ise SHV-1'dir ve sülfidril grubu değişken olduğu için bu şekilde isimlendirilmiştir. SHV-1 beta laktamazı, *K. pneumoniae* izolatlarının çoğunda kromozomda kodlanmış iken, *E. coli*'de genellikle plazmid ile ilişkili olarak bulunmaktadır. Son 20 yıl boyunca, özellikle beta laktamazların hidrolitik aktivitesine dirençli olması için tasarlanmış pek çok antibiyotik geliştirilmiştir. Bununla birlikte, hasta tedavisinde kullanıma giren her yeni sınıf ilaç, kendisine dirençli yeni beta laktamazların ortaya çıkmasına yol açmıştır. Yeni beta laktamları hidrolize etme yeteneğindeki bu enzimlerin ilki, Almanya'da bir *K. ozaenae* suşunda bulunan SHV-2 enzimidir. Özellikle oksimino-sefalosporinlere karşı aktivitelerindeki genişlemiş etki nedeniyle bu enzimler "genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar" olarak isimlendirilmişlerdir. Bugün 150'nin üzerinde farklı GSBL tanımlanmıştır (4).

2.5.2.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Tipleri

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

almaktadır. Bugün yaklaşık 90'ın üzerinde TEM-tipi beta laktamaz ve 25'in üzerinde SHV tipi beta laktamaz enzimi bulunmaktadır (53). TEM ve SHV tipi GSBL'ler çoğunlukla *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de bulunmakla birlikte, *Proteus spp.*, *Providencia spp.* ve *Enterobacteriaceae*'nin diğer türlerinde de gösterilmiştir (54).

2.5.2.1.1. TEM

TEM-1 Gram negatif bakterilerde en sık karşılaşılan beta laktamazdır. GSBL gelişiminde enzimin aktif bölgesinde bulunan bir aminoasidin konfigürasyon değişikliği sorumludur. Bu değişiklik enzimin oksimino-beta laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişimine neden olur. Enzimin 104, 164, 238 ve 240 ıncı pozisyonunda bulunan tek aminoasidin GSBL fenotipini belirleyicilik özelliğinin daha fazla olduğu tahmin edilmektedir. Bununla birlikte enzimin geniş spektrumlu antibiyotik etkinliği için birden fazla aminoasit konfigürasyon değişikliği gerekmektedir. Farklı kombinasyon ve değişiklikler göz önünde bulundurulduğunda günümüzde sayıları her geçen gün artış gösteren TEM enzim türleriyle karşılaşılmaktadır. Bunların çok azı dışında genel olarak beta laktam/beta laktamaz enzim inhibitörlerine değişen oranlarda duyarlılık gösterdiği bilinmektedir. TEM-10, TEM-12 ve TEM-26 ABD'de bilinen en yaygın GSBL türleri arasındadır (52).

E. coli'deki ampisilin direncinin %90'ından fazlası TEM-1 üretimine bağlıdır. Bu enzim aynı zamanda *H. influenzae* ve *N. gonorrhoeae*'de gittikçe artan miktarlarda görülen ampisilin ve penisilin direncinden de sorumludur. TEM-1 enzimi, penisilin ve sefalotin ile sefaloridin gibi erken kuşak sefalosporinleri hidrolize edebilmektedir. TEM-1'den ilk üreyen enzim olan TEM-2, orijinal beta laktamazdan tek bir aminoasit yerleşimindeki farklılık ile ayrılır. Bu değişiklik izoelektrik noktanın 5.4'ten 5.6'ya kaymasına yol açar fakat substrat profilinde bir değişim söz konusu değildir. İlk olarak 1989'da bildirilen TEM-3 enzimi, GSBL fenotipi gösteren ilk TEM tipi beta laktamaz'dır. O zamandan bugüne kadar 90 dolayında TEM türeği tanımlanmıştır. Bu beta laktamazlardan bazıları "inhibitöre dirençli" enzimlerdir. Ancak çoğunluğu GSBL karakterindedir. TEM tipi beta laktamazlar sıklıkla *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de

bulunmakla birlikte diğer Gram negatif bakteri türlerinde de artan sıklıkla rastlanılmaktadır. TEM tipi GSBL'ler, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri*, *Acinetobacter baumannii* ve *Salmonella spp.* gibi diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde de görülebilmektedir. Ayrıca *Enterobacteriaceae* ailesinden olmayan diğer Gram negatifler de TEM tipi beta laktamazlar gösterilmiştir. Bunlardan TEM-42 *P. aeruginosa*'da bulunmuştur (55).

2.5.2.1.2. SHV

SHV-1 beta laktamazlar en çok *K. pneumoniae* suşlarında bulunmakla birlikte, *Citrobacter diversus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'da da bu enzimlere rastlanmıştır. *K. pneumoniae*'da görülen plazmide bağımlı penisilin direncinin %20 kadarından SHV tipi enzimler sorumludur. TEM tipi beta laktamazların aksine, SHV-1'in daha az türevi vardır. GSBL fenotipine sahip SHV varyantlarının çoğunluğu, 238 inci pozisyondaki glisin yerine serin girmesiyle karakterizedir. SHV-5 ile bağlantılı bazı türevlerde ise aynı zamanda 240. pozisyondaki glutamat ile lizinin yer değiştirmesi sorumludur. 238. pozisyondaki serin, seftazidim hidrolizi, 240. pozisyondaki lizin ise, sefotaksim hidrolizi için kritik önem taşımaktadır. Günümüze kadar gösterilen SHV tipi β -laktamazların büyük çoğunluğu GSBL fenotipi göstermektedir. Bununla birlikte SHV-10 varyantı inhibitöre dirençli yapıya sahiptir (54).

2.5.2.1.3. CTX-M

CTX-M türü beta laktamazlar, diğer oksimino beta laktam grubu antibiyotiklere oranla sefotaksime karşı daha fazla aktivite gösteren enzimlerdir. CTX-M ailesi diğer GSBL'lerden farklı olarak kompleks ve homojen olmayan bir enzim grubudur. CTX-M'in farklı varyantlarının yapıldığı ilk aminoasit dizi analizlerinde bu ailedeki enzimler beş gruba ayrılmıştır. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu ailedeki gruplara

en az iki tane daha eklenmiştir. Yapılan filogenetik analizler sonucunda CTX-M'lerin daha önceki gibi plazmid aracılı beta laktamazlardaki mutasyonlar sonucu değil, *Kluyvera spp.*'deki kromozomal *bla* genlerinin alınması sonucu ortaya çıktığı öne sürülmektedir (56). CTX-M-1 ve CTX-M-2 grubundaki beta laktamazları kodlayan genlerin preküsörleri *Kluyvera ascorbata* türünde saptanırken, CTX-M-8 ve CTX-M-9 grubundakilerin preküsörleri *Kluyvera georgiana* türünde belirlenmiştir. CTX-M-25 ve CTX-M-45 sub gruplarındaki beta laktamazın kaynağı henüz belirlenmemiş olsa bu gruptaki enzimlerin *Kluyvera* cinsindeki başka türler olabileceği düşünülmektedir (57).

Orijinal *bla*_{CTX-M} genlerinin kodladığı beta laktamazlar substrat olarak sefotaksimi tercih ederler ve seftazidimi klinikte direnç yol açmayacak miktarda hidrolize ederler. Sefotaksim ve seftriaksonun toplumda yaygın kullanımının CTX-M enzimlerinin ortaya çıkışında rol oynadığı düşünülmektedir (58).

TEM, SHV ve OXA türü GSBL enzimleri nokta mutasyonları sonucu oluşan plazmid aracılı beta laktamazlar olup geniş spektrumlu sefalosporinlerin hidrolizinde çok fazla bir önemi yoktur. TEM ve SHV türü beta laktamazlar 1980'li ve 1990'lı yıllarda ağırlıklı olarak görülen GSBL tipiydi. Bu tip beta laktamazlar CTX-M' in daha az yaygın olduğu dönemde, genellikle başta *K. pneumoniae* olmak üzere *E. coli* ve diğer *Enterobacteriaceae* ailesindeki suşların neden olduğu nozokomiyal salgınlarda bildirilmekteydi (4, 51). CTX-M grubu beta laktamazlar ilk olarak 1989 yılında saptanmalarına rağmen 2000'li yıllara kadar bu enzimlerin hızlı bir evrimi ya da yayılımı meydana gelmemiştir. Bu dönem süresince enzimler sadece hastane kaynaklı suşlarda değil toplum kaynaklı suşlarda özellikle bu enzimi daha ağırlıklı olarak üreten *E. coli* suşlarında gözlenmiştir (56) (Çizelge 2.10).

Özellikle belirli CTX-M genotiplerinin coğrafik bölgelerle ilişkili olduğu bildirilmiştir. CTX-M-15 Hindistanda saptanan tek genotip olmasına rağmen tüm dünyada yaygın bir şekilde gözlenmektedir. Çünkü üropatojenik bir klon olan *E. coli* ST 131 tarafından taşınmaktadır (Şekil 1) (59). GSBL üreten üropatojenik *E. coli* ST 131 klonu 2000'li yıllardan itibaren Amerika (ilk olarak Kanada), Avrupa ve Afrika'da (özellikle ortadoğu) CTX-M-15 tipi beta laktamaz üreten suşlarda görülmeye başlanmıştır (60). Bu klonun hızlı bir şekilde yayılmasında su veya gıdalar gibi çevresel etmenlerin yanı sıra ülkeler arasındaki seyahatlerin de önemli bir etken olduğu yapılan çalışmalarda saptanmıştır (61).

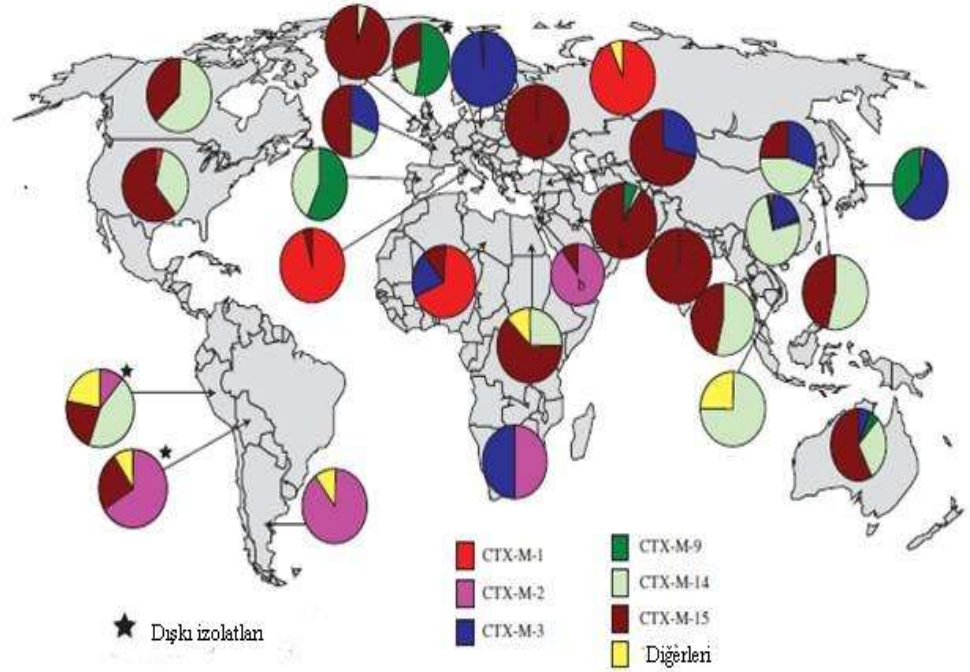
CTX-M türü GSBL enzimleri içinde az bir grubun seftazidime sefotaksimden daha fazla aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bu tür enzimi salgılayan suşlar *Salmonella* grubu da dahil, hemen her Gram negatif enterik bakteri grubunda görülür ve güney Amerika'da daha yaygın olduğu bilinmektedir. Bu bölgede CTX-M-14, CTX-M-3 ve CTX-M-2 oldukça yaygın olan türlerdir (46).

Çizelge 2.10. CTX-M Grubu Enzimlerin Yıllara Göre Epidemiyolojisi

Yıl	Ülke	CTX-M	CTX-M Grup	Açıklama
1986	Japonya	FEC-1	CTX-M-1	Önceden sefem grubu antibiyotik verilmiş olan farmakokinetik çalışmalar yapılan laboratuvar köpeklerinin fekal floralarındaki <i>E. coli</i> 'lerde
1986	Almanya	CTX-M-1	CTX-M-1	Münih'te dört aylık otitis media'lı bir çocukta <i>E. coli</i> izole edilmiştir. Sefotaksimaz türü beta laktamazlar tanımlanmıştır.
1989	Arjantin	CTX-M-2	CTX-M-2	Menenjit, septisemi ve enteritli yatan hastalardan izole edilen <i>S. thypimurium</i> izolatları
1989	Fransa	MEN-1	CTX-M-1	İtalyan bir hastadan izole edilen <i>E. coli</i> izolatu. Dizi analizi sonucunda CTX-M-1 olarak tanımlanmıştır.
1993	Japonya	TOHO-1	CTX-M-2	<i>E. coli</i> bir yaşında sistitli bir çocuktan izole edilmiştir. Bu enzim daha sonra CTX-M-44 olarak adlandırılmıştır.
1994	Fransa	CTX-M-9	CTX-M-9	Bu çalışma retrospektif olarak yapılmıştır. <i>E. coli</i> 'de bu enzimin varlığının İspanya'da fark edilmesinden önce olduğu saptanmıştır.
1996	Polonya	CTX-M-3	CTX-M-1	<i>C. freundii</i> ve <i>E. coli</i> izolatları üriner sistem enfeksiyonu olan hastalardan izole edilmiştir.
1996	İspanya	CTX-M-9	CTX-M-9	İlk kez CTX-M-14 üriner sistem enfeksiyonu olan hastadan izole edilen <i>E. coli</i> 'de izole edilmiştir.
1996	Brezilya	CTX-M-9	CTX-M-9	Rio De Jenerio da yatmakta olan hastadan izole edilen <i>E. coli</i> 'de saptanmıştır.
1996	Kore	CTX-M-14	CTX-M-9	<i>Shigella sonnei</i> , ve kandan izole edilen <i>E. coli</i> ve <i>K. pneumoniae</i> 'de saptanmıştır.
1997	Çin	CTX-M-14	CTX-M-9	Antimikrobiyal direncin araştırıldığı bir çalışmada <i>E. coli</i> ve <i>K. pneumoniae</i> 'de saptanmıştır.
1998	Tayvan	CTX-M-14	CTX-M-9	Çok merkezli antimikrobiyal süveyans çalışmasında <i>E. coli</i> izolatında saptanmıştır.

Çizelge 2.10. (Devam) CTX-M Grubu Enzimlerin Yıllara Göre Epidemiyolojisi

Yıl	Ülke	CTX-M	CTX-M Grup	Açıklama
1998	Polonya	CTX-M-15	CTX-M-1	Retrospektif bir çalışmada <i>Serratia marcescens</i> ve <i>E. coli</i> izolatında saptanmıştır.
1999	Hindistan	CTX-M-15	CTX-M-1	Bu enzimlerin ilk kez saptanması
2000	Kanada	CTX-M-25	CTX-M-25	Yatmakta olan hastadan izole edilen <i>E. coli</i> 'de saptanmıştır.
2001	İngiltere	CTX-M-25	CTX-M-1	Toplumda CTX-M-1 izolatlarının yayıldığı saptanmıştır.



Şekil 2.1. CTX-M Genotiplerinin küresel Yayılımı (59).

2.5.2.1.4. OXA

OXA tipi beta-laktamazlar uzun süre sonra tanımlanmış olan ve daha az sıklıkla görülen enzimlerdir. Ambler Grup D'de yer alırlar. Bunlar oksasilini hidrolize edebilir

ve bunlarla ilişkili olan anti-stafilokoksik penisilinleri parçalarlar. OXA enzimindeki aminoasit yapıları ayrıca GSBL fenotipini belirler. OXA tipi GSBL enzimlerin Türkiye ve Fransa'daki *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında görüldüğü bildirilmiştir (62).

OXA-1'den ve OXA-10'a kadar olanları dar spektrumlu olarak bildirilmekte olup substratları oksasilin ve kloksasilin'dir OXA tipi beta laktamazlar amino asit dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oksiiminosefalosporinleri hidroliz edebilen geniş spektrumlu enzimler haline gelmişlerdir (4). Geniş spektrumlu OXA enzimlerinden ilki OXA-11 enzimi olup ilk kez ülkemizde bildirilmiştir (49). Dünyada ve yine aynı hastanede diğer geniş spektrumlu OXA enzimleri olan; OXA-14, OXA-15, OXA-16 ve OXA-17 saptanmıştır (63). OXA-11, 14, 15 ve 16 seftazidim direncine yol açarken OXA-17 seftoksime direnç oluşturmaktadır. Bu enzim genlerinin çoğu plazmid, transpozon veya integron kontrolü altında bulunmaktadır. OXA-31 ise sefepime direnç oluşturmaktadır, buna karşın seftazidime duyarlıdır (62). OXA tipi GSBL'lere ek olarak, GSBL olmayan OXA türevleri de bulunmaktadır. OXA enzimleri içinde OXA-23, OXA-24, OXA-27, OXA-40, OXA-48, OXA-51, OXA-58, OXA-72 tipi enzimler karbapenemaz aktivitesi olan enzimlerden birkaçıdır (63). Karbapenemaz özelliği gösteren OXA-23, OXA-24, enzimleri bunlardan birkaçıdır (64).

2.5.3. Metallo Beta laktamazlar

Gram negatif basiller arasında metallo beta laktamaz (MBL) direnç gelişimi enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır. Buradaki en önemli sorun Gram negatif bakteriler arasında en yaygın rastlanan TEM ve SHV grubu ile IBL kökenli beta-laktamaz enzimlerine karşı tek kullanılabilecek ajan olan karbapenem grubu antibiyotiklere karşı da direnç gelişimidir. IMP ve VIM tipindeki enzimler MBL enzimlerinde bildirilmiş olan iki türdür. Kazanılmış olan MBL türü enzimler en sık bir gen paketi içindeki integron şeklindeki mobil bir elemanın yer değişikliği ya da kazanılması sonucu elde edilmektedir. VIM ailesi içinde bilinen ilk üye VIM-1 olup, İtalya'da *P. aeruginosa* suşlarında gösterilmiştir. VIM tipindeki MBL enzimleri ilk saptandıktan sonra bu gen paketlerinin taranması ve aktarılmasından *P.aeruginosa* suşlarının sorumlu olduğu düşünülmekte idi. Ancak daha sonra Yunanistan'dan yapılan

bir çalışmada bu enzimlerin aynı zamanda *K. pneumoniae* suşlarında da bulunduğu ve çoğul antibiyotik direnci geliştirebildiği gösterildi (65).

2.5.4. GSBL'lerin Laboratuvar Tanısı

GSBL üreten bir mikroorganizma ile infekte olan hastalarda geniş spektrumlu bir beta-laktam ile tedavi risklidir. Klinik laboratuvarlar için Standartları Belirleme Komitesi [Clinical laboratory Standart Institute (CLSI)] önerilerine göre; disk difüzyon veya dilüsyon yöntemleriyle sefotaksim, seftriakson, seftazidim, aztreonam veya sefodoksime karşı duyarlılığın azaldığının saptanması halinde doğrulama testleri uygulanmalıdır. CLSI önerilerine göre disk difüzyon testi sonucu; CAZ zon çapı 22 mm ve altındaysa, AZT ve CTX zon çapı 27 mm ve altındaysa, CRO zon çapı 25 mm ve altındaysa, CPD zon çapı 17 mm ve altındaysa; kesinlikle GSBL için doğrulama testi yapılmalıdır. Doğrulama testi olarak kombine disk difüzyon ve broth mikrodilüsyon testi önerilmektedir (66).

Bir izolata GSBL oluşturup oluşturmadığını tespit etmek için; kombine disk difüzyon, çift disk sinerji testi, üç boyutlu test, klavulonik asit kombinasyonlu mikrodilüsyon testi, klavulonik asit kombinasyonlu disk difüzyon testi, E-test, otomatize sistemler ve moleküler teknikler kullanılmaktadır (4).

2.5.4.1. Kombine Disk Yöntemi

Kombine disk yönteminde Sefotaksim (30 µg) veya seftazidim (30 µg) disklerine 10 µg klavulonik asit eklenir. McFarland 0,5 standardı yoğunluğunda olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonunun yayıldığı Mueller-Hinton Agar (MHA) plaklarına klavulonik asit içeren ve içermeyen sefotaksim ve seftazidim diskleri yerleştirilir. Bir gece 35°C'de inkübasyondan sonra klavulonik asit içeren ve içermeyen disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırılır. Kombinasyon diskleri etrafındaki zon, klavulonik asit içermeyen disk etrafındaki zona kıyasla ≥ 5 mm daha

genişse izolat GSBL üretimi açısından pozitif kabul edilir (66). Kombinasyon diski olarak 1 mg klavulonik asit içeren sefodoksim (10 µg) diskleri de kullanılabilir (67).

2.5.4.2. Çift Disk Sinerji (ÇDST) Testi

Disk difüzyon yöntemine dayanır. Mc Farland 0,5 standardı yoğunluğunda olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller Hinton agar plağına yayılır. Merkeze amoksisilin-klavulonik asit diski (AMC 10+20µg) yerleştirilir. Merkezden merkeze uzaklığı 20–25 mm olacak şekilde aztreonam (AZT 30µg), seftazidim (CAZ 30µg), sefotaksim (CTX 30µg) diskleri konulur. 35°C’de 18–20 saat inkübe edilir. Antibiyotiklere ait inhibisyon zonlarının klavulanik aside doğru genişlemesi veya iki inhibisyon zonu arasında bakteri üreyen alanda üremenin olmadığı bölge görülmesi GSBL pozitif (+) olarak yorumlanır (4, 68).

Çizelge 2.11. GSBL’ler İçin Tarama Testi Olarak Önerilen İnhibisyon Zon Değerleri (68)

Antibiyotik	Antibiyotik İnhibisyon zonu(mm)	MİK (mg)
Sefodoksim	≤ 17 mm	≥ 2
Seftazidim	≤ 22 mm	≥ 2
Aztreonam	≤ 27 mm	≥ 2
Sefotaksim	≤ 27 mm	≥ 2
Seftriakson	≤ 25 mm	≥ 2

2.5.4.3. E-test Yöntemi

Test stripleri bir ucunda seftazidim (TZ), diğer ucunda seftazidim ve klavulonik asit (TZL) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Disk difüzyon için bildirilen standartlarda hazırlanan plaklarda inkübasyondan sonra, eliptik inhibisyon zonunun stripi kestiği

değer MİK değerini vermektedir. TZ ve TZL MİK değerleri birbirine oranlandığında MİK değerinde ≥ 8 kat fazla azalma olması GSBL varlığını gösterir. Benzer şekilde sefotaksim ve sefotaksim-klavulonik asit (CT-CTL) içeren E-test stripleri de bulunmaktadır. Özellikle CT-CTL striplerinde klavulonik asitin diğer tarafa da difüze olması nedeniyle stripin ortasında bir “hayalet zon” görülebilmektedir. Bu zon GSBL göstergesi olarak kabul edilmektedir (69).

2.5.4.4. Otomatize Sistemler (Vitek, MicroScan, BD Phoenix)

Çeşitli firmalar (Becton Dickinson Diagnostics-USA, Dade Behring Inc-USA, bioMérieux-France) tarafından geliştirilen otomatize identifikasyon sistemleri bulunmaktadır. Bunların bir kısmı spektrofotometrik ve/veya başka bir dizi ölçüm yöntemini kullanarak mikroorganizmaların tiplendirilmesini sağlamaktadır. Bazı sistemlerde, tiplendirilmenin yanı sıra antibiyotik duyarlılık profillerini tespit etmektedir (70). Vitek-2 (BioMerieux, USA) sisteminde test edilecek mikroorganizmanın kolonilerinden elde edilen, belirli bir bulanıklıktaki (genellikle 0,5 Mc Farland) bakteri süspansiyonu test kartlarına otomatize sistem tarafından dağıtılmaktadır. 18-24 saat 37°C de inkübasyon sonrası suşların hem cins ve tür düzeyinde tanımlamaları ve antibiyotik duyarlılık profilleri saptanmaktadır (71). Bu sistemle ayrıca Gram negatif antibiyotik duyarlılık test panelinde GSBL tespiti yapılabilmektedir.

2.5.4.5. Moleküler Teknikler

Moleküler tanı teknikleri, gelişmekte olan teknolojinin mikrobiyoloji alanında sunduğu en önemli yeniliklerden biridir. Moleküler tekniklere her geçen gün bir yenisinin eklenmesi, farklı amaçlarla yürütülen bilimsel çalışmalara büyük yarar sağlamaktadır. Bu yöntemlerin yaygın olarak kullanımını etkileyen en önemli faktörler maliyet ve deneyimli personel ihtiyacı olsa da, kendisine özgü avantajlara ve dezavantajlara sahip olan bu yöntemlerden tüm dünyada yaygın olarak

yararlanılmaktadır. Son yıllarda ülkemizde de bu tür yöntemlerin kullanıldığı bilimsel araştırmalar hız kazanmıştır. Moleküler tanısal yöntemler, geleneksel yöntemler kullanarak bulunması ve belirlenmesi zor veya imkansız olan enfeksiyöz ajanların tanımlanmasında halen en değerlisidir. Benzer şekilde modern seroloji, akım sitometrisi ve elektron mikroskopi ve kütle spektrometri gibi güçlü araçlar ile birleştirildiğinde moleküler teknikler medikal uygulamada sık karşılaşılan patojenlerle birlikte, birçok yeni ortaya çıkan veya yeniden (tekrar) ortaya çıkan patojenlerin de hızlı ve doğru tanısına imkan sağlamaktadır (72). Dirençli ve çoğunlukla nozokomiyal patojen olan bakterilerin tiplendirilmesinde en iyi yöntemler, kromozomal DNA polimorfizmine dayalı olanlardır. Ribotipleme, PFGE (pulsed field gel electrophoresis), PZR-RFLP (polimeraz zincir reaksiyon-restriction fragment length polymorphism), rep-PZR (repetitive extragenic palindromic element-PZR), RAPD (random amplified polymorphic DNA), ARDRA (amplified ribozomal DNA restriction analysis), AFLP (amplified fragment length polymorphism) ve MLST (multilocus sequence typing) yaygın olarak kullanılan kromozomal DNA bazlı tiplendirme yöntemleridir (73).

Moleküler yöntemler GSBL'lerin rutin tanısında gerekli olmayıp epidemiyolojik öneme sahiptir. Plazmid kaynaklı beta laktamazların analizinde SHV ve TEM tipi enzimlere spesifik oligonükleotid primerler kullanılarak beta laktamaz genleri tespit edilir. Beta laktamaz enziminin cinsini saptamak için kullanılan en kolay ve yaygın moleküler yöntem beta laktamaz genine spesifik oligonükleotit primerlerle yapılan PZR yöntemidir. Ancak sekans analizi yapılmaksızın PZR ile TEM ya da SHV varyantları arasında ayırım yapmak mümkün değildir (74).

Moleküler tanısal yöntemlerin günümüzde kullanımını yaygınlaşmasına rağmen, bu yöntemler eğitilmiş personel ve donanımlı bir laboratuvar gerektiren pahalı bir teknolojidir (73).

2.5.4.5.1. Repetitive Extragenic Palindromic Elements PZR (Rep-PZR)

Rep-PZR tipleme yönteminde; çoğu bakterinin genomu boyunca dağılım gösteren tekrarlanan DNA dizilimlerine komplementer olan primerler kullanılarak tekrarlar arasında kalan DNA dizilimlerinin amplifikasyonu yapılmaktadır. Suşlar arasında tekrar elementlerinin sayısı ve lokalizasyon farkı moleküler tipleme için

gerekli olan tipe özgü bant profilini oluşturmaktadır. Tekrarlayan dizilimlerin üç grubu tanımlanmıştır. Bunlar; REP dizilimler, ERIC dizilimler ve *S. pneumoniae*'nin BOX elementidir. rep-PZR; kültürden olduğu gibi direkt klinik örneklerden yapılan DNA ekstraksiyon ürünleriyle de çalışılabilir. Tekrarlanan elementlerin dizilimlerinin ve kullanılacak primerlerin baz diziliminin bilinmesi zorunlu değildir. Sıklıkla tek bir primer seti kullanılarak Gram negatif ve Gram pozitif birçok bakteride tiplendirmeyi sağlayacak yeterlikte bant profili oluşturulmaktadır ve genellikle BOX primerleri seçilmektedir. Rep-PZR, AFLP gibi moleküler tiplleme yoluyla suşlar arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmada en sık kullanılan PZR bazlı tiplleme yöntemlerindedir. Rep-PZR tiplleme kolay uygulanabilmesi, çok sayıda izolat ile çalışılabilmesi ve ayırt ediciliğinin yüksek olması nedeniyle bakteriyel popülasyonların filogenetik yapıları ve taksonomik farklılıklarını belirlemede de kullanılabilir (75).

Rep-PZR yöntemi DiversiLab adı verilen sistemle yarı otomatize hale getirilmiştir. DiversiLab sistemi teknik uygulaması basit, < 24 saatten önce saf kültürlerde sonuç veren geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında daha hızlı bir yöntemdir. Bu yöntem 3 bileşenden meydana gelmiştir.

- ❖ PZR kiti
- ❖ Agelant 2100 bioanalize sistemi çoğaltılmış parçacıkları bir mikroakışkan içeren Chip içerisinde ışık yoğunluğuna ve göç zamanına göre ayırır.
- ❖ Web tabanlı DiversiLab yazılımı.

Sonuçlar; DiversiLab sistemi tarafından bir dendogram raporu şeklinde ya da bir noktalama grafiği şeklinde oluşturulur. Dendogram; izolatlar arasındaki benzerliği gözler önüne serer. Noktalama grafiği ise, hiyerarşik olmayan uzaysal ilişkiyi gösterir. Jel görüntüleri veya elektroforegram ya da her ikisi beraber değerlendirilebilir. Ticari olarak bulunabilmesi kullanıcı tarafından kolay anlaşılabilen raporları ve kullanım kolaylığı DiversiLab sistemini yoğun mikrobiyolojik çalışmalar yapan laboratuvarlar için cazip hale getirmiştir (76).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışma Grubu ve Örnekler

Ocak 2010-Aralık 2011 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde çeşitli kliniklerde yatan hastalardan, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden (idrar, kan doku, abse ve yara) izole edilen 133 *Enterobacteriaceae* izolatı (109 *E. coli*, 24 *K. pneumoniae*) çalışmaya alındı. Bu izolatlar antibiyotik duyarlılık sonucuna göre GSBL oluşturma ihtimali olan suşlardı. İzolatların tiplendirilmesi ve antibiyotik duyarlılık testleri ve moleküler çalışmaları, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Etik Kurul Başkanlığı tarafından, 17.04.2011 tarih ve 2011/56-04 sayılı kararı ile onay verilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler

Tez çalışması, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan araç ve gereçler kullanılarak yapılmıştır. Diğer kimyasal maddeler ve sarf malzemeleri, BAP-SBE TM (GB) 2011-1 DR kodlu proje olarak Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından sağlanan maddi kaynakla tedarik edilmiştir.

- Hassas Terazi: Kimyasal maddelerin tartımında hassas terazi (Scaltec, ABD) kullanıldı.

- Vorteks (Mekanik Karıştırıcı): PZR işlemleri sırasında örneklerin ve PZR komponentlerinin karıştırılması için Vorteks (Vortex Genie 2) cihazı kullanıldı.
- Soğutmalı Santrifüj: Örneklerin santrifüj edilmesi ve PZR işlemleri sırasında santrifüj işleminin gerekli olduğu durumlarda çözelti ve karışımların çöktürülmesi amacıyla soğutmalı santrifüj cihazı (Hettich,) kullanıldı.
- İnkübatör: Ekimi yapılan besiyerlerinin inkübasyonu için inkübatör (Memmert,İngiltere) kullanıldı.
- Otoklav: Besiyerlerinin ve solüsyonların sterilizasyonu için otoklav (Nüve,Türkiye) kullanıldı.
- Steril laminar akımlı güvenlik kabini: DNA ekstraksiyonu ve PZR'nin steril bir ortamda gerçekleştirilebilmesi için steril laminar akımlı güvenlik kabini (Heraeus, Almanya) kullanıldı.
- Benmari: Ben-mari (Memmert UE 500, İngiltere), DNA ekstraksiyonunda ve hazırlanan solüsyonların ısı ile çözülmesinde kullanıldı.
- Mikroskop: Gram boyama yapılan preparatların incelenmesi, ışık mikroskopunda (Olympus, Japonya) yapıldı.
- Mikrodalga Fırın: Elektroforezde kullanılan agarozun, tampon solüsyonu içerisinde eritilmesinde mikrodalga fırın (Beko, MD 1500,Türkiye) kullanıldı.
- Derin Dondurucu: DNA ekstraksiyonu ve PZR sonucu elde edilen örneklerin saklanması için derin dondurucu (Uğur, Türkiye) kullanıldı.
- Otomatik Pipetler: Tek kanallı 20 µl, 200 µl ve 1000 µl lik Eppendorf (Eppendorf Reference, Germany) marka pipetler kullanıldı. Steril pipet ucu olarak, 2 µl, 10 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik filtreli plastik pipet (Eppendorf Reference, Almanya) uçları kullanıldı.
- Thermal Cycler: PZR işlemlerinin yapılmasında programlanabilen üst kapak ısıtmalı otomatik thermal cycler (Eppendorf, Mastercyclers Gradient 22331, Germany) kullanıldı.
- Elektroforez Tankı ve Güç Kaynağı: Agaroz jel elektroforez (Biometra,Almanya) işlemlerini gerçekleştirmek amacıyla kullanıldı.

- Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi: UV translüminatörlü (Salubris-technica, Almanya) bilgisayarlı jel dokümantasyon sistemi, elde edilen jeldeki bantların görüntülenmesinde kullanıldı.

3.2. Bakteriyolojik Tanı İçin Kullanılan Besiyerleri ve Boyalar

3.2.1. % 5 Kanlı Agar'ın Hazırlanması

Hastalardan alınan klinik örnekler, mikroorganizmaların üretilmesinde kullanılan bir genel üretim besiyeri olan Kanlı agar besiyerine (Oxoid 646736, İngiltere) ekilerek üreyen mikroorganizmalar değerlendirildi. Besiyerleri 90 mm çapındaki steril plastik petrilere kalınlığı 4 mm olacak şekilde döküldükten sonra kalite kontrolleri yapılarak, kullanılıncaya kadar +4 °C'de buzdolabında saklandı.

❖ Besiyerinin içeriği:

- Distile su 1 L
- Dehidrate kanlı agar 40 g
- Kan 40 ml (Besiyeri otoklavlanıp 42 °C'ye geldikten sonra eklenir)

3.2.2. Eosin Methylene Blue Agar'ın (EMB) Hazırlanması

Hastalardan alınan klinik örneklerde, Gram negatif bakterilerin izolasyonu için EMB agar (Oxoid 802369, İngiltere) kullanıldı. Besiyerleri 90 mm çapındaki steril plastik petrilere kalınlığı 4 mm olacak şekilde döküldükten sonra kalite kontrolleri yapılarak, kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklandı.

❖ Besiyerinin içeriği:

- Distile su 1 L

- Dehidrate EMB agar 37,5 g

3.2.3. Mueller Hinton Agar'ın Hazırlanması

İzole edilen bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesinde Mueller Hinton agar (MHA) (bioMerieux 824574001, Fransa) kullanıldı. Besiyerleri 90 mm çapındaki steril plastik petrilere kalınlığı 4 mm olacak şekilde döküldükten sonra kalite kontrolleri yapılarak, kullanılıncaya kadar +4 °C'de buzdolabında saklandı.

❖ Besiyerinin içeriği:

- Distile su 1 L
- Dehidrate MHA agar 38 g

3.2.4. Triple Sugar Iron Agar'ın (TSI) Hazırlanması

İzole edilen bakterilerin identifikasyonunda kullanıldı. Besiyerleri 16x100mm'lik cam tüplere döküldükten sonra, 45° açı ile yatık pozisyonda oda ısında bekletildi. Kalite kontrolleri yapılarak, kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklandı.

❖ Besiyerinin içeriği:

- Distile su 1 L
- Dehidrate TSI agar (BioMerieux 832247001, Fransa) 52 g

3.2.5. Lysine Iron Agar'ın (LIA) Hazırlanması

İzole edilen bakterilerin identifikasyonunda kullanıldı. Besiyerleri 16x100mm'lik cam tüplere döküldükten sonra, 45° açı ile yatık pozisyonda oda ısında bekletildi. Kalite kontrolleri yapılarak, kullanılıncaya kadar +4 °C'de buzdolabında saklandı.

❖ Besiyerinin içeriği:

- Distile su 1 L

- Dehidrate LIA (HIMEDIA 12033,Hindistan) 34,56 g

3.2.6. Simmonds' Sitrat Agar'ın Hazırlanması

İzole edilen bakterilerin identifikasyonunda kullanıldı. Besiyerleri 16x100mm'lik cam tüplere döküldükten sonra, 45° açı ile yatık pozisyonda oda ısında bekletildi. Kalite kontrolleri yapılarak, kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklandı.

❖ Besiyerinin içeriği:

- Distile su 1 L
- Dehidrate Simmonds Sitrat agar (Merck VM056501 313, ABD) 22,5 g

3.2.7. Üre Agar'ın Hazırlanması

İzole edilen bakterilerin identifikasyonunda kullanıldı. Besiyerleri 16x100mm'lik cam tüplere döküldükten sonra, 45° açı ile yatık pozisyonda oda ısında bekletildi. Kalite kontrolleri yapılarak, kullanılıncaya kadar +4 °C'de buzdolabında saklandı.

❖ Besiyerinin içeriği:

- Distile su 950 ml
- Dehidrate üre agar (HIMEDIA Y1214, Hindistan) 24 g

3.2.8. Sülfat, İndol, Hareket Besiyeri (SIM) Hazırlanması

İzole edilen bakterilerin identifikasyonunda kullanıldı. Besiyerleri 16x100mm'lik cam tüplere döküldükten sonra, dik pozisyonda oda ısında bekletildi. Kalite kontrolleri yapılarak, kullanılıncaya kadar +4 °C'de buzdolabında saklandı.

❖ Besiyerinin içeriği:

- Distile su 1 L
- Dehidrate SIM besiyeri (HIMEDIA 16984, Hindistan) 31 g

3.2.9. Besiyerlerinin Kalite Kontrolü

Hazırlanmış olan tüm besiyerlerinin pH ölçümleri petrilere veya tüplere dökülmeden önce yapıldı. Besiyerleri bir gece etüvde bekletildikten sonra ekim için kullanıldı. Standart bakteri ekimi yapılarak besiyerlerinin kalite kontrolü yapıldı.

3.2.10. Gram Boyama

Gram boyamada kullanılan kimyasallar ve içerikleri aşağıda verilmiştir.

Kristal Viyole (Merck ZC255240)

Kristal viole	20 g
Amonyum oksalat	8 g
%96 Etil alkol	200 ml
Saf su	800 ml

Lugol

Stok Lugol

İyod (Merck B962361)	5 g
Potasyum iyodür (Merck B339840)	10 g
Saf Su	100 ml

Sulu Fuksin

Bazik fuksin (Merck ZC262337)	2 ml
Distile su	18 ml

3.2.11. Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar

3.2.11.1. 10X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) Tamponu Stok Solüsyonu

Tris Base	108 g
Borik Asit	55 g
EDTA	9,3 g

Kimyasallar tartılarak distile su ile eritilmiş ve pH 8,0'e ayarlanmıştır. Distile su ile 1 L'ye tamamlanarak, oda sıcaklığında saklandı.

3.2.11.2. Elektroforez Yürütme Tamponu (1X TBE)

10X TBE tamponu stok solüsyonundan 100 ml alınarak üzerine 900 ml distile su eklenip dilüe edilmiş, 1X TBE tamponu haline getirilmiştir. Bu solusyon elektroforez tankında kullanıldı.

3.2.11.3. Yükleme Tamponu (Loading Buffer)

Sükroz	4 g
Brom fenol mavisi	0,05 g

Tartılan kimyasallar 20 ml 1X TBE tamponunda çözülerek oda ısısında saklandı.

3.2.11.4.Etidyum Bromid (Et-Br)

Stok Et-Br'den alınarak 10 mg/ml'lik olacak şekilde hazırlandı.

3.2.11.5.Agaroz Jel Solüsyonu

Elektroforez için %1'lik agaroz jelin hazırlanmasında, 100 ml'lik bir balon jöjeye 0,4 g agaroz tartılarak 1X TBE tamponu ile 40 ml'ye tamamlandı ve mikrodalga fırında homojen bir şekilde şeffaf hale gelinceye kadar ısıtıldı (yaklaşık üç-dört dakika). Sıcak jelin içerisine 10 mg/ml konsantrasyonundaki Et-Br'den 4 µl eklendi. Et-Br'ün jel içerisinde iyice karışması sağlandıktan sonra sıcak jel PZR ürünlerinin yüklenmesi için kuyucukların oluşmasını sağlayan jel tarağı yerleştirilmiş jel tepsisine dikkatlice döküldü. Jelin içinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Yaklaşık 30 dakika oda ısısında beklenerek jelin katılaşıp donması sağlandı. Daha sonra jel içerisinden tarak çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirildi.

3.3. Hasta Örneklerinin Kültürü ve Değerlendirmesi

Kliniklerden gönderilen hasta örneklerinin ekimleri uygun besiyerlerine yapıldı. Kan kültürü için BACTEC kan kültür şişelerine alınarak otomatik kan kültür cihazına (BACTEC 9240, ABD) konarak 5 gün takip edildi. Bu süre sonunda üreme olan şişelerden Gram boyama yapılarak kanlı agar ve EMB besiyerlerine pasaj yapıldı. Abse, yara, idrar ve steril vücut sıvıları gibi örnekler kanlı agar ve EMB besiyerlerine, doku, kateter örnekleri tiyoglikolatlı buyyon besiyerine ekim yapılarak ertesi gün katı besiyerlerine pasajlandı. Ekimler 37C°'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı ve koloni morfolojileri incelendi, Gram boyama yapıldı. Daha sonra klasik biyokimyasal testler için kligler-iron agar, lizin-iron agar, sitrat, üre, indol, hareket besiyerlerine ekimler yapılarak identifikasyonları yapıldı. Gerekli durumlarda otomatize bakteri identifikasyon sistemi kullanıldı. (VİTEK-2, BioMerieux, ABD). Bunun için şeffaf

plastik deney tüpüne (12x75 mm) 3ml steril tamponlanmış tuzlu su (%0.45- 0.50 NaCl, pH 4.5-7.0) konulduktan sonra saf kolonilerden  ze ile tüpe aktarılarak 0.5 Mac Farland bulanıklığına eŐdeęer homojen bakteri süspansiyonları hazırlandı. Bu t p arkasına Gram negatif identifikasyon kartı (Vitek-2 GN, bioMerieux-SA Fransa) takılarak cihazın içine yerleştirildi. Ertesi gün cihaz tarafından üremeler değerlendirilerek bakterinin tanımlaması yapıldı.

Antibiyotik duyarlık testleri Mueller-Hinton agar besiyeri kullanılarak Kirby-Bauer disk difüzyon testi yapıldı. 0.5 Mc farland bakteri süspansiyonu hazırlanıp, Mueller-Hinton besiyerine yaygın ekim yapılarak, antibiyotik diskleri (Oxoid, İngiltere) seftazidim (30 g), seftazidim (30 g), imipenem (10  g), meropenem (10  g), gentamisin (10  g), amikasin (30  g), tetrasiklin (30  g), levofloksasin (5 g), siprofloksasin (5 g), trimetoprim-sulfametoksazol (25 g), amoksisilin/klavulanik asit (AMC, 20/10  g) aztreonam (30  g), seftriakson (30  g) ve sefotaksim (30  g) diskleri yerleştirildi. Etüvde 35  C'de 18 saatlik inkübasyon sonrası zon çapları ölçülerek CLSI 2012 göre değerlendirildi (66).

CLSI standartlarında belirtildiği Şekilde zon çapları sefodoksim için ≤ 17 mm, seftazidim için ≤ 22 mm, aztreonam için ≤ 27 mm, sefotaksim için ≤ 27 mm ve seftriakson için ≤ 25 mm olan suşların GSBL üretebileceği düŐünülerek, bu suşlara doğrulamak için çeşitli fenotipik yöntemler olarak çift disk sinerji testi, kombine disk difüzyon testi ve E-test yapıldı (66). PZR ile beta laktamaz ve kinolon direncinden sorumlu gen bölgeleri olan *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{CTX-M}* (grup 1,2,8 ve 25), *bla_{VEB}*, *bla_{GES}*, *bla_{PER}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* ve *bla_{KPC}* genleri, *bla_{GES}* ve *bla_{OXA-48}*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *aac(6')-Ib* ve *qepA* alıŐıldı. 100 *E. coli* suşunun klonal iliŐkisini belirlemek için rep-PZR yapıldı.

Çizelge 3.1. Antibiyotik İnhibisyon Zon Çapları

Antibiyotik	Antibiyotik İnhibisyon Zon Çapı (mm)		
	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
Ampisilin	≥ 17	14-16	≤ 13
Amoksisilin/klavulonik asit	≥ 18	14-17	≤ 13
Sefazolin	≥ 23	20-22	≤ 19
Sefuroksim	≥ 18	15-17	≤ 14
Sefoksitin	≥ 18	15-17	≤ 14
Seftazidim	≥ 21	18-20	≤ 17
Seftriakson	≥ 23	20-22	≤ 19
Sefepim	≥ 18	15-17	≤ 14
İmipenem	≥ 23	20-22	≤ 19
Meropenem	≥ 23	20-22	≤ 19
Amikasin	≥ 17	15-16	≤ 14
Gentamisin	≥ 15	13-14	≤ 12
Siprofloksasin	≥ 21	16-20	≤ 15
Levofloksasin	≥ 17	14-16	≤ 15
Ofloksasin	≥ 16	13-15	≤ 12
Trimetoprim/sülfametaksazol	≥ 16	11-15	≤ 10

3.3.1. İzole Edilen Suşlara Çift Disk Sinerji Testi Yönteminin Uygulanması

Bu yöntemde 0.5 Mc Farlanda uygun olarak hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton agar plaklarına yayıldı. Amoksisilin/klavulanik asit (AMC, 20/10 µg) antibiyotik diskinin etrafına, merkezden merkeze uzaklık 25 mm olacak şekilde, aztreonam (30 µg), seftriakson (30 µg), seftazidim (30 µg) ve sefotaksim (30 µg) (Oxoid, İngiltere) antibiyotik diskleri yerleştirildi. Plaklar bir gece 35°C’de inkübe

edildi. İnkübasyon sonrasında, antibiyotik disklerine ait inhibisyon zonlarının, amoksisilin/klavulanik asit yönünde genişleme göstermesi veya diskler arasındaki bölgede bir inhibisyon alanının gözlenmesi, GSBL varlığı açısından pozitiflik olarak kabul edildi (4, 66).

3.3.2. İzole Edilen Suşlara Kombine Disk Difüzyon Yönteminin Uygulanması

Testte ticari olarak bulunan sefotaksim/klavulonik asit (30µg/10µg) ve seftazidim/klavulonik asit (30µg/10µg) kombine diskleri kullanılmıştır. 0.5 Mc Farlanda uygun olarak hazırlanan bakteri süspansiyonu yayılan Mueller Hinton agar plaklarına klavulonik asit içeren ve içermeyen sefotaksim ve seftazidim diskleri yerleştirilmiştir. Bir gece 35°C'de inkübasyondan sonra klavulonik asit içeren ve içermeyen disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırılmıştır. Kombinasyon diskleri etrafındaki inhibisyon zonu, klavulonik asit içermeyen disk etrafındaki inhibisyon zonuna kıyasla 5 mm veya daha genişse, izolat GSBL üretimi açısından olumlu kabul edilmiştir (67).

3.3.3. İzole Edilen Suşlara E-test Yönteminin Uygulanması

Testte ticari olarak bulunan sefotaksim (30µ) (CT) ve sefotaksim/klavulonik asit (CTL) (30µg/10µg) stripleri (BBL Sensi Disc, USA) kullanıldı. 0.5 Mc Farlanda uygun olarak hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller Hinton agar plaklarına yayıldıktan sonra bir ucunda sefotaksim (CT), diğer ucunda sefotaksim/klavulonik asit (CTL) içeren strip yerleştirildi. Plakların 16-18 saatlik inkübasyonundan sonra, eliptik inhibisyon zonunun stripi kestiği değer MİK değeri olarak hesaplandı (69). CLSI standartlarına göre CT ve CTL MİK değerleri birbirine oranlandığında MİK değerinde ≥ 8 kat fazla azalma olması GSBL varlığını gösterir. CT-CTL striplerinde klavulonik asitin diğer tarafa da difüze

olması nedeniyle stripin ortasında bir “hayalet zon” görülebilmektedir. Bu zon GSBL göstergesi olarak kabul edilmektedir (69).

3.4. Moleküler Yöntemle İzolatlarda Antibiyotik Direnç Genlerinin Saptanması

3.4.1. DNA İzolasyonu

GSBL üreten izolatların, enzim tiplerinin saptanabilmesi için öncelikle DNA izolasyonu yapıldı. Bunun için kaynatma yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde göre, Steril 1,5 ml’lik ependorf tüp içerisine 1 ml steril distile su eklendi. Tüpler 80°C’ye getirilmiş kuru ısı bloklarına konularak 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra tüpler 13.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Dip kısımdaki çökelti kalacak şekilde üst kısım atılıp üzerine 200 µl kloroform eklenip iyice vortekslendikten sonra tekrar pellet üzerine 200 µl distile su eklenip iyice vortekslendi. Daha sonra tüpler 13.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant yeni bir steril ependorf tüp için alınarak elde edilen DNA amplifikasyonda kullanılmak üzere -20°C’de saklandı (77).

3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

GSBL ürettiği saptanan 133 izolat, çizelge 3.2’de belirtilen özgül primerler kullanılarak multipleks PZR ile CTX-M tipi beta laktam enzimlerinin varlığı araştırıldı. Beta laktamaz direncinden sorumlu gen bölgeleri *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{CTX-M}* (grup 1, 2, 8 ve 25), *bla_{VEB}*, *bla_{GES}*, *bla_{PER}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* ve *bla_{KPC}* genleri, *bla_{GES}* ve *bla_{OXA-48}* gen bölgeleri multipleks PZR ile çalışıldı (74). Ayrıca kinolon direncinden sorumlu olan *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qepA* ve *aac(6’)-Ib*) bölgesi de tarandı (78, 79, 80).

PZR karışımı 50 µl olacak şekilde steril distile su, tampon (1X) (Fermentas), MgCl₂ (2.5 mM) (Fermentas, USA), dNTP (200 µl) (Fermentas, USA), Taq polimeraz (2.5 U/ µl) (Fermentas, USA), 20 pmol/ µl primer (MolBiol, Germany) ve 5 µl ekstrakte

edilen DNA konularak hazırlanmıştır. Amplifikasyonda kullanılan primerler ve amplifikasyon ürünlerinin büyüklüğü Çizelge 3.2, 3.3 ve 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Beta Laktamaz Gen Bölgesi İçin Primerler

Hedeflenen Beta Laktamaz Gen Bölgesi	Primer Çifti	Amplifikasyon ürünü (Baz çifti) (bç)
TEM varyantları TEM-1 ve TEM-2	MultiTSO-T-F-5’CATTTCGGTGTGCGCCCTTATTC3’ MultiTSO-T-R-5’CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC3’	800 bç
SHV	MultiTSO-S-F-5’AGCCGCTTGAGCAAATTAAC3’ MultiTSO-S-R 5’ATCCCGCAGATAAATCACCAC3’	713 bç
OXA-1, OXA-4, OXA-30	MultiTSO-O-F-5’ GGCACCAGATTCAACTTTCAAG3’ MultiTSO-O-R-5’GACCCCAAGTTTCTGTAAAGTG3’	564 bç
CTX-M grup 1, grup 2 ve grup 9 (CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-14)	MultiCTXMGp1-F-5’TTAGGAARTGTGCCGCTGYA ^b 3’ MultiCTXMGp1-2-R- 5’CGATATCGTTGGTGGTRCCAT ^{b3} ’ MultiCTXMGp2-F- 5’CGTTAACGGCACGATGAC3’ MultiCTXMGp1-2-R-5’ CGATATCGTTGGTGGTRCCAT ^{b3} ’ MultiCTXMGp9-F-5’ TCAAGCCTGCCGATCTGGT3’ MultiCTXMGp9-R-5’ TGATTCTCGCCGCTGAAG3’	688 bç 404 bç 561 bç
CTX-M grup 8/25 (CTX-M-8, CTX-M-25, CTX-M-26, CTX-M-39, CTX-M-41)	CTX-Mg8/25-F-5’- AACRCRCAGACGCTCTAC ^b 3’ CTX-Mg8/25-R-5’TCGAGCCGGAASGTGTYAT ^b 3’	326 bç
ACC-1 ve ACC-2	MultiCaseACC-F-5’ CACCTCCAGCGACTTGTTAC3’ MultiCaseACC-R-5’ GTTAGCCAGCATCACGATCC3’	346 bç
FOX-1 ve FOX-5	MultiCaseFOX-F-5’ CTACAGTGCGGGTGGTTT3’ MultiCaseFOX-R-5’ CTATTTGCGGCCAGGTGA3’	162 bç
MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8, CMY-11 ve CMY-19	MultiCaseMOX-F-5’- GCAACAACGACAATCCATCCT3’ MultiCaseMOX-R-5’GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA3’	895 bç
DHA-1, DHA-2	MultiCaseDHA-F-5’ TGATGGCACAGCAGGATATTC 3’ MultiCaseDHA_rev GCTTTGACTCTTTCGGTATTTCG	997 bç
LAT-1-3, BIL-1, CMY-2-7, CMY-12-18 ve CMY-21-23	MultiCaseCIT-F-5’CGAAGAGGCAATGACCAGAC3’ MultiCaseCIT-R-5’ACGGACAGGGTTAGGATAGYb3’	538 bç
ACT-1 ve MIR-1	MultiCaseEBC-F-5’CGGTAAAGCCGATGTTGCG3’ MultiCaseEBC-F-5’AGCCTAACCCTGATACA3’	683 bç
GES-1-9 ve GES-11	MultiGES-F-5’AGTCGGCTAGACCGGAAAG3’ MultiGES-R-3’TTTGTCCGTGCTCAGGAT3’	399 bç

Çizelge 3.2.(Devam) Beta Laktamaz Gen Bölgesi İçin Primerler

Hedeflenen Beta Laktamaz Gen Bölgesi	Primer Çifti	Amplifikasyon ürünü (Baz çifti) (bç)
PER-1 ve PER-3	MultiPER-F-5'GCTCCGATAATGAAAGCGT3' MultiPER-R-5'TTCGGCTTGACTCGGCTGA3'	520 bç
VEB-1-6	MultiVEB-F-5'CATTTCGGATGCAAAGCGT3' MultiVEB-R-5'CGAAGTTTCTTTGGACTCTG3'	648 bç

Çizelge 3.3. Karbapenemaz Gen Bölgesi İçin Primerler

Hedeflenen Beta Laktamaz Gen Bölgesi	Primer Çifti	Amplifikasyon ürünü (Baz çifti) (bç)
GES-1-9 ve GES-11	MultiGES F-5' AGTCGGCTAGACCGGAAAG3' MultiGES R-5'TTTGTCCGTGCTCAGGAT3'	399 bç
OXA-48-benzeri	MultiOXA-48-F-5'GCTTGATCGCCCTCGATT3' MultiOXA-48-R-5' GATTTGCTCCGTGGCCGAAA3'	281 bç
IMP	MultiIMP F-5'TTGACACTCCATTTACDG ^{b3} ' MultiIMP R-5'GATYGAGAATTAAGCCACYCT ^{b3} '	139 bç
VIM	MultiVIM F-5'GATGGTGTTTGGTCGCATA3' MultiVIM R-5'CGAATGCGCAGCACCAG3'	390 bç
KPC	MultiKPC F-5'CATTCAAGGGCTTTCTTGCTGC3' MultiKPC R-5'ACGACGGCATAGTCATTTGC3'	538 bç

Çizelge 3.4. Kinolon Gen bölgesi için Primerler

Hedeflenen Kinolon Gen Bölgesi	Primer Çifti	Amplifikasyon ürünü (Baz çifti) (bç)
<i>QnrA</i>	qnrA1- qnrA6-F 5'AGAGGATTTCTCACGCCAGG3' qnrA1- qnrA6-R 5'TGCCAGGCACAGATCTTGAC3'	580 bç
<i>QnrB</i>	qnrB1- qnrB6 F-5'GGMATHGAAATTCGCCACTG3' qnrB1- qnrB6 R-5'TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA3'	264 bç
<i>QnrS</i>	qnrS1- qnrS2 F-5'GCAAGTTCATTGAACAGGGT3' qnrS1- qnrS2 R-5'TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG3'	428 bç

Çizelge 3.4.(Devam) Kinolon Gen bölgesi için Primerler

Hedeflenen Kinolon Gen Bölgesi	Primer Çifti	Amplifikasyon ürünü (Baz çifti) (bç)
<i>QnrC</i>	QnrC-F 5'GGGTTGTACATTTATTGAATC3' QnrC-R 5'TCCACTTTACGAGGTTCT3'	447 bç
<i>QepA</i>	QepA-F 5'GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG3' QepA-R 5'CTTCCTGCCCGAGTATCGTG3'	199 bç
<i>Aac(6')-Ib</i>	Aac-F- 5'TGA CCT TGC GAT GCT CTA TG-3' Aac-R-5'TTA GGC ATC ACT GCG TGT TC-3'	506 bç

3.4.2.1. Amplifikasyon koşulları

CTX-M grubu için; 94°C'de 10 dakikalık başlangıç denatürasyonun ardından, 30 siklus olarak 94 °C'de 40 saniye denatürasyon, 60°C'de 40 saniye bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzama, 72°C'de 7 dakika son uzama olarak uygulandı. Karbapenem gen bölgesinin amplifikasyonunda bağlanma sıcaklığı VIM, IMP ve KPC için 55 °C, GES ve OXA 48 için 57 °C olarak uygulandı (74). Kinolon grubu için; *qnrA*, *qnrB* ve *qnr S* için 95°C'de 10 dakikalık başlangıç denatürasyonun ardından, 35 siklus olarak 95 °C'de 1 dakika denatürasyon, 54°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzama, 72°C'de 10 dakika son uzama, *qnrC* ve *qepa* için 94°C'de 3 dakikalık başlangıç denatürasyonun ardından, 30 siklus olarak 95 °C'de 30 saniye denatürasyon, 53°C'de 45 saniye bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzama, 72°C'de 5 dakika son uzama, *aac(6')-Ib* için 94°C'de 3 dakikalık başlangıç denatürasyonun ardından, 30 siklus olarak 95 °C'de 30 saniye denatürasyon, 58°C'de 45 saniye bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzama, 72°C'de 5 dakika son uzama olarak uygulandı (78, 79, 80).

3.4.2.2. Elektroforez

Elde edilen PZR ürünleri Etidiyum bromidli agaroz jele yüklendikten sonra elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez işlemi bittikten sonra jel tanktan çıkararak 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-translüminatöründe incelendi ve

elektroforez işlemi sonunda elde edilen bantlar jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat Marne La Vallée, Fransa) gözlemlenerek kaydedildi.

3.4.3. rep-PZR yöntemi (Diversilab)

Çalışmaya dahil edilen hasta örneklerinden izole edilen 100 *E. coli* suşu arasındaki klonal ilişkinin varlığı Rep-PZR Diversilab sistemi ile araştırıldı.

3.4.3.1. REP-PZR Diversilab Sistemi ile Moleküler Tiplendirme

REP (Repetitive Extragenic Palindromic Element) PZR yönteminde, epidemiyolojisi araştırılan mikroorganizmaların kromozomları üzerinde bulunan, kısa, tekrarlayan ve konservatif yapıları hedef alan kısa primerler kullanılır. Bu bölgelerin birbirlerine yakınlığına bağlı olarak iki ekstragenik bölge arasında kalan kısım amplifiye edilir ve elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde değerlendirilir. Diversilab sistemine bağlı Rep-PZR uygulaması aşamaları; DNA ekstraksiyonu, diversilab parmak izi kitleri ile Rep-PZR; diversilab çipleri ile mikroakışkan elektroforez ve internet tabanlı yazılım programı ile sonuçların değerlendirilmesini takip eden aşamalarından oluşur.

3.4.3.2. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, ABD) ile üretici firmanın önerdiği DNA izolasyon protokolüne göre yapıldı. DNA ekstraksiyonu yapılacak örnekler kanlı agara tek koloni ekimi yapılarak 35°C'de 18-24 inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda örnekler ikinci kez pasajlanarak elde edilen kültürlerden DNA ekstraksiyonu yapıldı.

3.4.3.2.1. DNA ekstraksiyonunun yapılışı

- 300 µl MicroBead çözeltisi, çalışılacak örnek sayısı kadar çıkarılan MicroBead tüplerine dağıldı.
- Besiyerindeki bakterilerden 1 µL'lik steril öze ile 2 öze dolusu örnek MicroBead tüpü içerisine alınarak tüp içerisinde bulunan kum taneleri ile karışması sağlandı.
- MicroBead tüpüne 50 µl MD1 çözeltisi eklendi.
- İçerisinde bakteri süspansiyonu bulunan MicroBead tüpleri, MOBIO vorteks adaptörüne takılarak 10 dakika boyunca maksimum hızda vortekslendi.
- Vorteksleme işleminden sonra tüpler 10.000 x g'de 30 saniye çevrildi.
- Temiz tüplere 100 µl MD2 çözeltisi kondu.
- Santrifüj işlemi sonunda elde edilen tüm süpernatant 100 µl MD2 çözeltisine aktarıldı. Bu aşamada süpernatant ile birlikte MicroBead tüplerindeki kum tanelerinin transfer edilmemesine dikkat edildi.
- Örnekler kısa bir süre vortekslendi ve 15 dakika veya yeterli soğukluğa ulaşmaya kadar buzdolabına bırakıldı.
- Buz dolabından çıkarılan örnekler 1 dakika 10.000 x g'de santrifüj edildi.
- Temiz tüplere 450 µl MD3 çözeltisi eklendi.
- Santrifüj sonunda örneklerden 200 µl süpernatant 450 µl MD3 çözeltisine aktarıldı.
- Tüpler kısa bir süre vortekslendi ve çevrildi.
- Süpernatant (yaklaşık 650 µl) temiz bir spin filtreye transfer edildi.
- Spin filtreli tüpler 30 saniye boyunca 10.000 x g'de santrifüj edildi. Toplama tüpüne akan sıvı atıldı.
- 300 µl MD4 çözeltisi spin filtreye boşaltıldı.
- Spin filtreli tüpler 30 saniye boyunca 10.000 x g'de santrifüj edildi ve toplama tüpüne akan sıvı atıldı.
- Tüpler, 1 dakika 10.000 x g'de kuru olarak santrifüj edildi.
- Spin filtreler temiz bir tüpe aktarıldı.
- 35 µl MD5 çözeltisi spin filtrenin ortasına gelecek şekilde boşaltıldı ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

- İnkübasyon sonunda spin filtre içeren 30 saniye 10.000 x g'de santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminden sonra DNA'lar toplama tüpüne aktarıldı ve spin filtre atıldı.
- Toplama tüpünde elde edilen DNA'lar Rep-PZR uygulamasına kadar - 20°C'de bekletildi.

3.4.3.2.2. DNA Miktarlarının Ölçülmesi

Ekstrakte edilen DNA'ların miktarları nanodrop cihazı (NANODROP 2000, Thermo scientific) ile ölçüldü. Miktarı fazla olan örneklerin DNA'ları, Diversilab dilüsyon hesaplama programı ile dilüsyon için gereken DNA ve su miktarları hesaplanarak, nükleaz içermeyen steril su ile 35 ng/μL olacak şekilde seyreltildi.

3.4.3.3. Rep-PZR Uygulaması

Rep-PZR uygulaması diversilab *E. coli* fingerprinting kit (Biomerieux SA, FRANCE) ile yapıldı. Reaksiyon bileşenlerinin hazırlanması ve termal cyclers programının oluşturulması diversilab sistemi Rep-PZR worksheet programında belirtildiği gibi uygulandı (çizelge 3.5 ve çizelge 3.6).

Çizelge 3.5. Rep-PZR'de Bir Örnek İçin Hazırlanan Reaksiyon Karışımı

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
Rep-PZR MM1	18 μL
GeneAmp 10X PZR Buffer	2,5 μL
Primer Mix	2 μL
AmpliTaq DNA polimeraz	0,5 μL
Ekstraksiyon ürünü 35ng/μL	2 μL
Toplam	25 μL

Çizelge 3.6. Rep-PZR Amlifikasyon Koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)	Döngü Sayısı
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	94	120	1
Denatürasyon	94	30	35
Primer bağlanması (annealing)	50	30	
Zincir uzaması (extension)	70	90	
Son uzama (Final extension)	70	180	1
Muhafaza	4	∞	∞

3.4.3.4. Diversilab DNA Labchip Uygulaması

Rep-PZR ile amplifiye edilen *E. coli* DNA'ları Diversilab labchip kitine (Biomerieux Sa-Fransa) yüklenerek Agilent 2100 Bioanalizer (Agilent Technologies, USA) ile mikroakışkan elektroforez uygulandı. Labchip elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen ham grafikler internet tabanlı diversilab yorumlama ve yazılım programı (DiversiLab, version 2.1.66, BioMerieux, Fransa) ile değerlendirildi.

3.4.3.4.1. Jel-Boya Matriks Hazırlanması

- Diversilab DNA chip kiti ile birlikte kullanılan ve buzdolabında muhafaza edilen DNA Reagent & Supplies kiti jel matriksi hazırlamak için buzdolabından çıkartıldı ve oda ısısına gelinceye kadar beklendi.
- Jel ve boya vortekslendi ve kısaca spin yapıldı.
- 1.5 ml'lik bir tüpe 200 µl jel yavaşça pipetlendi ve üzerine 10µl boya eklendi.
- Karışım homojen olana kadar vortekslendi.
- Karışım kit içinde bulunan spin filtreye transfer edildi.

- Spin filtre 1500 X g'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminden sonra filtre atılarak toplama tüpündeki jel-boya çip yükleme aşamasında kullanıldı.

3.4.3.4.2. Çip Yükleme

- DNA Reagent & Supplies kiti oda ısısına gelinceye kadar bekletildi.
- Kit içerisinde bulunan DNA marker ve ladder kısaca vortekslendi, jel boya karışımını vortekslenmeden kullanıldı.
- 9 µl jel boya karışımı çipin üzerindeki siyah daireye alınmış G yükleme kuyusuna pipetlendi.
- Çip yükleme istasyonu şırıngası 1ml'de iken çip istasyona yerleştirildi ve çipe 30 saniye basınç uygulandı.
- Kalan G kuyularına 9 µl jel boya karışımı pipetlendi.
- Her bir numune kuyusuna 5 µl DNA marker pipetlendi.
- İlgili numune kuyularına 1 µl PZR ürünü eklendi.
- Örnekler çipe yüklendikten sonra çip 1 dakika vortekslendi.

Çip vorteks işleminden sonra Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) cihazına yerleştirildi ve cihazın programına çip numarası girilerek mikroakışkan çip elektroforezi başlatıldı. Çip elektroforezi sonucunda Rep-PZR parmak izi grafikleri ve bant kalıpları internet tabanlı yazılım programı (DiversiLab, version 2.1.66, bioMerieux, Fransa) ile elde edildi. Örneklerin Rep-PZR profil benzerliklerinin hesaplanması, DiversiLab yazılımı üzerinde Pearson korelasyon katsayısı ve UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) yöntemi kullanılarak yapıldı. Verilerin analizinde, her bir izolat için jel profil görüntüsü, yüzde benzerlik oranları ve dendrogram raporu oluşturuldu.

Rep-PZR parmak izi profil benzerliklerinin yorumlanması diversilab rehberinde verilen kriterler referans alınarak yapıldı.

3.4.3.5. İzolatların Rep-PZR Parmak İzi İlişkilerinin Değerlendirilmesi

- 1) Ayırt edilemez örneklerin benzerlik yüzdeleri (benzerlik > %97) yüksektir. Bu grupta yer alan örnekler genellikle %97'nin üzerinde benzerlik gösterirler ve bant farklılığı yoktur. Çalışmada bu grupta yer alan örnekler ana klonun alt tipi olarak (alt klon) değerlendirildi
- 2) Benzer örneklerin benzerlik oranları (benzerlik %95-97 arasında, 1-2 bant farkı) biraz düşüktür. Genellikle %95'in üzerinde benzerlik gösterirler ve 1-2 bant farklılığı vardır. Çalışmada bu özelliğe sahip örnekler ana klon olarak değerlendirildi.
- 3) Farklı örnekler düşük benzerlik oranına (benzerlik < %95 ve > 2 bant farkı) sahiptir. Benzerlik oranı genellikle %95'in altındadır ve bant farklılığı fazladır. Bu grupta yer alan örnekler çalışmada farklı klon olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Örneklerin Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen 133 enterobakteri suşunun 109'u *E. coli*, 24'ü *K. pneumoniae* olarak tanımlanmıştır. Bu suşların tümü yatan hastalardan izole edilmiştir. *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarının izole edildiği klinik örnekler Çizelge 4.1'de verilmiştir. Klinik örneklerin dağılımına bakıldığında izolatların 102'si (%76,7) idrar, 19'u yara (%14,3), 7'si kan (%5,3) ve 5'i doku (%3,7) örneklerinden elde edilmiştir.

Çizelge 4.1. *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının İzole Edildiği Klinik Örnekler

Örnek Türü	İdrar	Yara	Kan	Doku
İzolat				
<i>E. coli</i> (109)	84	15	6	4
<i>K. pneumoniae</i> (24)	18	4	1	1
Toplam (133)	102	19	7	5

İzole edilen suşların kliniklere göre dağılımı Çizelge 4.2'de verilmiştir. Buna göre izolatların ağırlıklı olarak çocuk sağlığı ve hastalıkları (%36,8) ve üroloji kliniğinden (%21,1) gelen örneklerden elde edildiği saptanmıştır. İzolatların diğer servislerdeki dağılımı ise, genel cerrahi %6, beyin cerrahisi %2,3, kalp ve damar cerrahisi %3, kadın hastalıkları ve doğum %3, enfeksiyon hastalıkları %6 ve iç hastalıkları %21,8 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. İzolatların Kliniklere Göre Dağılımı

Servis İzolat	Pediyatri	Üroloji	Genel Cerrahi	Beyin Cerrahisi	Kalp damar Cerrahisi	Kadın Hastalık ları ve Doğum	Enfeksiyon	İç Hastalıkları
<i>E. coli</i> (109)	38	23	7	1	4	3	8	25
<i>K. pneumoniae</i> (24)	11	5	1	2	-	1	-	4
Toplam (133)	49	28	8	3	4	4	8	29

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları

Çalışmada elde edilen 133 izolatın Çizelge 4.3'te antibiyotik duyarlılık test sonuçları verilmiştir. Buna göre yapılan antibiyogram sonucu suşların en fazla direnç gösterdikleri antibiyotikler şu şekilde sıralanmaktadır: Suşların %99,25'i ampiciline, sefazolin, seftazidim ve sefepime, %98,5'u seftriaksona dirençli iken %99,25'i meropenem ve %98,5'u imipeneme duyarlı olarak bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında GSBL tespiti için fenotipik tarama testleri olarak, çift disk sinerji, kombine disk difüzyon testi ve E-test kullanılmıştır. CLSI tarafından GSBL doğrulanması için kombine disk difüzyon testi önerilmektedir. Çift sinerji testi ile *E.coli* suşlarının 107'si (%96,4) pozitif ve ikisi (%3,6) negatif, *K. pneumoniae* suşlarının 23'ü pozitif (%95,7) ve biri (%4,3) negatif bulunmuştur. E-test ile *E.coli* suşlarının 102'si (%93) pozitif ve yedisi (%7) negatif, *K. pneumoniae* suşlarının 22'si (%92) pozitif, 2'si (%8) negatif olarak belirlenmiştir. Kombine disk difüzyon testi ile *E.coli* suşlarının 108'i (%99,08) pozitif, biri (%0,92) negatif, *K. pneumoniae* suşlarının 23'ü (%95,7) pozitif ve biri (%4,3) negatif olarak saptanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.3. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları

Antibiyotik	Duyarlı		Orta Duyarlı		Dirençli	
	Sayı	Yüzde (%)	Sayı	Yüzde (%)	Sayı	Yüzde (%)
Ampisilin	0	0	1	0,75	132	99,25
Amoksisilin/klavulonik asit	18	13,5	56	42,1	59	44,4
Sefazolin	1	0,75	0	0	132	99,25
Sefuroksim aksetil	1	0,75	0	0	132	99,25
Sefoksitin	114	85,7	15	11,3	4	3,00
Seftazidim	1	0,75	0	0	132	99,25
Seftriakson	1	0,75	1	0,75	131	98,5
Sefepim	0	0	1	0,75	132	99,25
İmipenem	131	98,5	1	0,75	1	0,75
Meropenem	132	99,25	0	0	1	0,75
Amikasin	79	59,4	42	31,6	12	9
Gentamisin	60	45,1	0	0	73	54,9
Siprofloksasin	59	44,4	0	0	74	55,6
Levofloksasin	59	44,4	0	0	74	55,6
Ofloksasin	59	44,4	0	0	74	55,6
Trimetoprim/sülfametaksazol	47	35,4	0	0	86	64,6

Çizelge 4.4. GSBL Pozitiflik Oranının Yöntemlere Göre Dağılımı

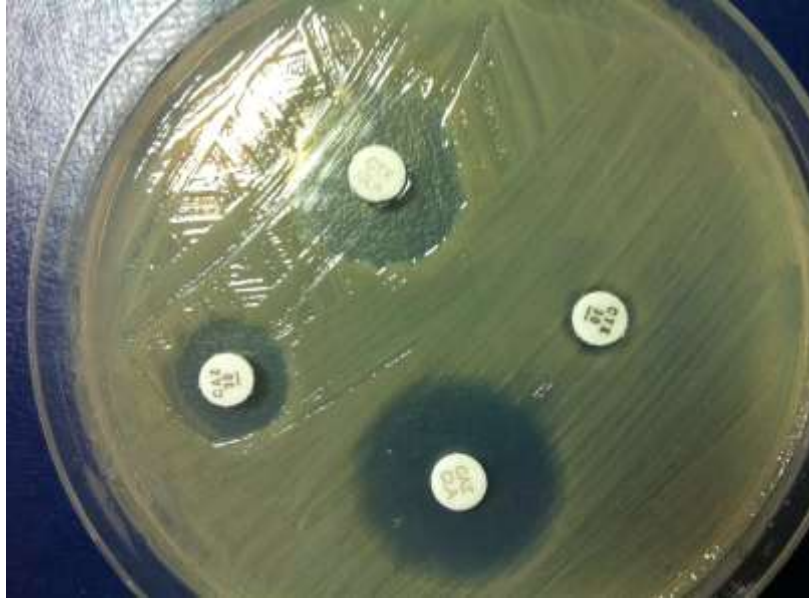
Test Suş tür ve sayısı	Çift Disk Sinerji Testi		E-test		Kombine Disk Difüzyon	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
<i>E. coli</i> (109)	107 (96,4)	2 (3,6)	102 (93)	7 (7)	108 (99,08)	1 (0,92)
<i>K. pneumoniae</i> (24)	23 (95,7)	1(4,3)	22 (92)	2 (8)	23 (95,7)	1 (4,3)

(): Yüzde oranlarını ifade etmektedir.

CLSI tarafından önerilen kombine disk difüzyon testinde 108 *E. coli*'de GSBL pozitifliği saptanırken, Çift disk sinerji ile 107 suşta, E-test ile 102 suşta tespit edilmiştir. Bu suşların tümünde moleküler yöntemle en az bir veya birden fazla GSBL aktivitesinden sorumlu gen bölgesi tespit edilmiştir. Çift diskle kombine disk difüzyon test sonuçlarının uyumlu olduğu ancak E-testle uyumsuz olduğu görülmektedir. *K. pneumoniae*'da kombine disk difüzyon testinde 23, Çift disk sinerji ile 23 ve E-test ile 22 suşta GSBL pozitifliği saptanmıştır. Bu suşların tümünde moleküler yöntemle en az bir veya birden fazla GSBL aktivitesinden sorumlu gen bölgesi tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Çift Disk Sinerji Testi



Şekil 4.2. Kombine Disk Testi



Şekil 4.3. E- test

4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

Bu çalışmada 133 izolatın 114'ünde (%85) CTX-M grup 1 enzimi, 43'ünde (%32,1) TEM tipi, 44'ünde (%32,8) OXA tipi, 31'inde hem TEM hem OXA tipi ve bir izolatta hem TEM hem SHV tipi beta laktamazlar saptanmıştır. Dört izolatta (%3) CTX-M grup 9, altı izolatta (%4,5) CTX-M grup 1 ve 9, iki izolatta LAT (%1,5), iki izolatta KPC (%1,5), iki izolatta PER (%1,5),iki izolatta OXA-48 (%1,5) ve bir izolatta VIM (%0,75) tipi beta laktamaz tespit edilmiştir (Çizelge 4.5, Çizelge 4.6). Çalışmamızda, kinolon direncinden sorumlu gen bölgeleri olan *qnrS* üç *E. coli* (%3,6) ve bir *K. pneumoniae* (%4,2) izolatında, *qnrB* bir *K. pneumoniae* (%4,2) izolatında, *qepA* bir *E. coli* (%0,91) izolatında gen bölgeleri saptanmıştır. *aac(6')-Ib-cr* gen bölgesi ise 82 *E. coli* (%75,3), 15 *K. pneumoniae* (%62,5) suşunda pozitif olarak belirlenmiştir. *QnrC* ve *qnrA* gen bölgesine çalışmamızdaki izolatların hiç birinde saptanamamıştır (Çizelge 4.7). Ayrıca bir *E. coli* izolatında *qepA*, *qnrS* ve *aac(6')-Ib-cr*, bir *K. pneumoniae*

izolatında *qnrB* ve *aac(6')-Ib-cr*, yine bir *E. coli* izolatında hem *qnrS* hem de *aac(6')-Ib-cr* gen bölgeleri tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. İzolatlarda Saptanan Beta laktamaz Enzimleri

Beta Laktamazlar	İzolatlar	
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
CTX-M grup 1	96 (88,7)	18 (75)
CTX-M grup 9	2 (1,8)	2 (8,3)
CTX-M grup 1 ve grup 9	4 (3,6)	2 (8,3)
TEM	35 (32,1)	8 (33,3)
OXA	39 (35,8)	5 (20,8)
TEM ve OXA	22 (20,2)	9 (37,5)
TEM ve SHV	0 (0)	1 (4,2)
LAT	2 (1,8)	0 (0)

() : Yüzde oranlarını ifade etmektedir.

Çizelge 4.6. İzolatlarda Saptanan Karbapenemaz Enzimleri

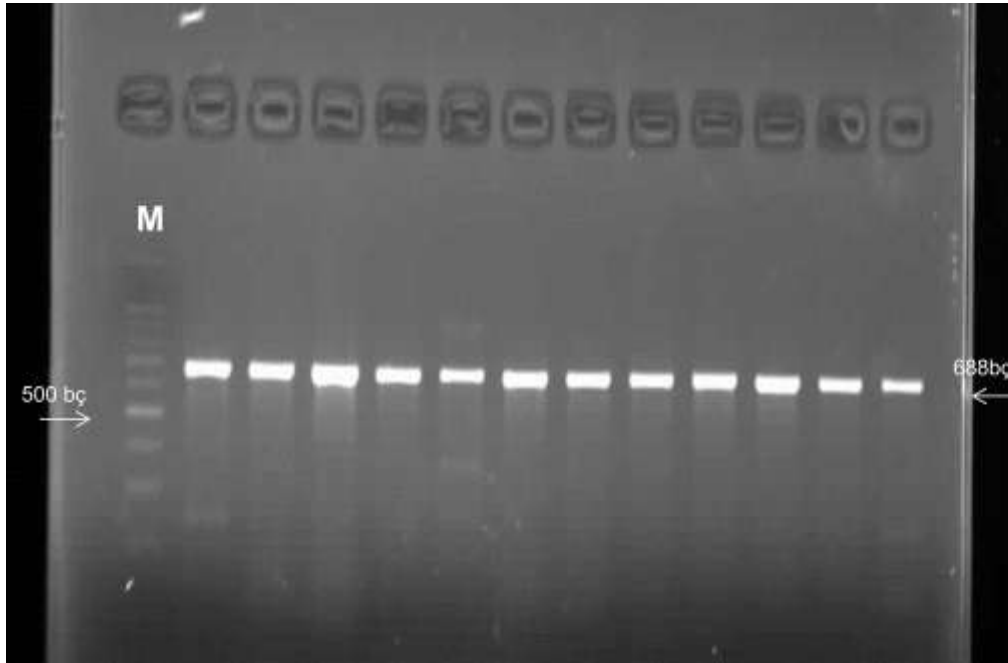
Karbapenemazlar	İzolatlar	
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
KPC	1 (0,92)	1 (4,2)
PER	1 (0,92)	1 (4,2)
OXA-48 benzeri	2 (0,92)	0 (0)
VIM	1 (0,92)	0 (0)

() : Yüzde oranlarını ifade etmektedir.

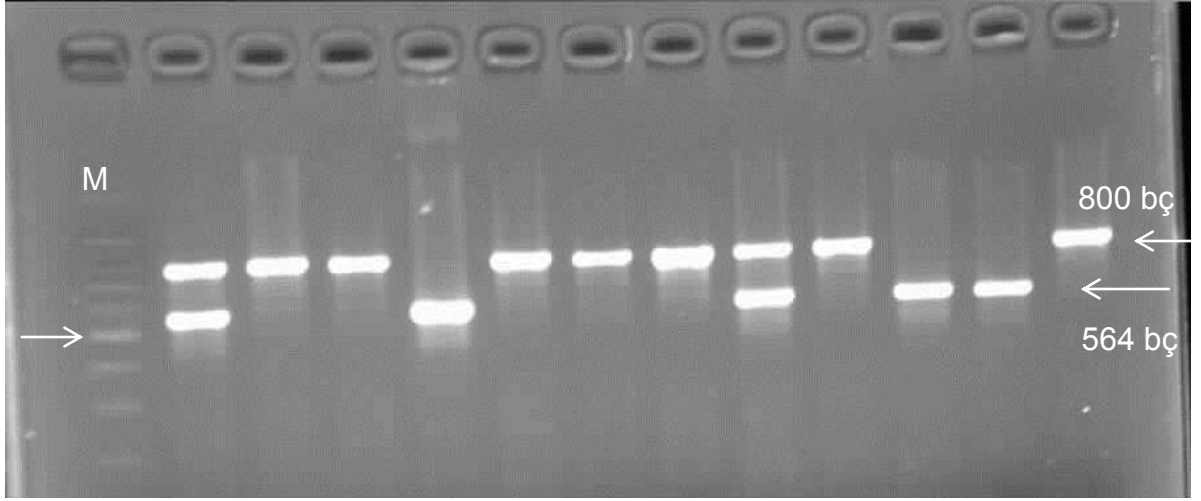
Çizelge 4.7. İzolatlarda Saptanan Kinolon Direncinden Sorumlu Gen Bölgeleri

Gen Bölgesi	İzolatlar	
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Qnr A	0 (0)	0 (0)
Qnr B	0 (0)	1 (4,2)
Qnr S	3 (2,75)	1 (4,2)
Qnr C	0 (0)	0 (0)
Qepa	1 (0,92)	0 (0)
Aac(6')1b	82 (75,3)	15 (62,5)

() : Yüzde oranlarını ifade etmektedir.



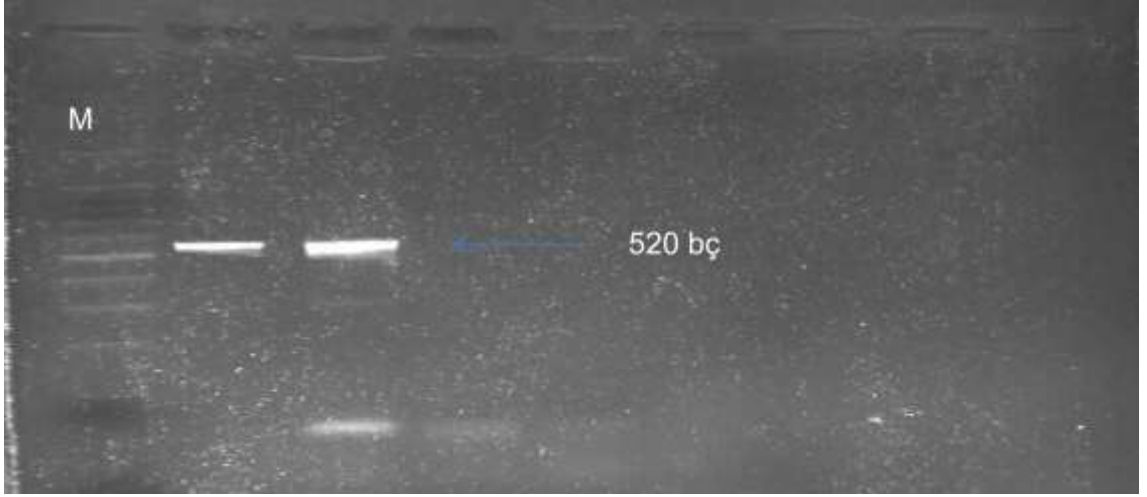
Şekil 4.4. CTX-M Grup 1 Tipi Beta Laktamaz Üreten İzolatların Elektroferez Görüntüsü (1inci kuyu marker, 2-13 cü kuyular CTX-M grup 1 tipi beta laktamaz üreten izolatlar)



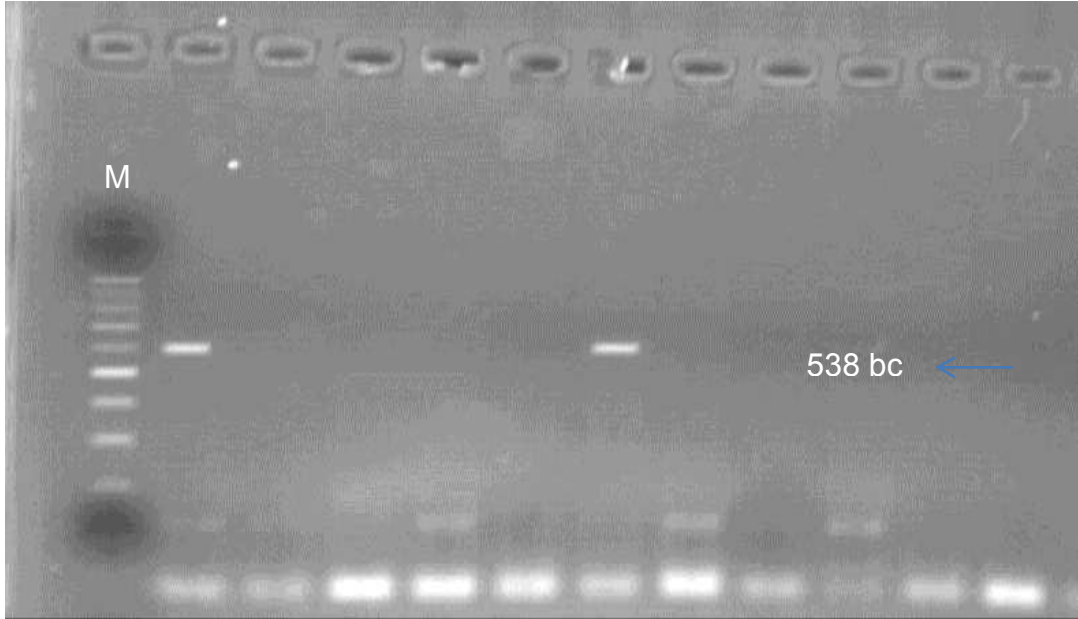
Şekil 4.5. TEM ve OXA Grup 1 Tipi Beta Laktamaz Üreten İzolatların Elektroferez Görüntüsü (1inci kuyu marker, 2 ve 9 uncu Kuyu TEM ve OXA tipi beta laktamaz, 3,4,6,7,8,10 ve 13 ncü kuyular TEM tipi, 5, 11 ve 12 nci kuyular OXA tipi beta laktamaz üreten suşlar)



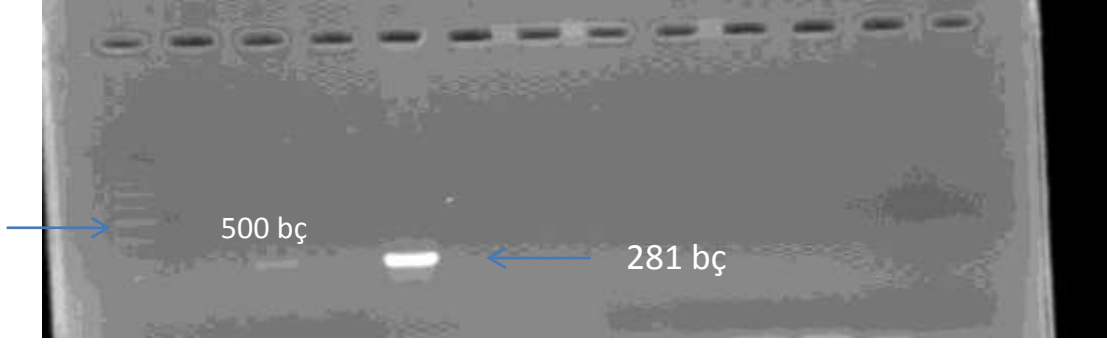
Şekil 4.6. LAT Tipi Beta Laktamaz Üreten İzolatın Elektroferez Görüntüsü (1 inci kuyu Marker, 9 uncu kuyu LAT tipi beta laktamaz üreten izolat)



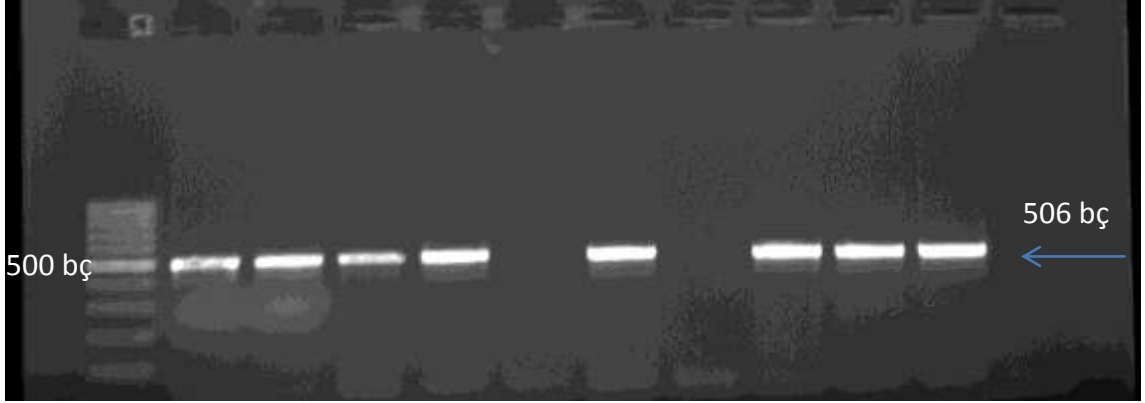
Şekil 4.7. PER Tipi Beta Laktamaz Üreten İzolatın Elektrofrez Görüntüsü (1 inci kuyu marker, 2 ve 3 ncü kuyular PER tipi beta laktamaz pozitif izolatlar)



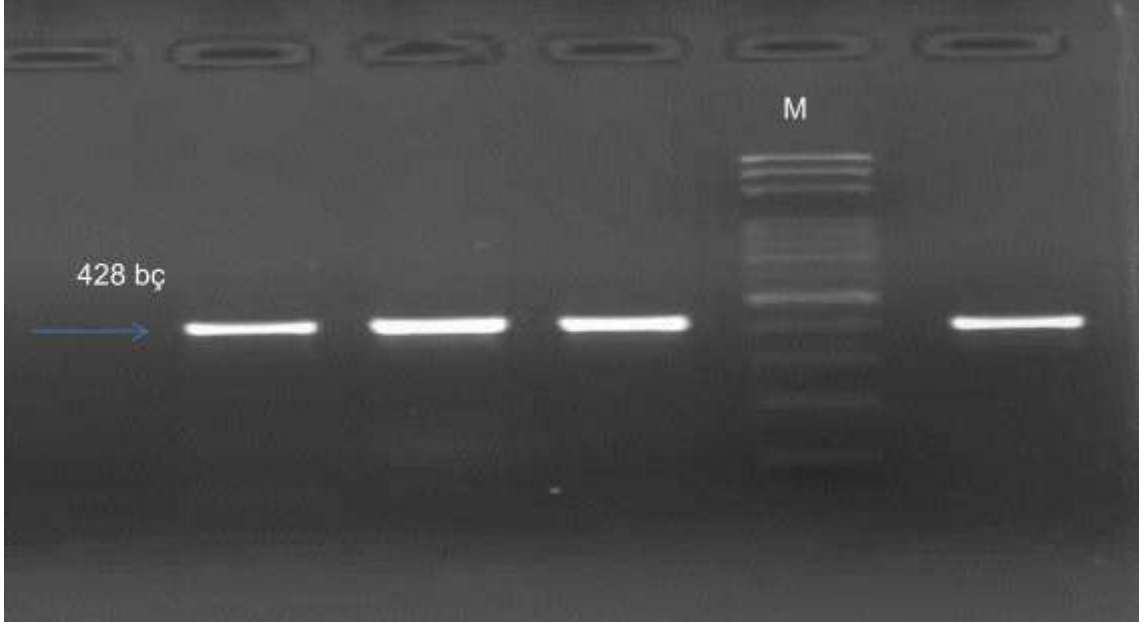
Şekil 4.8. KPC Tipi Beta Laktamaz Üreten İzolatların Elektrofrez Görüntüsü (1 inci kuyu marker, 2 ve 7 inci kuyular KPC pozitif izolatlar)



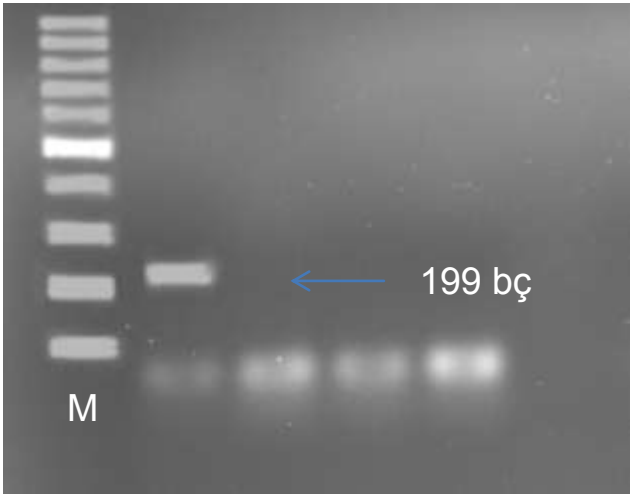
Şekil 4.9. OXA-48 Tipi Beta Laktamaz Üreten İzolatların Elektroferez Görüntüsü (1 inci kuyu marker, 3 ve 5 inci kuyular pozitif izolatlar)



Şekil 4.10. Aac(6')Ib Genine Sahip İzolatların Elektroferez Görüntüsü (1 inci kuyu marker, 2,3,4,5,7,8,9,10 ve 11 inci kuyular pozitif izolatlar)



Şekil 4.11. QnrS Genine Sahip İzolatların Elektroferez Görüntüsü (5 inci kuyu marker, 2,3,4 ve 6 inci kuyular pozitif izolatlar)



Şekil 4.12. QepA Genine Sahip İzolatın Elektroferez Görüntüsü (1 inci kuyu marker, 2 inci kuyu pozitif izolat)

4.4. Rep PZR Sonuçları

Çalışmada Rep-PZR Diversilab yöntemi ile tiplendirilen 100 *E. coli* izolatından ikisi ana klon (1 ve 2) olmak üzere toplam 5 farklı klon (1-5) elde edildi. 1. ana klon *E. coli*'lerin 19 (%19)'nun toplandığı en büyük klon olarak tespit edildi. 2. ana klon 11 suş (%11) ile ikinci büyük klondur. Diğer klonlar; 3. klon 2 (%11)'şer suş; 4. ve 5. Klon 5'şer (%5) suş, Diğer klonlar 42 (%42) suş içermektedir. Her iki ana klondaki örneklerin ağırlıklı olarak geldiği servisler pediatri ve ürolojidir. Ana klondaki 30 örnekten 26'sı idrar, biri kan, ikisi yara ve biri dokudur. Örneklerin 11'i pediatri, 19'u üroloji servisinden geldi (Çizelge 4.8).

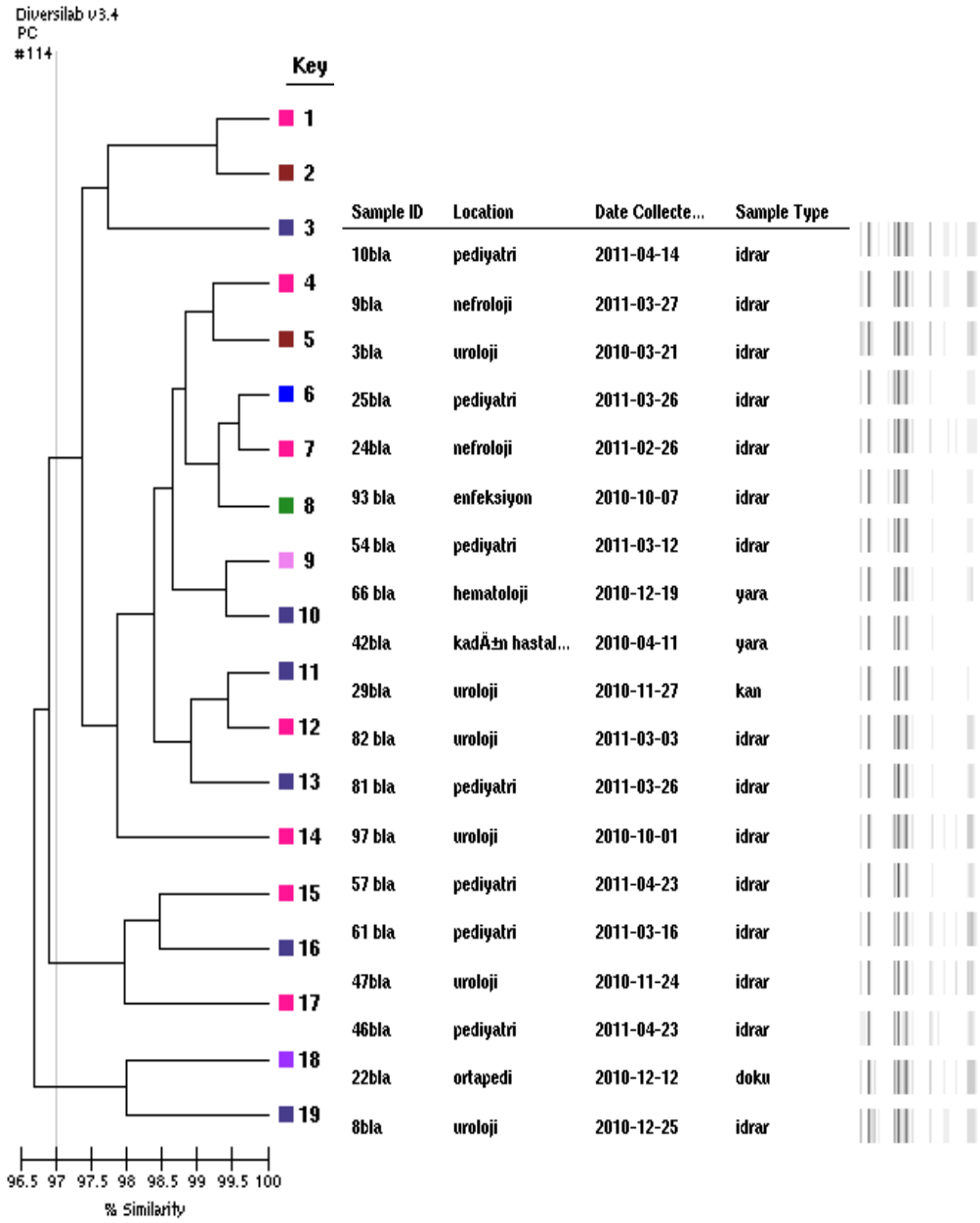
Özellikle 1. Ana klondaki izolatların pediatri servisinden mart ayında izole edilmesi ve saptanan gen bölgelerinin benzer olması dikkat çekicidir. Ana klondaki suşların hepsinde CTX-M Grup 1, TEM tipi beta laktamazlar görülmekte olup kinolon direnç geni olarak aac(6')1b saptandı.

Aynı klonda yer alan suşların antibiyotik profilleri büyük oranda aynı olmakla birlikte farklı profillere sahip suşlar da görülmektedir. Ayrıca farklı klonda yer alan suşlar arasında da benzer antibiyotik profilleri elde edilmiştir. Ana klon I'de yer alan 14 suşun antibiyotik profilleri aynı olmakla birlikte geri kalan dört suştan üçü amoksisilin/klavulonik aside orta duyarlıyken biri duyarlıdır. Bu klonda 16 suş sefoksitine duyarlıyken, iki suş dirençli ve bir suş orta duyarlıdır. Ana klon II'de ise beş suş amoksisilin/klavulonik aside orta duyarlı, iki suş ise duyarlıdır. Bu klonda beş suş sefoksitine dirençli, geri kalan altı suş duyarlıdır.

Her klondan bir suş seçilerek klonların birbirlerine benzerlik oranları, dendrogramlar ve benzerlik matrislerinde gösterilmiştir.

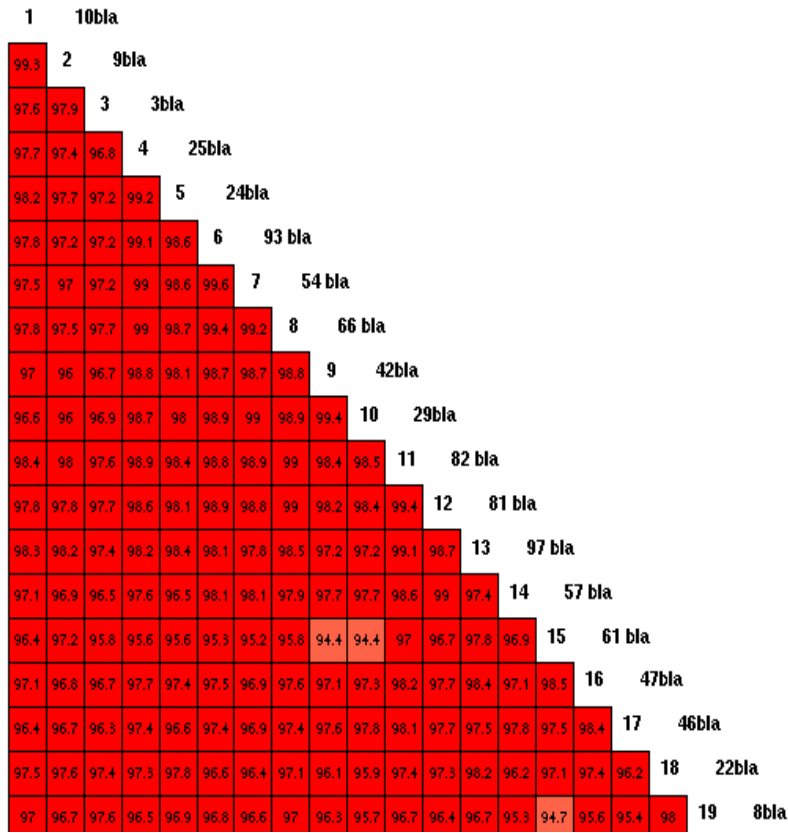
Çizelge 4.8. Ana klonlardaki Örneklerin Özellikleri

Ana Klon	Servis	Tarih	Örnek	GSBL	Kinolon
Ana Klon 1	Pediyatri	14/03/2011	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	Pediyatri	26/03/2011	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM,OXA	Aac(6 ['])1b
	Pediyatri	12/03/2011	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	Pediyatri	26/03/2011	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	Pediyatri	23/03/2011	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	Pediyatri	16/03/2011	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM,OXA	Aac(6 ['])1b
	Pediyatri	23/03/2011	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM,OXA	Aac(6 ['])1b
	Üroloji	21/03/2010	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	Üroloji	27/11/2010	Kan	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	Üroloji	03/03/2011	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	Üroloji	01/10/2010	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	Üroloji	24/11/2010	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	Üroloji	25/12/2010	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	Nefroloji	27/03/2011	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	Nefroloji	26/03/2011	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	Hematoloji	19/12/2010	Yara	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	Kadın Hastalıkları	11/04/2010	Yara	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
Ortopedi	12/12/2010	Doku	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b	
Ana Klon II	Pediyatri	23/09/2010	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	Pediyatri	24/12/2010	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM, OXA	Aac(6 ['])1b
	Pediyatri	24/12/2010	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM, OXA	Aac(6 ['])1b
	Pediyatri	17/02/2011	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	Üroloji	23/12/2010	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM, OXA	Aac(6 ['])1b
	Üroloji	21/10/2010	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	Üroloji	26/11/2010	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	İmmünoloji	11/12/2010	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	Dermatoloji	06/11/2010	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	Onkoloji	11/11/2010	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b
	Enfeksiyon	16/03/2011	İdrar	CTX-M Grup 1, TEM	Aac(6 ['])1b

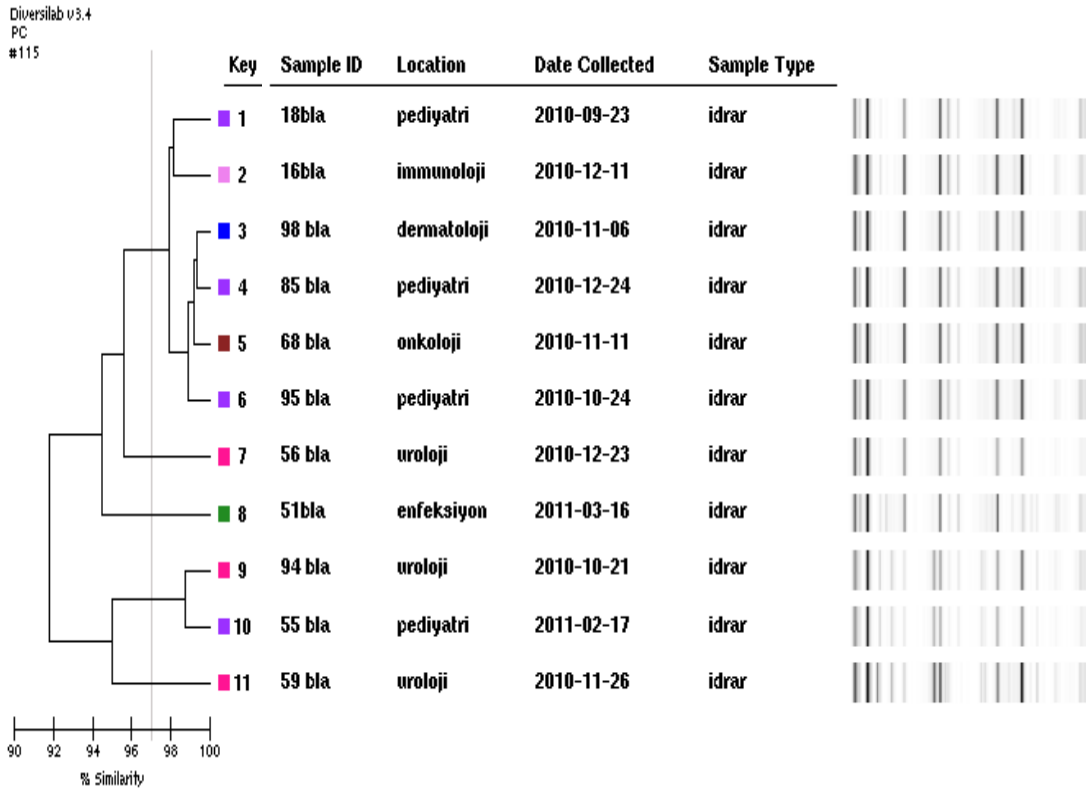


Şekil. 4.13. Ana Klon I Dendogram

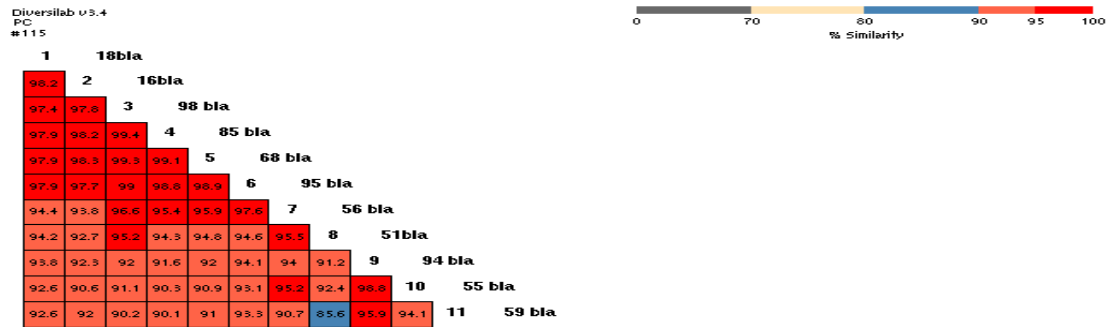
Diversilab v3.4
PC
#114



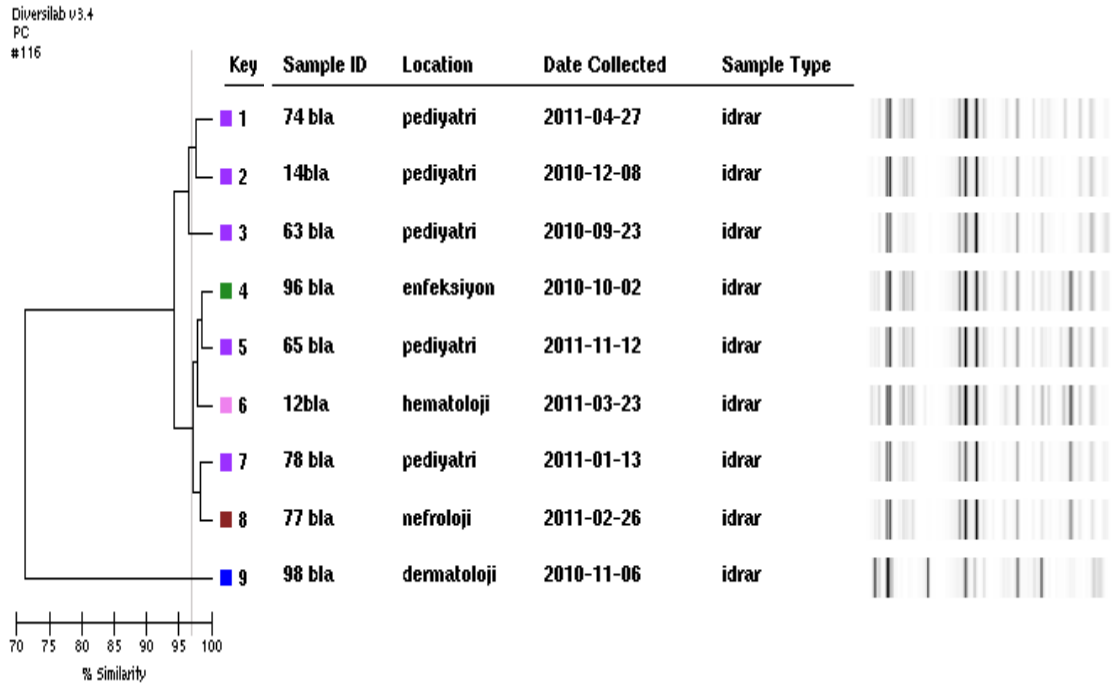
Şekil 4.14 . Ana klon I Benzerlik Matriksi



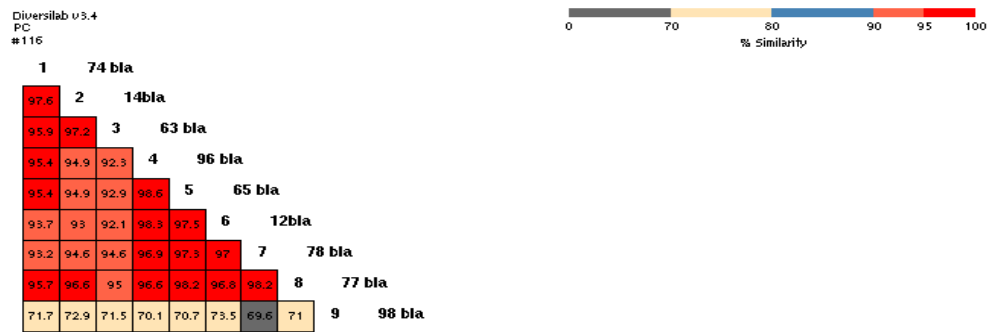
Şekil 4.15. Ana klon II Dendrogram



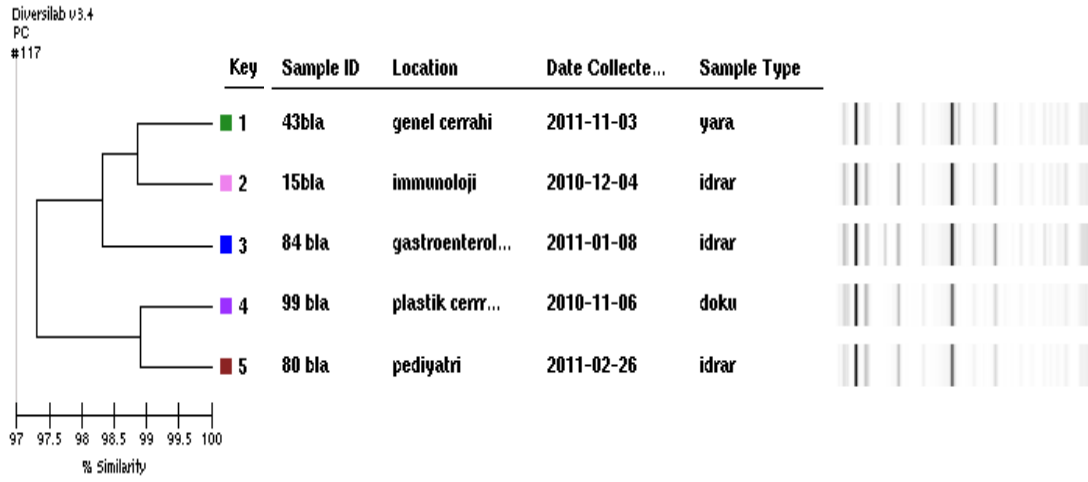
Şekil 4.16. Ana Klon II Benzerlik Matrisi



Şekil 4.17. Üçüncü Klon Dendogram



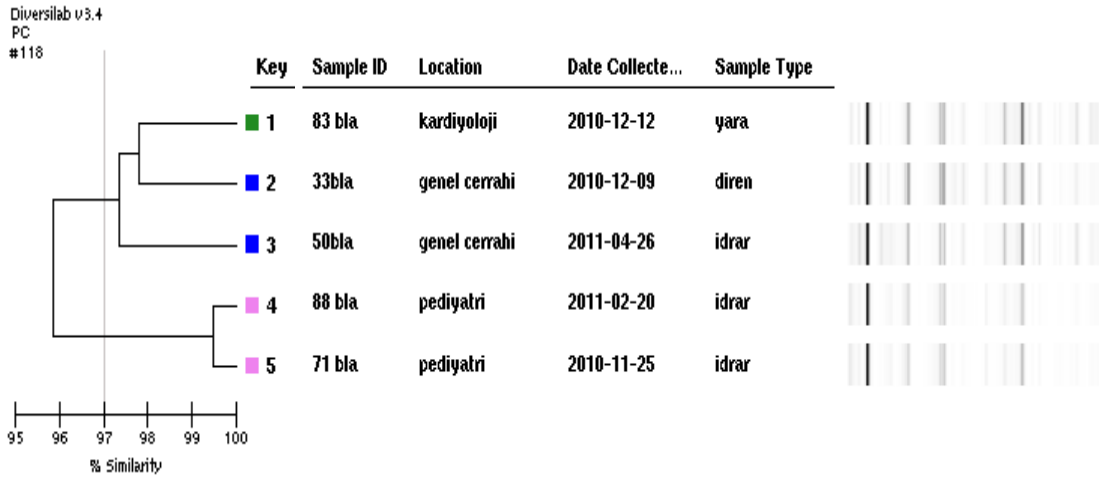
Şekil 4.18. Üçüncü Klon Benzerlik Matrisi



Şekil 4.19. Dördüncü Klon Dendogram



Şekil 4.20. Dördüncü Klon Benzerlik Matrisi



Şekil 4.21. Beşinci Klon Dendogram



Şekil 4.22. Beşinci Klon Benzerlik Matrisi

Çizelge 4.9. Aynı Klonda Yer Alan Suşların Antibiyotik Duyarlılık Profilleri

Örnek No	AMP	AMC	CZ	CXM	FOX	CAZ	CRO	FEP	IPM	MEM	AK	GN	CIP	LEV	OFX	SXT	REP PZR
10	R	I	R	R	S	R	R	R	S	S	I	S	R	R	R	R	Ana Klon I
9	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	I	S	R	R	R	R	Ana Klon I
3	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	I	S	R	R	R	R	Ana Klon I
25	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	I	S	R	R	R	R	Ana Klon I
24	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	I	S	R	R	R	R	Ana Klon I
93	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	I	S	R	R	R	R	Ana Klon I
54	R	I	R	R	S	R	R	R	S	S	I	S	R	R	R	R	Ana Klon I
66	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	I	S	R	R	R	S	Ana Klon I
42	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	I	S	R	R	R	R	Ana Klon I
29	R	I	R	R	S	R	R	R	S	S	I	S	R	R	R	R	Ana Klon I
82	R	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Ana Klon I
81	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	I	S	R	R	R	R	Ana Klon I
97	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	I	S	R	R	R	R	Ana Klon I
57	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	I	S	R	R	R	R	Ana Klon I
61	R	I	R	R	S	R	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	Ana Klon I
47	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	I	S	R	R	R	R	Ana Klon I
46	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	I	S	R	R	R	R	Ana Klon I
22	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	I	S	R	R	R	R	Ana Klon I
8	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	Ana Klon I

Çizelge 4.9. (Devam) Aynı Klonda Yer Alan Suşların Antibiyotik Duyarlılık Profilleri

Örnek No	AMP	AMC	CZ	CXM	FOX	CAZ	CRO	FEP	IPM	MEM	AK	GN	CIP	LEV	OFX	SXT	REP PZR
18	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	Ana Klon II
16	R	I	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Ana Klon II
98	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	Ana Klon II
85	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Ana Klon II
68	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Ana Klon II
95	R	I	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	Ana Klon II
56	R	I	R	R	S	R	R	R	S	S	I	S	R	R	R	S	Ana Klon II
51	R	I	R	R	R	R	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	Ana Klon II
94	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Ana Klon II
55	R	I	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	Ana Klon II
59	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	Ana Klon II
74	R	S	R	R	I	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Üçüncü Klon
14	R	S	R	R	I	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Üçüncü Klon
63	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	Üçüncü Klon
96	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Üçüncü Klon
65	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	Üçüncü Klon
12	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Üçüncü Klon
78	R	I	R	R	I	R	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	Üçüncü Klon
77	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	Üçüncü Klon
43	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	Dördüncü Klon

Çizelge 4.9. (Devam) Aynı Klonda Yer Alan Suşların Antibiyotik Duyarlılık Profilleri

Örnek No	AMP	AMC	CZ	CXM	FOX	CAZ	CRO	FEP	IPM	MEM	AK	GN	CIP	LEV	OFX	SXT	REP PZR
15	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Dördüncü Klon
84	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	Dördüncü Klon
99	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	Dördüncü Klon
80	R	I	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	Dördüncü Klon
33	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	I	R	R	R	R	S	Beşinci Klon
50	R	I	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Beşinci Klon
71	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	Beşinci Klon
83	R	I	S	R	S	R	R	R	S	S	I	R	R	R	R	S	Beşinci Klon
88	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	Beşinci Klon

5. TARTIŞMA

Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler, idrar yolu, intraabdominal, deri-yumuşak doku enfeksiyonları ve pnömoni gibi önemli nozokomiyal enfeksiyonlardan sorumlu mikroorganizmalardır. Bu grupta yer alan *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarının toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlarda en sık rastlanılan mikroorganizmalar olduğu bildirilmektedir. Günümüzde bu mikroorganizmalarda çoklu antibiyotik direncinin görülmesi tedavide yaşanan en önemli sorunlardan biri haline gelmiştir. Özellikle beta laktam ve kinolon grubu antibiyotiklere karşı direncin yanı sıra karbapenem grubu antibiyotiklere de direncin yaygınlaşması sorunun boyutunu arttırmaktadır (4).

Beta laktamaz üretimi sonucu oluşan direnç Gram negatif bakterilerde en önemli direnç mekanizmalarından biridir. GSBL'ler, Gram negatif çomaklarda bulunan, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama karşı dirençten sorumlu olan enzimlerdir. Beta laktam direncinin özellikle *Klebsiella* türleri ve *Escherichia coli* başta olmak üzere, patojen bakteriler arasında hızla yayılımı, son yıllarda tedavide ciddi sorunlar oluşturmaktadır (6). Günümüzde GSBL prevalansı ülkeden ülkeye değişmektedir. Araştırmacılar tarafından farklı ülkelerde hasta izolatlarında yapılan çalışmalarda, *E. coli* ve *Klebsiella spp.*'de saptanan en yüksek GSBL oranlarının Hindistan (\geq %80) ve Çin'de (\geq %60) olduğu bildirilmiştir (81,82). Bu oranlar Doğu ve Güneydoğu Asya, Latin Amerika, ve Güney Avrupa'da \geq %30'iken Avusturalya, Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'da %5-10 olarak bulunmuştur (83). Bazı araştırmacılar Hindistan'da toplum ve hastane kaynaklı *E. coli* izolatlarında GSBL prevalansının bu kadar yüksek olmasının nedenleri olarak, gereksiz antibiyotik kullanımı, ülkedeki alt yapı yetersizliği ve su kaynaklarının atık sularla kontamine olmasını bildirmişlerdir (84).

Plazmid ile kodlanan, TEM, OXA ve SHV tipi beta laktamazların dışında, CTX-M, VEB, PER, GES, TLA ve BES yeni tanımlanmış GBSL türleridir (74). CTX-M grubu beta laktamazlar, ilk kez 1986 yılında Matsumoto ve arkadaşlarının beta-laktam antibiyotiklerin farmakokinetik çalışmaları esnasında bir laboratuvar deney hayvanının dışkı florasında sefotaksime dirençli *E.coli* suşundan TEM veya SHV olmayan FEC-1

adını verdikleri bir beta-laktamaz saptamaları ile ortaya çıkmıştır (85). O dönemden günümüze kadar 54 adet farklı CTX-M enzimi gösterilmiştir (74,86). Günümüzde tanımlanmış 200'den fazla GSBL mevcuttur ve gün geçtikçe yenileri listeye eklenmektedir (53). Bir klinik izolat aynı anda birden çok GSBL türünü taşıyabilir. Ülkemizden yapılan birçok çalışmada GSBL sıklığı merkezler arasında farklılık göstermekte olup bu oran *K. pneumoniae* suşlarında %50-75, *E. coli* suşlarında da %1-15 arasında değişmektedir (Çizelge 5.1). Yapılan bu çalışmalarda GSBL oranlarının birbirinden farklı olmasına neden olarak hastanelerdeki antibiyotik kullanım politikaları ve bu merkezlerdeki yatan ve ayakta tedavi gören hasta sayısındaki farklılıklar gösterilmiştir (87-94).

Çizelge 5.1. GSBL Üretimi İle İlgili Türkiye’de Yapılmış Çalışmalar

Kaynak	Bölge	İzolasyon Yılı	İncelenen Bakteriler	GSBL oranı (%)
Demirdağ K ve ark. 2001	Elazığ	2000	<i>E. coli</i> (65)	10 (%15)
			<i>Klebsiella pneumoniae</i> (42)	28 (%67)
Kandemir O ve ark. 2002	Mersin	2000-2001	<i>E. coli</i> (30)	5 (%16,6)
			<i>Klebsiella spp.</i> (14)	2 (%14)
Delialioğlu N ve ark. 2005	Mersin	2004	<i>E. coli</i> (514)	94 (%18,3)
			<i>K. pneumoniae</i> (175)	52 (%29,7)
			<i>K. oxytoca</i> (24)	1 (%4,2)
Aydemir H ve ark. 2006	Ankara	2004-2005	<i>E. coli</i> (137)	37 (%27)
			<i>K. pneumoniae</i> (38)	7 (%18,4)
Güler Ö ve ark. 2008	Erzurum	2005-2006	<i>E. coli</i> (870)	91 (%10,5)
			<i>Enterobacter spp.</i> (343)	35(%10,2)
			<i>Pseudomonas spp.</i> (332)	9 (%2,7)
			<i>Acinetobacter spp.</i> (166)	8 (%4,8)
Gür D ve ark. 2009	Ankara	2007	<i>E. coli</i> (438)	184 (%42)
			<i>K. pneumoniae</i> (444)	184 (%41,4)
Duman Y ve ark. 2010	Malatya	2009-2010	<i>E. coli</i> (2549)	
			Yatan hasta 1712	471 (%27,5)
			Ayakta hasta 747	104 (%13,9)
Akyar I ve ark. 2010	İstanbul	2004-2008	<i>E. coli</i> (15434)	1687 (%10,9)
			<i>Klebsiella</i> (3178)	432 (%13,6)
Baykal A ve ark. 2012	Ankara	2001-2009	<i>E. coli</i> (99)	26 (%26,2)
			<i>K. pneumoniae</i> (114)	70 (%61,4)

Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz saptanmasında en çok kullanılan fenotipik yöntemler arasında E-test, çift disk sinerji (ÇDS) testi, üç boyutlu test, dilüsyon yöntemleri ve otomatize sistemler bulunmaktadır (95). Çalışmamızda GSBL tespiti için fenotipik tarama testleri olarak, çift disk sinerji testi, E-test ve kombine disk difüzyon

testi kullanıldı. CLSI tarafından GSBL doğrulanması için kombine disk difüzyon testi önerilmektedir. Dünya genelinde çeşitli yöntemlerle yapılan çok merkezli çalışmalarda farklı coğrafik bölgelerde *E. coli* suşlarında GSBL üretiminin %1-74 arasında değiştiği bildirilmektedir (42). Bu konuda ülkemizde ve dünyada da yapılmış pek çok çalışma vardır. Ülkemizdeki çalışmalarda; Abacıoğlu ve ark. (96) 24 *K. pneumoniae* kökeninde ÇDS yöntemiyle %60'ında, E-test yöntemiyle %50'sinde GSBL varlığını saptamışlardır. ÇDS yönteminin E-test yöntemine göre daha ucuz, duyarlı ve uygulanabilir olduğu sonucuna varmışlardır. Yine benzer bir çalışmada, Aktaş ve ark. Gram-negatif bakterilerde GSBL varlığını E-test ve ÇDS yöntemleriyle karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar iki yöntem arasında GSBL saptamada anlamlı bir fark olmadığını ve ÇDS yönteminin daha ucuz olması nedeniyle rutin laboratuvar uygulamaları için daha uygun olduğunu bildirmişlerdir (87). Akçam ve ark. (97) hastane enfeksiyonu etkeni Gram negatif bakteriler üzerinde E-test ve ÇDS yöntemlerini karşılaştırmışlar ve sırasıyla kökenlerin %14,8 ve %16,3'ünde GSBL varlığı saptamışlar ve iki yöntem arasında anlamlı bir fark bulmamışlardır. Yurt dışında yapılan benzer çalışmalardan birinde Vercauteren ve ark. (95) GSBL ürettiği bilinen 33 kökende GSBL varlığını ÇDS testi ile %96,9 ve E-test ile %81 oranında saptamışlar, her iki yöntemin de duyarlılığının benzer olduğunu vurgulamışlardır. Tseng ve ark. (98) GSBL saptamada agar dilüsyon, E-test ve ÇDS yöntemlerini bir arada kullanmışlar ve yöntemlerin güvenilirliğini benzer bulmuşlardır. E-test yönteminin ÇDS yöntemine göre daha güvenilir olduğunu belirten çalışmalar da mevcuttur. Palasubramaniam ve ark. (99) seftazidim dirençli *K. pneumoniae* kökenlerinde GSBL varlığını çift disk sinerji, inhibitör etkili disk difüzyon ve E-test yöntemleri kullanarak araştırmışlardır. E-test yönteminin GSBL saptanmasında en etkin yöntem olduğu sonucuna varmışlardır. Ülkemizde Zarakolu ve ark. (100) GSBL varlığını farklı fenotipik yöntemler kullanarak değerlendirmişler ve E-test yönteminin ÇDS yöntemi ve kombine disk sinerji testlerine göre daha duyarlı olduğunu bulmuşlardır.

Çalışmamızda toplam 109 *E. coli* suşunda; CLSI tarafından önerilen kombine disk difüzyon testinde 108'inde GSBL pozitifliği saptanırken, ÇDS ile 107 suшта, E-test ile 102 suшта GSBL pozitifliği tespit edilmiştir. Bu suşların tamamında moleküler yöntemle GSBL enzimleri tespit edilmiştir. Çift diskle kombine disk difüzyon test sonuçlarının uyumlu olduğu ancak E-testle uyumsuz olduğu görülmektedir. Toplam 24

adet *K. pneumoniae*'de ise kombine disk difüzyon testinde 23, ÇDS testi ile 23 ve E-test ile 22 suşta GSBL pozitifliği saptanmıştır. Bu suşların moleküler yöntemle GSBL enzimleri 23 suşta tespit edilmiştir. Testlerin uyumlu olduğu görülmektedir. Rutin laboratuvarında kullanım kolaylığı ve ucuz olması sebebiyle ÇDS veya kombine disk difüzyon testleri kullanılabilir.

1990'ların sonuna kadar saptanan GSBL'lerin çoğunluğu hastane kaynaklı TEM ve SHV tipi enzimler oluştururken, son yıllarda toplum kaynaklı CTX-M tipi GSBL'lerde artmıştır (52). Toplum kaynaklı idrar yolu enfeksiyonlarından izole edilen *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde özellikle de *E. coli*'de baskın olan CTX-M tipi GSBL'ler Güney Amerika, Asya ve Avrupa olmak üzere tüm dünyada giderek yaygınlaşmaktadır (6). Başta plazmidler olmak üzere hareketli genetik elemanların dağılımı ve spesifik klonların yayılımı GSBL üreten izolatların artışından sorumludur (4). Son on yıl boyunca baskın olarak tespit edilen CTX-M tipi GSBL'lerin yanı sıra dünya genelinde diğer GSBL tiplerinin de (PER-1, VEB-1, GES) arttığı bildirilmiştir (58). İranda yapılan bir çalışmada, sekiz aylık sürede toplanan 111 *E. coli* izolatının 37'sinde (%33,3) GSBL aktivitesi saptanmış olup, suşların 35'i (%94,6) CTX-M tipi, 21'i (%56,8) TEM ve beşi (%13,5) SHV tipi beta laktamazları taşımaktadır. Bu oranlar GSBL prevalansının daha yüksek olduğu, Latin Amerika (%30-60), Türkiye (%58), ve Hindistan'dan (%56) düşük olmakla birlikte Kore, Japonya ve Malezya'ya göre (%5-8) yüksektir (101).

Hansen ve ark. (102) Danimarka'da yaptıkları çok merkezli bir çalışmada, 18259 hastanın kan ve 47504 hastanın idrar örneklerinden izole edilen GSBL pozitif 352 *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *Proteus mirabilis* suşunda ağırlıklı olarak CTX-M 15, SHV, OXA ve TEM tipi beta laktamazları saptamışlardır. İspanya'da Alegria ve ark. (2), GSBL pozitif 162 *K. pneumoniae* suşunun 76'sında (%67) CTX-M, 31'inde (%27) SHV ve 6'sında (%5) TEM tipi beta laktamazları, Chong ve ark. (9) ağırlıklı olarak CTX-M grup 2, TEM ve SHV tipi beta laktamazları, Diaz ve ark.(10) CTX-M-14 (119 izolat), SHV-12 (68 izolat), CTX-M-15 (37 izolat) ve CTX-M-9 (21 izolat) tipi beta laktamazları, Pitout ve ark. (103), Kanada'da CTX-M 14 tipi beta laktamazları, Fankhauser ve ark. (104), CTX-M 15 tipi beta laktamazları yaptıkları çalışmalarda bildirmişlerdir. Galas ve ark.(105) tarafından Fransa'da 88 hastanede 10872 *Enterobacteriaceae* izolatında yapılan çalışmada 169 (%1,7) izolatın GSBL ürettiği

saptanmıştır. Bu izolatlar sırasıyla *E. coli* (%48.5), *Enterobacter aerogenes* (%23.7) ve *Klebsiella pneumoniae* (%14.8) olup CTX-M grup 1 enzimi bu suşlarda yaygın olarak belirlenmiştir (101). Dünya genelinde yapılan diğer çalışmalarda da CTX-M 15 tipi beta laktamazlar yaygın olarak saptanmıştır (74, 75, 106, 107, 108, 109). Bu sonuçlara paralel olarak ülkemizde yapılan bir çalışmada GSBL pozitif 1640 *Enterobacteriaceae* izolatında CTX-M grup 1, CTX-M grup 2 ve CTX-M grup 9 enzimleri saptanmıştır (110). Ayrıca Gülan ve ark. (111) genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üreten 310 *E. coli* suşunun 30'unda (%9,6) CTX-M-15, 14'ünde (%4,1) CTX-M-14 tipi beta laktamazları saptamış olup, bu çalışmada CTX-M-14 tipi beta laktamazlar ülkemizde ilk kez bildirilmiştir.

Bu çalışmada da dünyada yapılan diğer çalışmalarla benzer olarak 133 izolatın 114'ünde (%85) CTX-M 1, 3 ve 15 alt gruplarının yer aldığı CTX-M grup 1 enzimi saptanmıştır. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak plazmid kaynaklı beta laktamazlar içerisinde ağırlıklı olarak TEM (%32,1), OXA (%32,8), TEM/OXA tipi beta laktamazlar tespit edilirken geri kalan izolatların birinde hem TEM hem SHV tipi beta laktamazlar, dört izolatta (%3) CTX-M grup 9, altı izolatta (%4,5) CTX-M grup 1 ve 9, tipi beta laktamazlar tespit edildi.

Tüm dünyada sık rastlanan GSBL tipi beta-laktamazların yanı sıra AmpC tipi beta-laktamaz bildirimini de gittikçe artmaktadır (15, 17, 112). Özellikle GSBL tarama testi pozitif çıkan ancak CLSI'nin doğrulama testine göre negatif çıkan izolatların sayısının %75'e ulaştığı bildirilmektedir (15). Hastane enfeksiyonlarını kontrol edebilmek için AmpC tipi beta-laktamazların saptanması önemlidir. İndüklenebilen plazmid aracılı AmpC enzimler tıpkı kromozomal AmpC enzimleri gibi hastadan ilk izole edildiğinde üçüncü kuşak sefalosporinlere duyarlı bulunduğu halde bu ilaçlar klinikte kullanıldığında dereprese mutantlar oluştuğu için tedavi başarısız olmaktadır. Ancak 2011 CLSI'de bu tip beta laktamazların saptanması için herhangi bir yöntem önerilmemiştir (68). 29 farklı plazmid aracılı AmpC beta-laktamazi kodlayan 29 adet gen bölgesi, 6 grupta (CIT, EBC, ACC, DHA, MOX, FOX) toplanmıştır (74). Amerika'da 189 *K. pneumoniae* kan izolatı ile yapılan çalışmada, 28 sefoksitine duyarlı olmayan izolatın sadece üçünde FOX-5, ikisinde ACT-1 saptanmış olup bu izolatların hepsi karbapeneme duyarlı bulunmuştur (16). ABD'de 2004'te 752 dirençli ve plazmid kökenli ampC geni taşıyan izolat ile yapılan çalışmada en sık ACT-1 ve FOX-5 bölgesi

tespit edilmiştir (7). Çin’de yapılan bir çalışmada 2003-2005 yılları arasında sefoksitin dirençli 1935 adet *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca* izolatında plazmid kaynaklı AmpC beta-laktamaz enzim prevalansını %2.79 olarak bildirmişlerdir. Çalışmada araştırmacılar, 29 *K. pneumoniae* izolatında DHA-1 saptanırken bir izolatta CMY-1, *E. coli* izolatlarının 11’inde DHA-1, 12 izolatta CMY-2 ve bir *K. oxytoca* izolatında DHA-1 gen bölgelerini bulmuşlardır (82). Ülkemizde bu konuda yapılmış olan çalışma sayısı sınırlıdır. Bal ve ark.(78) tarafından 14 hastada *K. pneumoniae* suşlarında plazmid kaynaklı CMY-2 enziminin varlığı bildirilmiştir. Demirbakan ve ark. (86) tarafından yapılan çalışmada sefoksitine azalmış duyarlılık gösteren veya dirençli bulunan *E.coli* izolatlarının %74 (2/27)’ünde CMY-2 benzeri enzim saptanmıştır. Coşkun ve ark (50), sefoksitine dirençli 50 izolatın 22 (%88)’sini multipleks PZR ile pozitif olarak saptamışlardır. PZR ile AmpC pozitif bulunan izolatların hepsinin CIT (CMY-2 ile CMY-7 arası, LAT-1 ile LAT-7 arası ve BIL-1 AmpC beta-laktamazların bulunduğu grup) ailesine ait AmpC tipi beta-laktamazlar olduğu bildirilmiştir. Bu izolatların birinde hem CIT hem de EBC tipi AmpC enzim, birinde de CIT ve MOX’un birlikte olduğu görülmüştür. Çalışmamızda AmpC tip beta laktamazı kodlayan gen bölgeleri 133 izolatın tamamında tarandı. Bunlar içerisinde sadece iki *E. coli* izolatında (%1,8) LAT gen bölgesi pozitif olarak bulundu. İzolatların sefoksitin zon çapı ≤ 18 mm belirlendi. Bu izolatların her ikisinde ayrıca CTX-M grup 1 tipi beta laktamaz, bir izolatta hem TEM hem OXA tipi beta laktamaz, bir izolatta hem OXA hem de KPC tipi beta laktamazlar saptandı.

ABD ve Avrupa’dan yapılan çalışmalarda enterik bakterilerde metallobeta-laktamaz ve *K. pneumoniae* karbapenemaz (KPC) aracılı karbapenem direncinin oldukça büyük sorun oluşturduğu bildirilmektedir (113-115). KPC ailesinin ilk üyesi yoğun bakımda antimikrobiyal direncin araştırıldığı epidemiyolojik (intensive care antimicrobial resistance epidemiology (ICARE) surveyans çalışmasında ABD’nin Kuzey Carolina eyaletinde bir *K. pneumoniae* suşundan 1996’da elde edilmiştir. KPC beta laktamazlar çoğunlukla *K. pneumoniae*’de bulunsa da *E. coli*, *Enterobacter* ve *Salmonella* türlerinde de saptandığı bildirilmektedir (116). Metallobeta-laktamaz enzimler ise sıklıkla non fermentatiflerde bulunmakla birlikte, enterik bakterilerde de bildirilmektedirler. En sık görülen metallobeta-laktamazlar VIM, IMP, SIM ve GIM enzim aileleridir. VIM ve IMP dünya çapında en sık belirlenen metallobeta-laktamaz

ailesi üyeleridir (113). Hidron ve ark. (116) tarafından 2008 yılında yapılan çok merkezli çalışmada, karbapenem direnci *E. coli* suşları için %0,9-4, *K. pneumoniae* suşları için %3,6-10,8, *Klebsiella oxytoca* için %0-5 arasında bildirilmiştir. Avrupa'da Yunanistan ve İtalya'da EARRS verilerine göre karbapenem direnci *E. coli* suşları için % 0, *Klebsiella spp.* suşları için %0,6 olarak belirtilmiştir (117).

Ülkemizde 2000-2003 yılları arasında dokuz merkezin katıldığı MYSTIC çalışmasının sonuçlarına göre enterik Gram negatif bakterilerin meropenem %99,3, imipenem %97,6 duyarlılık gösterdiği bildirilmiştir (118). Yine, 2007 yılında yapılan çok merkezli HİTİT-2 çalışmasının sonuçlarına göre *E. coli* suşlarında karbapenem direnci gözlenmezken, *K. pneumoniae* suşlarında imipenem direnci %3,2 olarak belirlenmiştir (22). EARRS-2008 çalışması ise Türkiye'de karbapenem direncinin %1-5 arasında olduğunu bildirmiştir (119). Ayrıca OXA ve PER-1 tipi GSBL'leri bildiren ilk ülkelerden biri Türkiye'dir (62, 120). Kuzucu ve ark. (121) GSBL pozitif 239 *E.coli*, 28 *Klebsiella pneumoniae* ve 11 *Klebsiella oxytoca* suşunu konvansiyonel yöntemlerle çalışmışlardır. Çalışmada iki *E. coli*, bir *K. oxytoca* ve bir *K. pneumoniae* suşunda karbapenem direnci saptanmıştır. Son yıllarda ülkemizde karbenem dirençli *E. coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarına rastlanması nedeniyle GSBL pozitif izolatlarda karbapenem direncinin araştırılması gerektiği bildirilmiştir (23). Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada, karbapenem dirençli iki *K. pneumoniae* izolatında moleküler yöntemlerle OXA-48 ve KPC gen bölgeleri saptanmıştır (122). Yaptığımız çalışmada karbapenem direnci saptanan iki izolat hastanemizde bu direncin görüldüğü ilk suşlar olup, iki izolatta KPC (%1,5), iki izolatta PER (%1,5), iki izolatta OXA-48 (%1,5) ve bir izolatta VIM (%0,75) tipi beta laktamazlar tespit edildi.

Plazmitler aracılığı ile beta-laktamlar, makrolitler, aminoglikozitler gibi birçok antibiyotik grubuna direnç geliştiği bilinmekle birlikte, 1998 yılına kadar kinolon grubu antibiyotiklere plazmitler aracılığı ile direnç gelişebileceği kesin olarak bilinmiyordu (8,9). Kinolonlar bakterisidal etkili kemoteropatik ajanlar olup hem Gram pozitif hem Gram negatif bakterilere etkilidirler. ABD'de çoklu antibiyotik direncine sahip bir *K. pneumoniae* suşunda plazmit aracılı kinolon direncine neden olan *qnr* (quinolon resistance) geninin saptanmasının ardından bu konuda yapılmış çalışmalar dünya genelinde hızla artmıştır (123). Ülkemizde ise 2005 yılında yapılan bir çalışma ile plazmit aracılı kinolon direnci ilk kez gösterilmiştir (12). Özellikle son 30 yılda hayvan

ve insan kaynaklı izolatlarda kinolon direnci artmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, kinolon direncinin hızlı artışı ve yayılmasının sebebi olarak direnç genlerinin plazmide bağlı aktarımına bağlı olabileceğini göstermiştir. Bugüne kadar plazmid aracılı kinolon direnciyle ilgili yapılan çalışmalarda *qnrA*, *B,C,S*, *aac(6')-Ib-cr* ve *qepA* olmak üzere altı gen bölgesi tanımlanmıştır (20,78).

Ülkemizde 2005 yılında yapılan bir çalışmada, 49 izolatta *qnrA* gen bölgesi araştırılmış ve bir *E. cloacae* bir de *C. freundii* izolatında *qnrA* geni tespit edilmiştir (12). Öktem ve ark. (13) tarafından yapılan çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen 356 *Enterobacteriaceae* üyesinde *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS* genlerinin varlığı araştırılmış, 61 izolatta *qnrA*, 3 izolatta *qnrS* geni saptanmıştır. *qnrA* saptanan izolatların ikisinin ve *qnrS* saptanan izolatların birinin GSBL pozitif olduğu gözlenmiştir. Aktepe ve ark. (79) yaptıkları çalışmada *aac(6')-Ib-cr* gen oranını %59,8 olarak saptanırken diğer gen bölgelerine rastlanmamıştır. Ayrıca bu gen bölgesine sahip suşların %86,6'sının GSBL üreten suşlar olduğu bildirilmiştir. Nazik ve ark. (14) yoğun bakım hastalarından izole edilen toplam 460 Gram negatif bakteride *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, 3 (%0,65) *E. cloacae* izolatının birinde *qnrB1*'yi ve ikisinde *qnrS1*'yi saptanmıştır. Türkiye'de farklı hastanelerden izole edilen ve toplam 248 *E. coli* ve *K.pneumoniae* izolatında *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* genlerinin sıklığının araştırıldığı bir çalışmada da, bir *K. pneumoniae* izolatında farklı plazmidler üzerinde *qnrB1* ve *aac(6')-Ib-cr* genleri saptanmıştır (15). Çoban ve ark. (22) tarafından Türkiye'de çok merkezli olarak yapılan çalışmada 19.010 izolat (18.624 *Salmonella* spp., 285 *E.coli*, 68 *Shigella* spp., 29 *K.pneumoniae*, 2 *C.freundii* ve 2 *Proteus mirabilis*) kinolon direnci açısından araştırılmış ve azalmış siprofloksasin duyarlılığı (MİK 0.12- 0.5 mg/L) gösteren ancak nalidiksik aside duyarlı olan 123 izolatta *qnr* genleri araştırılmış ve iki *Salmonella* spp. izolatında *qnrB*, 25 *Salmonella* spp. ve bir *E. coli* izolatında *qnrA*, dört *Salmonella* spp. izolatında *qnrS* gen varlığı saptanmıştır. Çalışmamızda, *qnrS* üç *E. coli* (%3,6) ve bir *K. pneumoniae* (%4,2) izolatında, *qnrB* bir *K. pneumoniae* (%4,2) izolatında, *qepA* bir *E. coli* (%0,91) izolatında belirlendi. *aac(6')-Ib-cr* gen bölgesi ise 82 *E. coli* (% 75,3), 15 *K. pneumoniae* (% 62,5) suşunda pozitif olarak saptandı. *qnrA* ve *qnrC* gen bölgelerine çalışmamızdaki izolatların hiç birinde saptanmadı. Çalışmamızda ağırlıklı olarak saptanan *aac(6')-Ib-cr* geni norfloksasin ve siprofloksasin gibi bazı kinolonların enzimatik inaktivasyonundan ve sonuçta duyarlılığın azalmasından sorumlu

tutulmaktadır. Kinolon direncinden sorumlu olan plazmit aracılı bu mekanizmaların tedavi dozlarındaki kinolon varlığında yüksek düzey direncin ortaya çıkmasını kolaylaştırdığı bildirilmektedir (12).

Çalışmamızda tek bir suşta aynı anda birden fazla kinolon gen direncinden sorumlu gen bölgesi iki *E. coli* ve bir *K. pneumoniae* izolatında tespit edildi. Bir *E. coli* izolatında *qepa*, *qnrS* ve *aac(6')-Ib-cr*, bir *K. pneumoniae* izolatında *qnrB* ve *aac(6')-Ib-cr*, yine bir *E. coli* izolatında hem *qnrS* hem de *aac(6')-Ib-cr* gen bölgeleri tespit edildi.

Çalışmamızdaki sonuçlarla uyumlu olarak ülkemizde daha önce yapılan araştırmaların çoğunda *qnrA*, *qnrB*, *qnr S* ve *qnrC* gen bölgeleri düşük oranda bildirilmiştir (79). Ülkemizde daha önce yapılan çalışmalarda *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS* gen bölgelerini taşıyan izolatların CTX-M, TEM, SHV ve OXA tipi beta laktamazlardan en az birini taşıdıkları belirlenmiştir (14). Çalışmamızda kinolon direnç genleri saptanan izolatların hepsinde CTX-M, TEM, OXA ve SHV tipi beta laktamazlardan en az birinin varlığı saptanmıştır. Frasson ve ark. (124) İtalya'da yaptıkları çalışmada, özellikle *aac(6')-Ib-cr* pozitif suşlarda florokinolon kullanımının tedavide başarısızlığa neden olabileceğini bildirmişlerdir.

Günümüzde bakterilerin klonal yakınlıklarının belirlenmesinde çeşitli PZR tabanlı yöntemler (AP-PZR, REP-PZR, ERIC-PZR) kullanılmaktadır (75). Nozokomiyal salgınlara belirlenmesinde rep-PZR yönteminin duyarlı, hızlı ve güvenilir olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Özellikle bu tip salgınlarda görülen çoklu ilaç direncine sahip *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi izolatların klonal ilişkilerinin belirlenmesinde rep-PZR'nin PFGE'ne alternatif olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir (75,125,126). Rokotohirina ve ark. (127) çoklu ilaç direnci olan 49 GSBL pozitif *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* ve *E. cloacae* izolatının 37'sinde (%75,5) blaCTX-M-15 ve 39'unda (%38,7) SHV-2 saptamışlardır. Bu izolatların büyük bir kısmının rep-PZR ile A1 grubunda yer aldığını bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada Rep-PZR Diversilab yöntemi ile tiplendirilen 100 *E. coli* izolatından ikisi ana klon (1 ve 2) olmak üzere toplam 5 farklı klon (1-5) elde edildi. 1. ana klon *E. coli*'lerin 19 (% 19)'nun toplandığı en büyük klon olup 2. ana klon 11 suş (%11) ile ikinci büyük klondur. Geri kalan diğer üç klonun dağılımına bakılacak olursa 3. klon 2 (%11)'şer suş; 4. ve 5. klon 5'şer (% 5) suştan oluşmaktadır. Her iki ana klondaki örneklerin ağırlıklı olarak geldiği servisler

pediyatri ve üroloji olup klonlardaki örneklerin, 11'i pediyatri, 19'u üroloji servisinden gelmiştir. Ana klonlardaki örneklerin 26'sı idrar, biri kan, ikisi yara ve biri dokudur. Özellikle 1. ana klondaki izolatların pediyatri servisinden mart ayında izole edilmesi ve saptanan gen bölgelerinin benzer olması dikkat çekicidir. Ana klonlardaki suşların hepsinde CTX-M Grup 1, TEM tipi beta laktamazlar görülmekte olup kinolon direnç geni olarak aac(6')1b saptandı. Buna göre ana klondaki suşların benzer direnç profilleri, direncin klonal yayılımının göstergesi olabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak GSBL oluşturma ihtimali olan izolatlar doğrulamak için CLSI'nın önerdiği kombine disk difüzyon testi yapılmıştır. Bu testin sonuçlarının ÇDS testi ile uyumlu olduğu görülmektedir. Rutin laboratuvarında GSBL tespitinde KDD ve ÇDS testinden biri tercih edilebilir. E- testin maliyetli olması ve değerlendirme güçlüğü ve diğer iki testle uyumsuz sonuçları sebebiyle kullanımı önerilmemektedir. Epidemiyolojik çalışmalar için hastanemizdeki suşların direnç genlerinin çalışılması önemlidir. Gram negatif enterik bakterilerde farklı direnç mekanizmalarının çeşitlilik kazanması ve direncin farklı bakteriler arasındaki aktarımı bu suşların tedavisini zorlaştırmaktadır. Özellikle hastane enfeksiyonlarında direncin klonal yayılımı ve nozokomiyal salgınların önüne geçilmesi için universal izolasyon prensiplerine uyulması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Klinik örneklerden (idrara, kan doku, abse ve yara) izole edilen 133 *Enterobacteriaceae* izolatının (109 *E. coli*, 24 *K. pneumoniae*) ağırlıklı olarak Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (%36,8) ve üroloji servisinden (%21,1) gelen örneklerden elde edildiği saptandı. Bu suşların antibiyotik duyarlılık test sonuçları incelendiğinde, suşların %99,25'i ampisilin, sefazolin, seftazidim ve sefepime, %98,5'u seftriaksona dirençli bulunmuştur. Suşların %99,25'i meropenem ve %98,5'u imipeneme duyarlı olarak tespit edildi. Çalışmamızda GSBL saptanmasında kullanılan fenotipik testlerin uyumlu olduğu görülmektedir. Rutin laboratuvarında kullanım kolaylığı ve ucuz olması sebebiyle çift disk sinerji veya kombine disk difüzyon testi GSBL'ların belirlenmesinde kullanılabilir.

Bu suşların tümünde moleküler yöntemle en az bir veya birden fazla GSBL aktivitesinden sorumlu gen bölgesi tespit edilmiştir. Bu izolatlarda ağırlıklı olarak CTX-M grup 1, TEM ve OXA tipi beta laktamazlar saptanmış olup elde edilen sonuçlar ülkemizde ve dünyada yapılan diğer çalışmalarla uyumludur. Kinolon direncinden sorumlu gen bölgeleri içerisinde *aac(6')-Ib-cr* gen bölgesi'nin ağırlıklı olarak saptanmasının (*E. coli* %75,3, *K. pneumoniae* %62,5) çoklu ilaç direncinin bir göstergesi olabilir. Çünkü bu suşlarda CTX-M, TEM, SHV ve OXA tipi beta laktamazlardan en az birini taşıdıkları belirlenmiştir. Çalışmamızda kullandığımız multipleks PZR yönteminin beta laktamaz ve karbapenem direncinden sorumlu çok sayıda gen bölgelerinin aynı zamanda araştırılmasını sağlamaktadır. Bu metodun epidemiyolojik çalışmalarda pratik ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılabileceği görülmektedir.

Çalışmamızda Rep-PZR Diversilab yöntemi ile tiplendirilen 100 *E. coli* izolatından elde edilen ana klondaki (1 ve 2) örneklerin ağırlıklı olarak geldiği servisler pediatri ve üroloji olup ana klonlardaki suşların hepsinde CTX-M Grup 1, TEM ve OXA tipi beta laktamazlar ve kinolon direnç geni *aac(6')Ib* saptandı. Her iki ana klondaki direnç profilindeki benzerlik direncin klonal yayılımının göstergesi olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle hastane enfeksiyonuna neden olan enterik bakterilerin

kökeninin araştırılması önemlidir. Daha sonraki yapılacak çalışmalarda enfeksiyonun kaynağı, taşıyıcıları ve yayılma yolu saptanarak uygun izolasyon önlemleri alınabilir.

Hastanemizde direnç genleri içeren enterik bakterilerin yayılımının önlenmesi için universal izolasyon önlemlerinin uygulanması ve özellikle ampirik antibiyotik kullanımında bu sonuçların göz önünde bulundurulması gereklidir. Ayrıca ülkemizde farklı bölgelerde hem GSBL epidemiyolojisini hem de enzimlerin yayılımını saptayabilmek için benzer çalışmaların yapılması önemlidir.

7. KAYNAKLAR

1. **Bilgehan H.** *Enterobacteriaceae*, Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 10. baskı, İzmir : Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi. **2000**:1-102.
2. **Pitout JD, Loupland KB.** Extended spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*, **2008**; 8 (3): 159–166.
3. **Gür D, Ünal S.** Resistance to antimicrobial agents in Mediterranean countries. *Int J Antimicrob Agents*, **2001**;17(1):21-26.
4. **Bradford PA.** Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*, **2001**; 14 (4): 933-951.
5. **Pfeifer Y, Cullik A, Witte W.** Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*, **2010**;300(6):371–379.
6. **Falagas ME, Karageorgopoulos DE.** Extended-spectrum b-lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect*, **2009**;73(4): 345-354.
7. **Kiratisin P, Henprasert.** Genotypic analysis of plasmid-mediated beta-lactamases amongst *Enterobacteriaceae* other than *Escherichia spp.* and *Klebsiella spp.* that are non-susceptible to broad-spectrum cephalosporin. *Int J Antimicrob Agents*, **2010**;36(4): 343-347.
8. **Courvalin P.** Plasmid-mediated 4-quinolone resistance: a real or apparent absence ?, *Antimicrob Agents Chemother*, **1990**;34(5):681-684.
9. **Li XZ.** Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms, *Int J Antimicrob Agents*, **2005**;25(6):453-63.
10. **Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA.** Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, **1998**;351(9105):797-799.
11. **Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC.** Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother*, **2003**;47(7):2242-2248.

12. **Nazik H, Poirel L, Nordmann P.** Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*, **2005**;49(5):2146-2147.
13. **Öktem MA, Biçmen M, Gülay Z.** Türkiye'den ilk qnrB olgusu, 8. Antimikrobik ve Kemoterapi Günleri. İstanbul. **2008**:29.
14. **Öngen B, Nazik H.** Investigation of plasmid mediated quinolone resistance among *Campylobacter* strains. *Farmacie Terapia*, **2008**;25(3-4):37-39.
15. **Poirel L, Gür D, Minarini L, Arslan U, Nordmann P.** Molecular epidemiology of plasmid mediated quinolone resistance determinants in extended spectrum beta-lactamase producing *E.coli* and *K.pneumoniae* isolates from Turkey. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelona, **2008**: 1527.
16. **Wibbenmeyer L, Danks R, Faucher L.** Prospective analysis of nosocomial infection rates, antibiotic use, and patterns of resistance in the burns population. *J Burn Care Res*, **2006**;27(2): 152-160.
17. **Roger AD, Argens AC, Rode H.** Ventilator-associated pneumoniae in major burns. *Ann Burns and Fire Disasters*, **2012**;25(3):135-139.
18. **Warren JW.** Catheter-associated urinary tract infections. *Infect Dis Clin North Am*, **1997**;11(3): 609-622.
19. **Wagenlehner FM, Naber KG.** Hospital-acquired urinary tract infections. *J Hosp Infect*, **2000**;46(3): 171-181.
20. **Orucu M, Geyik MF.** Yoğun bakım ünitesinde sık görülen enfeksiyonlar. *Düzce Tıp Fak Derg*, **2008**;1(1):40-43.
21. **Eraksoy H, Basustaoglu A, Korten V, Kurt H, Ozturk R, Ulusoy S, Yaman A, Yuce A, Zarakolu P.** Turkish MYSTIC Study Group Susceptibility of bacterial isolates from Turkey-a report from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Program. *J Chemother*, **2007**;19(6):650-657.
22. **Gür D, Haşcelik G, Aydın N.** Antimicrobial resistance in Gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 Surveillance Study of 2007. *J Chemother*, **2009**;21(4):383-389.
23. **Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA.** Tıbbi Mikrobiyoloji. 6. Baskı, Atlas Tıp Kitabevi. **2010**:301-315.

24. **Wu Q, Zhang Y, Han L, Sun J, Ni Y.** Plasmid-Mediated 16S rRNA Methylases in Aminoglycoside-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolates in Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother*, **2009**;53(1): 271-272.
25. **Lehman DC, Mahon CR, Kalavati S.** Streptococcus, Enterococcus, and other Catalase-negative Gram-positive Cocci. In: Mahon CR, Manuselis G, Lehman DC. Textbook of Diagnostic Microbiology. 3th ed. USA: Saunders Company. **2007**:382–409.
26. **Ustaçelebi S.** Enterobacteriaceae. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd.Şti. **1999**:471-517.
27. **Cengiz T.** *Enterobacteriaceae*. Tıp ve Diş Hekimliğinde Özel Mikrobiyoloji. 1. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti. **2004**:446-451.
28. **Doyle MP, Schoeni JL.** Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl Environ Microbiol*, **1984**;48(4):855-856.
29. **Panos GZ, Betsi GI, Falagas ME.** Systematic review: are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection?. *Aliment Pharmacol Ther*, **2006**;24(5): 731-742.
30. **Arslan H.** Toplum Kökenli Üriner Sistem Enfeksiyonlarından izole Edilen *Escherichia coli* Suşlarında Direnç Problemi. Klimik 2005 XII. Türk klinik mikrobiyoloji ve enfeksiyon hastalıkları kongresi. Ankara, **2005**:40-41.
31. **Jacoby G, Han P, Tran J.** Comparative in vitro activities of carbapenem L-749, 345 and other antimicrobials against multidrug-resistant gram negative clinical pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*, **1997**;41(8):1830.
32. **Aladağ MO, Durak Y.** Üriner Sistem Enfeksiyonlarından İzole Edilen *Klebsiella pneumoniae*'lerin Bazı Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *Fırat Sag Hiz Derg*, **2007**;2(4):40-50.
33. **Pais P, Khurana R, George, J.** Urinary Tract Infections: A Retrospective Survey of Causative Organisms and Antibiotics Prescribed in A Tertiary Care Setting. *Indian J Pharm*, **2002**; 34:278-280.
34. **Öncül O.** *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* enfeksiyonları ve tedavisi. Klimik 2007 XIII. Türk klinik mikrobiyoloji ve enfeksiyon hastalıkları kongresi. Ankara, **2007**:215-222.

35. **Gülay Z.** Gram negatif çomaklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası. *ANKEM*, **2005**;19(2):66-77.
35. **Ustaçelebi Ş.** Antimikrobiyal İlaçlar ve Etki Mekanizmaları. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. Baskı. Ankara:Güneş Kitabevi Ltd.Şti. **1999**:81-89.
36. **Cengiz T.** Antibiyotik ve Kemoteropatiklerin Etki Mekanizmaları I-II. Tıp ve Diş Hekimliğinde Özel Mikrobiyoloji. 1. Baskı. Ankara:Güneş Kitabevi Ltd. Şti.**2004**:246-266.
37. **Öncül O.** Akılcı antibiyotik kullanımı ve erişkinde toplumdan edinilmiş enfeksiyonlar. İÜ. Cerrahpaşa Tıp fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Sempozyum dizisi, **2002**;31: 23-38.
38. **Çalangu S.** Parenteral sefalosporinler. *ANKEM*, **2010**;24(2):14-18.
39. **Jones R, Baquero F, Privitera G, Inoue M, Weidemann B.** Inducible beta-lactamase mediated resistance to third generation cephalosporins. *Clin Microbiol Infect* ,**1997**;3(1):7-20.
40. **Opal SM, Pop-Vicas A.** Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (eds.) Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, **2010**:279-295.
41. **Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG.** The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Proc Natl Acad Sci*, **2002**;28 (99):7687-7692.
42. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, **1995**; 39(6): 1211-1233.
43. **Sili U, Mert A.** 1986'dan 2010'a beta laktamaz inhibitörleri. *ANKEM Derg*, **2010**;24(2):28-32.
44. **Lee NLS, Yuen KY, Kumana CR.** β -lactam antibiotics and β -lactamase inhibitor combinations. *JAMA*, **2001**;285(4):386-388.
45. **McManus MC.** Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Health Syst Pharm*, **1997**;54(12):1420-1433.
46. **Livermore DM.** Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*, **1995**;8(4): 557-584.
47. **Thompson KS, Moland ES.** Version 2000: The new beta-lactamases of gram-negative bacteria at the dawn of the millennium. *Microb Infect*, **2000**;2(10):1225-1235.
48. **Livermore DM.** Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect*, **2008**;14(5): 3-10.

49. **Gur D, Pitt TL, LMC, Akahn E, Livermore DM.** Diversity of *Klebsiella* with extended-spectrum β -lactamases at a Turkish university hospital. *J Hosp Infect*, **1992**;22(2):163-178.
50. **Coşkun S, Altanlar N.** AmpC beta laktamazlar. *ANKEM Derg*, **2012**;26(4):203-214.
51. **Paterson DL, Bonomo RA.** Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*, **2005**;18(4):657-686.
52. **Bush K, Jacoby G.** Nomenclature of TEM beta-lactamase. *J Antimicrob Chemoter*, **1997**; 39 (1):1-3.
53. Beta lactamase classification. Erişim:www.lahey.org/studies/web.htm, Erişim tarihi, 13.04.2012
54. **Coque TM, Baquero F, Canton R.** Increasing prevalence of ESBL producing *enterobacteriaceae* in Europe. *Eurosurveillance*, **2008**; 13(47):1-11.
55. **Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P.** Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. *Infect Genet Evol*, **2012**;12(5):883-93.
56. **Canton R, Gonzalez-Alba JM, Galan JC.** CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol*, **2012**;3(110):1-19
57. **Rodriguez MM, Power P, Radice M.** Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemoter*, **2004**;48(12):4895–4897.
58. **Bonnet R.** Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemoter*, **2004**;48(1):1–14.
59. **Hawkey PM, Jones AM.** The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemoter*, **2009**; 64 (1):3–10.
60. **Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL.** *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemoter* **2011**;66(1):1-14.
61. **Hernandez J, Stedt J, Bonnedahl J.** Human associated extended-spectrum β -lactamase in the Antarctic. *Appl Environ Microbiol*, **2012**;78(6):2056-2058.
62. **Hall LM, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE.** OXA-11, an extended spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemoter*, **1993**; 37(8):1637- 1644.
63. **Danel F, Hall LMC, Duke B, Gur D, Livermore DM.** OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemoter*, **1999**; 43(6): 1362-1366.

64. **Rasmussen JW, Hoiby N.** OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*, **2006**;57(3):373-383.
65. **Jacoby GA, Munoz-Price LS.** The new β -lactamases. *N Eng J Med*, **2005**; 352(4): 380-391.
66. Clinical Laboratory Standards Institute. *Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement*. CLSI. M02-A11 and M07-A9, **2012**:40-61
67. **Carter MW, Oakton KJ, Warner M, Livermore DM.** Detection of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiellae* with the Oxoid combination disk method. *J Clin Microbiol*, **2000**;38(11):4228–4232.
68. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-first Informational Supplement, CLSI Document M100-S20. CLSI,2011.
69. **Cormican MG, Marshall SA, Jones RN.** Detection of ex-tended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains by the E test ESBL screen. *J ClinMicrobiol* **1996**;34(8):1880–1884.
70. **Sanguinetti M, Posteraro B, Spanu T.** Characterization of clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Italy by the BD Phoenix extended-spectrum beta-lactamase detection method. *J Clin Microbiol*, **2003**;41(4):1463–1468.
71. **Hall MA, Fluit AC, Paauw A, Box AT, Brisse S, Verhoef J.** Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum beta-lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* *J Clin Microbiol*, **2002**;40(10):3703–3711.
72. **Raoult D, Fournier PE, Drancourt M.** What does the future hold for clinical microbiology?. *Nature Rev*, **2004**;2(2):454-459.
73. **Çetinkaya E, Ayhan K.** Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Derg*, **2012**;2(1):53-62.
74. **Dallenne C, Costa A, Decre D, Favier C, Arlet G.** Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*, **2010**;65(3): 490–495.
75. **Durmaz R.** Dirençli bakteriler arasında klonal ilişkinin belirlenmesi. *ANKEM*, **2007**;21(2):178-183.
76. **Deplano A, Denis O, Rodriguez VH, De Ryck R, Struelens MJ, Hallin M.** Controlled performance evaluation of the DiversiLab repetitive-sequence-based genotyping system for typing multidrug-resistant health care-associated bacterial pathogens. *J Clin Microbiol*, **2011**;49(10):3616-3620.

77. **Pitout JDD, Hamilton N, Church DL, Nordmann P, Poirel L.** Development and clinical validation of molecular diagnostic assay to detect CTX-M-type β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect Dis*, **2007**;13(3):291-297.
78. **Kim HM, Lee HJ, Park KS, Suh JT.** Molecular Characteristics of Extended Spectrum β -Lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and the Prevalence of qnr in Extended Spectrum β -Lactamase Isolates in a Tertiary Care Hospital in Korea. *Yonsei Med J*, **2010**;51(5):768-774.
79. **Aktepe OC, Aşık G, Çetinkol Y, Biçmen M. Gülay Z.** *Escherichia coli* suşlarında plazmide bağlı kinolon direncinin araştırılması. *Mikrobiol Bul*, **2012**;46(1):9-16.
80. **Jiang Y, Zhou Z, Qjan Y, Wei Z, Yunsong Y, Songnian H, Lanjuan L.** Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac (6')-Ib-cr in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother*, **2008**;61(5):1003-1006.
81. **Hoban DJ, Nicolle LE, Hawser S, Bouchillon S, Badal R.** Antimicrobial susceptibility of global inpatient urinary tract isolates of *E. coli*: results from the study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program: 2009-2010. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2011**;70(4):507-511.
82. **Hsueh PR, Badal RE, Hawser SP, Hoban DJ, Bouchillon SK, Ni Y, Paterson DL.** Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region: 2008 results from SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends). *Int J Antimicrob Agents*, **2010**;36(5):408-414.
83. **Livermore DM.** Current epidemiology and growing resistance of Gram negative pathogens. *Korean J Intern Med*, **2012**;27(2):128-142.
84. **Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA.** Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis*, **2011**;11(5):355-362.
85. **Bonnet R.** Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*, **2004**; 48(1):1-14.
86. **Demirbakan H, Midilli K, Oğunc D.** Sefoksitine dirençli ya da az duyarlı saptanan *Klebsiella spp.* ve *Escherichia coli* izolatlarında plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz enzim tiplerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, **2008**;42(4): 545-551.
87. **Güler Ö, Aktaş O, Uslu H.** Klinik örneklerden izole edilen bakterilerde beta laktamaz varlığının ve çeşitli antibiyotik gruplarına karşı duyarlılıklarının araştırılması. *Ankem Derg*, **2008**; 22(2):72-80.
88. **Demirdağ K, Kizirgil A, Özden M, Kalkan A, Felek S, Toraman ZA.** Hastane ve toplum kökenli *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığının araştırılması. *ANKEM Derg* **2001**; 15(49):748-752.

89. **Kandemir O, Ersöz G, Şahin E, Kaya A.** Hastanede Yatarak Tedavi Gören Hastalardan Soyutlanan Gram Negatif Bakterilerde Genişlemiş Spektrumlu ve induklenebilir Kromozomal Beta-laktamaz sıklığı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **2002**;32(3-4): 207-211.
90. **Delialioğlu N, Ocal ND, Emekdaş G.** Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz oranları. *ANKEM*, **2005**; 19(2): 84-87.
91. **Aydemir H, Yalçın A, Pişkin N, Gürbüz Y, Türkyılmaz R.** *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının Genişlemiş Spektrumlu β - Laktamaz Üretme ve *ANKEM*, **2006**; 19(2):63-68 63.
92. **Duman Y, Güçlüer N, Serindağ A, Tekerekoğlu MS.** *Escherichia coli* Suşlarında Antimikrobiyal Duyarlılık ve Genişlemiş Spektrumlu-Beta Laktamaz (GSBL) Varlığı. *Fırat Tıp Derg*, **2010**;15(4): 197-200.
93. **Baykal A, Coplu N, Şimşek H, Esen B, Gür D.** Kan İzolatı *E.coli* ve *K.pneumoniae* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz, KPC-Tip Karbapenemaz ve Plazmid Aracılı AmpC Beta-Laktamaz Varlığının Araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, **2012**;46(2): 159-169.
94. **Akyar I.** Antibiotic resistance rates of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* strains isolated from urinary tract infections in a private hospital. *Mikrobiyol Bul*, 2008;42(4):713-715.
95. **Vercauteren E, Descheemaeker P, Leven M, Sanders CC, Goossens H.** Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum betalactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in a Belgian Teaching Hospital. *J Clin Microbiol*, **1997**;35(9):2191-2197.
96. **Abacıoğlu YH, Yücesoy M, Gülay Z, Yuluğ N.** "Extended spectrum beta-lactamases" saptanmasında E testi ile çift disk sinerji yöntemlerinin karşılaştırılması. *İnfek Derg*, **1995**;9(1-2):93-95.
97. **Akçam FZ, Gönen İ, Kaya O, Yaylı G.** Hastane etkeni çeşitli Gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz yapımının iki yöntemle araştırılması. *KLİMİK Derg*, **2004**;17(1):47- 49.
98. **Tseng CY, Liu PY, Wu WL, Lau YJ, Hu BS, Shi ZY, Lin YH.** Comparison of detection of extended-spectrum beta-lactamases by agar dilution method, e-test esbl screen and double disk test. *J Microbiol Immunol Infect*, **1998**;31(2): 90-94.
99. **Palasubramaniam S, Parasakthi N.** Comparison of three different methods for the presumptive detection of ESBL production in ceftazidimeresistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Malays J Pathol*, **2001**; 23(2): 73-78.
100. **Zarakolu P, Metan G, Haşcelik G, Akova M.** Comparison of different phenotypic methods detecting extended spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Mikrobiyol Bul*, **2005**;39(3): 265-272.

101. **Moghaddam MN, Forghanifard MM, Moshrefi S.** Prevalence and Molecular Characterization of Plasmid-mediated Extended-Spectrum β -Lactamase Genes (alaTEM, blaCTX and blASHV) Among Urinary *Escherichia coli* Clinical Isolates in Mashhad, Iran. *Iranian J Basic Med Sci*, **2012**;15(3) 833-839.
102. **Hansen DS, Schamuer H, Hansen F.** Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) in Danish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Prevalence, β -lactamase distribution, phylogroups, and co-resistance. *Scandinavian J Infect Dis*, **2012**;44(3): 174–181.
103. **Alegria RC, Bano JR, Cano ME.** *Klebsiella pneumoniae* Strains Producing Extended-Spectrum β -Lactamases in Spain: Microbiological and Clinical Features. *J Clin Microbiol*, **2011**; 49(3):1134–1136.
104. **Diaz BA, Hernandez-Bello JR, Rodriguez-Bano J.** Diversity of *Escherichia coli* Strains Producing Extended-Spectrum β -Lactamases in Spain: Second Nationwide Study. *J Clin Microbiol*, **2010**;48(8): 2840–2845.
105. **Galas M, Decousser JW, Breton N, Godard T, Allouch PY, Pina P.** Nationwide Study of the Prevalence, Characteristics, and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in France. *Antimicrob Agents Chemother*, **2008**;52(2): 786-789.
106. **Edelstein M, Pimkin M, Palagin I.** Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*, **2003**;47(12):3724–3732.
107. **Empel J, Baraniak A, Literacka E.** Molecular survey of β -lactamases conferring resistance to newer β -lactams in *Enterobacteriaceae* isolates from Polish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*, **2008**;52(7): 2449–2454.
108. **Fam N, Leflon Gibout Vi Fouad S, Aboul-Fadl L, Marcon E, Desouky D, El-Defrawy I, Abou-Aitta A, Klana J, Nicolas-Chanoine MH.** CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Cairo (Egypt), including isolates of clonal complex ST10 and clones ST131, ST73, and ST405 in both community and hospital settings. *Microb Drug Resist*, **2011**;17(1):67-73.
109. **Yano H, Uemura M, Endo S.** Molecular Characteristics of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates from *Escherichia coli* at a Japanese Tertiary Hospital. *Plos One*, **2013**;8(5):1-6.
110. **Bayraktar B, Toksoy B, Bulut E.** Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üreten Gram negatif bakterilerde bla_{CTX-M} genlerinin araştırılması. *Microbiol Bul*, **2010**;44:187-196.
111. **Güran M, Akçimen B, Gökmen T, Yaman A, Köksal F.** Characterization of CTX-M type extended spectrum β -lactamases of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Southern Turkey: The first report of CTX-M-14 producing *Escherichia coli* from Turkey. *Afr J Microbiol Res*, **2013**;7(7): 551-556.

112. **Seral C, Gude MJ, Castillo FJ.** Emergence of plasmid mediated AmpC β -lactamasas: Origin, importance, detection and therapeutical options. *Rev Esp Quimioter*, **2012**;25(2):89-99.
113. **Queenan AM, Bush K.** Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*, **2007**;20(3):440-458.
114. **Prabaker K, Lin MY, McNally M.** Transfer from high-acuity long-term care facilities is associated with carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a multihospital study. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **2012**;33(12):1193-9.
115. **Canton R, Akova M, Carmeli Y.** Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect*, **2012**;18(5):413-31.
116. **Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK.** NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **2008**;29(11):996-1011.
117. Health protection surveillance center. Erişim: <http://www.hpsc.ie/hpsc/AZ/>, Erişim tarihi, 12.03.2013.
118. **Korten V, Ulusoy S, Zarakolu P, Mete B.** Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period (2000-2003) in Turkey: results of the MYSTIC Program. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2007**;59(4):453-7.
119. <http://www.hpsc.ie/hpsc/AZ/EARSS>. Erişim tarihi, 19.03.2013.
120. **Vahaboglu H, Budak F, Kasap M, Gacar G, Torol S, Karadenizli A, Kolayli F, Eroglu C.** High prevalence of OXA-51-type class D beta-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter spp.*: co-existence with OXA-58 in multiple centres. *J Antimicrob Chemother*, **2006**;58(3):537-42.
121. **Kuzucu Ç, Yetkin F, Grgeç S, Ersoy Y.** Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üreten *E. coli* ve *K.lebsiella spp.* Suşlarının Ertapenem ve diğer karbapenemlere karşı duyarlılıklarının araştırılması. *Mikrobiol Bul*, **2011**;45(1):28-35.
122. **Çişçi İH, Karakeçe E, Aşık G, Demiray T, Er H.** Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşlarında OXA-48 ve KPC varlığının araştırılması. 7. Ulusal ve Tanısal Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi. Ankara. **2012**, 19.
123. **Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Pascual A, Nordmann P.** Plasmid-mediated quinolone resistance in Australia, *Microb Drug Resist* **2006**;12(2):99-102.
124. **Frasson I, Cavallaro A, Bergo C, Richter SN, Palu G.** Prevalence of aac(6')-Ib-cr plasmid-mediated and chromosome-encoded fluoroquinolone resistance in *Enterobacteriaceae* in Italy. *Gut Pathogens*, **2011**;3(1):1-5.

125. **Pathak A, Chandran P S, Mahadik K, Macaden R, Lundborg CS.** Frequency and factors associated with carriage of multi-drug resistant commensal *Escherichia coli* among women attending antenatal clinics in Central India. *BMC Infect Dis* **2013**;13(199):1-9.
126. **Grisold AJ, Zarfel G, Strenger V.** Use of automated repetitive-sequence-based PCR for rapid laboratory confirmation of nosocomial outbreaks. *J Infect*, **2010**;60(1):44-51.
127. **Rakotonirina HC, Garin B, Randrianirina F, Richard V, Talarmin A, Arlet G.** Molecular characterization of multidrug-resistant extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated in Antananarivo, Madagascar. *BMC Microbiol*, **2013**;13(85):1-10.

ÖZGEÇMİŞ

22.03.1978 tarihinde Adana ilinde doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi Adana'da tamamladı. 1996 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2001 yılında mezun oldu. 2004 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2007 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimini tamamladı.

Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora öğrencisi olarak öğrenimine devam etmektedir.