

GİRİŞ

Gram negatif bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere karşı direncinde en önemli mekanizma, beta-laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesidir. Beta-laktamazlar içinde en geniş grubu genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar oluşturmaktadır. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten kökenlerin penisilinler, sefalosporinler ve aztreonama dirençli oldukları halde rutin antibiyogramda duyarlı bulunabilmeleri ve bu antibiyotiklerin kullanıldığı tedavilerde sorunlarla karşılaşılması nedeniyle, bu enzim üretiminin gösterilmesinin gerekli olduğu bildirilmektedir (1). Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar hemen hemen tüm enterik bakterilerde tanımlanmış olmasına rağmen sıklıkla *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinde bulunmaktadır (2,3). Büyük çoğunluğu TEM, SHV veya OXA enzimlerinden köken almaktadır. Bu üç enzimin türevleri dışında son yıllarda CTX-M, PER, VEB gibi genişlemiş spektrumlu enzimlerde de büyük bir artış olduğu görülmektedir (4).

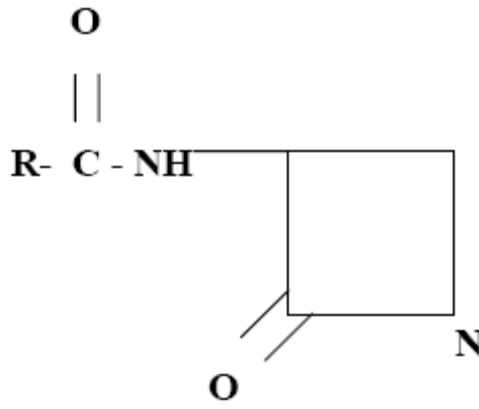
Her antibiyotik grubunda olduğu gibi beta-laktam antibiyotiklere karşı da bakteriler direnç kazanmaya ve yeni direnç mekanizmaları geliştirmeye devam edeceklerdir. Gelecek yıllarda bugünkü beta-laktamazlara birçok yenisi eklenecektir. Antibiyotiklerin kısıtlı kullanımı, infeksiyon kontrol önlemlerinin her hastanede uygulanması, dirençle ilgili surveyans çalışmalarının her merkezde devamlı yapılması ve antibiyotik kullanımı ile direnç ilişkisinin kesin olarak belirlenmesini sağlayacak çalışmaların yürütülmesi, beta-laktamazlara bağlı beta-laktam direncini azaltacak önlemlerden bazılarıdır (5).

Bu çalışmada, Pamukkale Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde poliklinik ve yatan hastalardan gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş olan *Klebsiella pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların varlığı, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz pozitif suşlarda CTX-M beta-laktamazların varlığı, grubunun belirlenmesi ve suşlar arasındaki klonal ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİKLER

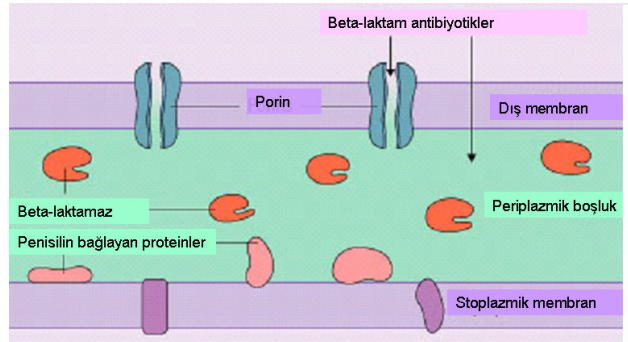
Beta-laktam antibiyotikler, kimyasal yapılarında ortak bir beta-laktam halkası taşıyan ve hücre duvarı sentezini inhibe ederek antibakteriyel etki gösteren geniş bir antibiyotik grubudur (Şekil-1) (6). 1949'da penisilinün üretiminin, kimyasının ve etki mekanizmasının kuramsal olarak incelenmesinden bu yana çok sayıda beta-laktam antibiyotik doğrudan veya sentetik olarak elde edilmiştir (7).



Şekil 1 : Beta-laktam halkası (6).

Beta-laktam antibiyotikler yan etkilerinin azlığı ve bakterisid olmaları nedeniyle günümüzde en sık kullanılan antibiyotik grubudur. Bakterilerin peptidoglikan tabakasının sentezini bozarak etki ederler. Bakterilerin hücre duvarında yer alan peptidoglikan (mürein) tabakası mikroorganizmanın yapısını ve bütünlüğünü sağlar. Bu tabaka çapraz bağlanan kısa peptid zincirleri ile sağlamlaşır. Bu çapraz bağlantı N-asetil muramik asitin yapısında yer alan D-alanin D-alanin moleküllerinin transpeptidasyon reaksiyonu ile birleşmeleri sonucu oluşur. Transpeptidaz reaksiyonunu oluşturan enzimlere penisilin bağlayan proteinler (PBP) adı verilir. Beta-laktam antibiyotiklerin temel hedefi penisilin bağlayıcı proteinlerdir. Beta-laktam antibiyotiklerin yapısı 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 (8). Hücre duvar yapısı bozulan bakteride ozmotik direnç kaybı ve ölüm meydana gelmektedir (9). Beta-laktam antibiyotiklerin hedeflerine

bağlanmaları ve etkinlik göstermeleri için gram negatif bakterilerde porin (Outer Membran Protein, OMP) adı verilen içi su dolu protein kanalcıklarından geçmeleri, sitoplazmik membranla dış membran arasındaki periplazmik boşlukta yer alan beta-laktamazlardan etkilenmemeleri gerekmektedir (10). Gram pozitif bakterilerde dış membran tabakası bulunmayıp, sitoplazmik kalın bir peptidoglikan tabakası uzanmaktadır. Beta-laktamazlar bu tabakaya yapışık veya bakteri hücresi etrafında serbest olarak yer almaktadır (Şekil-2) (11).



Şekil 2 : Gram negatif hücre duvar yapısı (11).

Beta-laktam grubu antibiyotikler başlıca 5 grupta toplanmaktadır. Bunlar,

- 1) Penisilinler
- 2) Sefalosporinler
- 3) Monobaktamlar
- 4) Karbapenemler
- 5) Beta-laktamaz inhibitörleri (klavulanat, sulbaktam, tazobaktam) dir (11).

BETA-LAKTAM GRUBU ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ

Escherichia coli' ye etkili ilk beta-laktam grubu antibiyotik olan ampisilinin kullanıma girmesiyle, gram negatif çomaklarda direnç gelişmeye başlamıştır. Bu direnç, plazmid aracılıklı dar spektrumlu beta-laktamazlar olan TEM-1 ve SHV-1 aracılığı ile gelişmişti. 1960'lar ve 1970'ler boyunca beta-laktamaz yapan bakterilerin seleksiyonu sonucu direnç sıklığı artmaya devam etmiştir. Özellikle hastanelerde artan antibiyotiklere dirençli bakteriler sorunuyla başedebilmek için, temel sefalosporin molekülündeki minör değişikliklerle beta-laktamaza dayanıklı geniş spektrumlu sefalosporinler geliştirilmiş ve 1980'lerin başlarında klinik

kullanıma girmiştir. Pratikte ilk kullanılan sefotaksimdir, bunu seftriakson ve seftazidim izlemiştir. Gram negatif bakterilerde, 1980'lerin ortalarından itibaren geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı beta-laktamaz aracılıklı direnç ortaya çıkmaya başlamıştır. İlk genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL), daha dar spektrumlu SHV-1 ve TEM-1 beta-laktamazlardan köken alan mutantlardır. Bu mutantları kodlayan genler, mobil genetik elementler üzerinde bulunduğu için hastane kökenli patojenler arasında kolaylıkla yayılmıştır. İlk genişlemiş spektrumlu SHV enzimi 1983 yılında *K. pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Serratia marcescens* klinik izolatlarında tanımlanmış ve SHV-1'e benzerliğinden dolayı SHV-2 olarak isimlendirilmiştir. SHV-1 enzimidaki tek bir amino asidin yer değişikliği bu enzimin aktivitesini geniş spektrumlu sefalosporinleri kapsayacak şekilde genişletmiştir. Bu tarihten günümüze kadar SHV-12'ye kadar isimlendirilen ve nokta mutasyonlarına bağlı olarak amino asid yer değişiklikleri sonucunda ortaya çıkan GSBL'ler bildirilmiştir. SHV ailesinin ilk üyeleri *Klebsiella* suşlarında tanımlanmış, sonradan *E. coli* suşlarında da saptanmıştır. GSBL'leri kodlayan genler mobilize olduklarından çok çeşitli gram negatif patojenlere yayılmıştır (12).

BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ MEKANİZMALARI

Beta-laktam antibiyotiklere karşı başlıca 3 yolla direnç gelişmektedir.

1. Hücre içinde beta-laktam antibiyotiğin konsantrasyonunun azalması, bu iki şekilde olmaktadır.

a) Girişinin kısıtlanması (porin kaybı)

b) Dışarı atılması (effluks mekanizması)

Hücre zarının geçirgenliğinin azalması gram negatif bakteriler için özellikle önem taşımaktadır. Bu bakterilerin membranları gram pozitif bakterilerin membranlarına nazaran daha komplike bir yapıya sahiptir. Gram negatif bakterilerde beta-laktam antibiyotikler, dış membrandaki OMP adı verilen porlar yolu ile hücreye girmektedir. Beta-laktam antibiyotikler dış membrandan porin F ve porin C adı verilen başlıca 2 kanal aracılığı ile geçmektedirler (13). Bu porin sistemlerinden MexA, MexC, MexD, OprJ, MexB ve OprM sistemi imipenem dışındaki birçok beta-laktama direnç oluşturmaktadır. MexC, MexD, OprJ sistemi de sefepim ve sefpiroma direnç oluştururken diğer beta-laktamlara duyarlılığı artırmaktadır (8).

2. PBP. Hedef bölgesinde değişim:

- a) Mevcut PBP'lerin değiştirilmesi
 - i) Mozaik PBP yaratılması
 - ii) PBP genlerinin mutasyonu
- b) Yeni PBP'lerin dışardan alınması

Neisseria gonorrhoeae, *N.meningitidis*, *Haemophilus influenzae* ve *Streptococcus pneumoniae*'da gözlenen penisilin direnci ve metisiline dirençli *Stafilococcus aureus*'da gözlenen direnç PBP'lerdeki değişiklikler ile oluşmaktadır (14). Bu tür direnç gram negatif bakterilerde nadirdir.

3. Beta-laktam antibiyotiğin beta-laktamaz üretimi nedeni ile parçalanması

- a) Beta-laktamaz üretiminin artması
 - i) Daha etkili promoter kazanımı
 - a) Mevcut promoterin mutasyonu
 - b) Yeni bir promoter alınması
 - ii) Üretim kontrol mekanizmasının mutasyon ile bozulması
- b) Beta-laktamaz yapısının mutasyon ile modifikasyonu
- c) Farklı spektrumlu yeni beta-laktamazların alınması.

Beta-laktamazlar, beta-laktam halkasındaki siklik amid bağlarını parçalayarak beta-laktam ajanların etkinliğini ortadan kaldıran enzimlerdir. Yapısal olarak PBP'lere benzerler. Beta-laktamazlar; gram pozitif, gram negatif ve anaerob bakteriler tarafından sentezlenir. Gram pozitif bakteriler arasında beta-laktamaz üreten en önemli patojen stafilokoklardır (13). Anaeroblardan *Clostridium* ve *Fusobacterium*'ların beta-laktamazları esas olarak penisilini parçalarken, *Bacteriodes*'ler tarafından üretilen beta-laktamazlar ise sıklıkla sefalosporinaz etkinliği göstermektedir. Gram negatif bakteriler, daha çok sayıda beta-laktamaz üretmektedirler. Başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere gram negatif bakterilerin beta-laktam direncindeki en önemli mekanizma beta-laktamaz üretimidir (15).

BETA-LAKTAMAZLAR

Bugüne kadar en az 350'ye yakın beta-laktamaz enzimi tanımlanmıştır. 1980'de Ambler tarafından moleküler yapılarına göre 4 sınıfa ayrılmışlardır. Sınıf A, penisilinleri hidrolize etmektedir.

Sınıf B, karbapenemazlardan oluşan metallo-beta-laktamazlardır.

Sınıf C, sefalosporinazlardan oluşan, kromozomal AmpC geni tarafından kodlanması nedeniyle AmpC enzimler olarak da adlandırılan enzimlerdir.

Sınıf D, oksasilineazlardan oluşmaktadır (16).

1995 yılında Bush, Jacoby ve Medeiros, biyokimyasal özellikleri ve substrat profillerine göre beta-laktamazları 4 gruba ayırmışlardır. Bugün için kabul edilen en geçerli sınıflamadır (Tablo-1) (16).

Tablo 1 : Fonksiyonel ve moleküler özelliklerine göre beta-laktamazlar (16)

Bush , Jacoby, Medeiros	Ambler Molekül Sınıfı)	Tercih edilen substrat	Klavulanik asit ile inhibisyon	Enzimler
1	C	Sefalosporinler	-	Gr(-) bakterilerin Amp C enzimleri, MIR-1
2a	A	Penisilinler	+	Gr(+) bakterilerin penisilinazları
2b	A	Penisilinler,sefalosporinler	+	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penisilinler, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler, monobaktamlar	+	TEM-3-TEM-26, SHV-2- SHV-6, <i>K.oxytoca</i> K1
2br	A	Penisilinler	+/-	TEM-30 - TEM- 36, TRC-1
2c	A	Karbenisilin, penisilinler	+/-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penisilinler, oksasilin	+/-	OXA-1-OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
2e	A	Sefalosporinler, penisilinler	+	<i>P.vulgaris</i> 'in indüklenebilir sefalosporinazları
2f	A	Penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler	+	<i>E.cloacae</i> 'nin NMC-A'sı, <i>S.marcescens</i> 'in Sme-1'i
3	B	Bir çok beta laktam, karbapenemler dahil	-	<i>S.maltophilia</i> 'nın L1'i, <i>B.fragilis</i> 'in CcrA'sı
4	Belirlenmemiş	Penisilinler, karbenisilin, oksasilin	-	<i>Burkholderia cepacia</i> 'nın penisilinazı

Grup 1: Bu gruptaki enzimlerin birçoğu kromozomal enzimlerdir ve indüklenebilme özelliğine sahiptirler. Moleküler sınıflamada sınıf C'de yer alırlar. Kromozomal AmpC enzimleri, ayrıca plazmid kontrolündeki FOX-1, LAT-1, MIR-1, BIL-1 beta-laktamazları da bu grupta yer almaktadır. Sefaloridin ve sefalotini penisilinden daha hızlı hidroliz etmektedirler. Klavulanik asit ve sulbaktamdan etkilenmezler, buna karşın aztreonam ve kloksasilin tarafından inhibe edilirler. Karbapeneme karşı da duyarlıdırlar. Grup 1 enzimlerini kodlayan genler plazmidlerde de görülebilmekte ve *Enterobacteriaceae* arasında transmisyon yoluyla aktarılabilmektedir. *Salmonella* dışında hemen tüm gram negatif bakterilerde kromozomal grup 1 beta-laktamazlar bulunmaktadır. Ancak sentez miktarı açısından farklılıklar göstererek yüksek veya düşük düzeyde üretilebilir. *E.coli*, *P.mirabilis* ve *Shigella spp.*'de ampisilin ve dar spektrumlu sefalosporinlere karşı direnç oluşturmayacak kadar düşük düzeyde sentezlenen yapısal enzimler vardır. Buna karşın *E.coli* izolatlarının %2'sinde AmpC enzimlerinin aşırı sentezi sonucu yüksek düzeyde direnç oluşabilmektedir (17). *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Serratia spp.*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* ve *Providencia rettgeri*'deki sentezlenen kromozomal beta-laktamazlar indüklenebilen türdür (17,18). Normalde bakteri tarafından bu enzimler bir baskılayıcı mekanizma ile düşük düzeyde sentezlenirken ortama bir penisilin ya da sefalosporin eklendiğinde enzim sentezinde birkaç yüz kat artış olabilmektedir (17). Farklı beta-laktam antibiyotikler değişik oranlarda olmak üzere Grup 1 beta-laktamazları indükleyebilirler. Ancak, indükleyici beta-laktamın ortadan kalkmasıyla bakteri tekrar eski bazal beta-laktamaz sentezine geri dönmektedir. Bu yüzden bu mekanizma ile klinikte kalıcı bir direnç söz konusu olmamaktadır. Esas sorun bu enzimleri doğal olarak fazla miktarda sentezleyen mutant suşlar nedeniyle oluşmaktadır. İndüklenebilir kromozomal beta-laktamaz taşıyan gram negatif bakterilerde normalde 10^5 - 10^7 arasında bir sıklıkla baskılanmış mutantlar bulunmaktadır. Bu baskılanmış mutantlarda beta-laktamaz enzimlerinin sentezi devamlı ve yüksek düzeyde olmaktadır. Böyle bakterilerle oluşan infeksiyonların bir indükleyici antibiyotik ile tedavisi sırasında duyarlı bakterilerin ortadan kalkması, antibiyotik etkisine dirençli doğal mutantların ortamda çoğalması ile tedavi başarısızlıkları olabilmektedir. Bunun yanı sıra dirençli bakterilerin hastane florasına yerleşmesine bağlı olarak da hastane infeksiyonu epidemileri ortaya çıkabilmektedir

(17,18).

Grup 2: En geniş kategoriye oluşturan grup 2, substrat profilindeki farklılık nedeniyle birkaç alt gruba ayrılmaktadır. Tümü moleküller sınıf olarak A ve D’de yer almaktadır. Bu beta-laktamazlar penisilinleri, sefalosporinleri, kloksasilini, karbenisilini, karbapenemleri ve monobaktamları hidroliz etmelerine göre 6 alt gruba ayrılmaktadır (19). Alt grup olarak 2b, 2be ve 2br’de bulunan TEM ve SHV grubu enzimler, sık soyutlanan türlerde yaygın olmaları ve plazmidlerce taşınmaları nedeniyle klinik açıdan önem taşımaktadırlar (17,18, 20).

2a: Bu alt grupta penisilini hidrolize eden, klavulanik asite duyarlı enzimler bulunmaktadır. *S. aureus*’un enzimleri bu gruptadır. Ayrıca *Basillus cereus*’un kromozomal beta-laktamazları, *Citrobacter amalonaticus*, *Eikenella corrodens* ve *Fusobacterium nucleatum*’da tanımlanan enzimler de bu gruptadır (16).

2b: Hem penisilin hem sefalosporinleri hidrolize eden, klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı beta-laktamazları içermektedir (18). Plazmid kontrolündeki “geniş spektrumlu” TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri bu gruptadır. Bu enzimlere; ampisilin, karbenisilin, tikarsilin, sefalotin gibi beta-laktam antibiyotiklere direnç oluşturmaları nedeniyle geniş spektrumlu denilmiştir. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 beta-laktamazları *Enterobacteriaceae* ailesinde yaygın olarak bulunmaktadır. Ayrıca OHIO-1 ve *H.influenzae*’da saptanan ROB-1 enzimini de içermektedir. TEM-1 beta laktamazı özellikle *E.coli* suşlarında ampisilin ve amoksisilin direncine neden olan mekanizmalar arasında en sık görülenidir. Ayrıca TEM-1 enzimi, diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde olduğu gibi *Haemophilus*, *Vibrio* ve *Neisseria* gibi diğer cinslerde de bulunmaktadır. SHV-1 özellikle *K.pneumoniae* suşlarında bulunmaktadır (20, 21).

2be: Oksiimino beta-laktamlar ve monobaktamlar gibi antibiyotiklerin yaygın kullanımını sonucunda TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi ana enzimlerden 1-4 aminoasit değişikliği ile genişlemiş spektrumlu beta-laktamlara (seftazidim, seftriakson, sefotaksim veya aztreonam) da etki eden yeni TEM ve SHV enzimleri

tanımlanmıştır. (21). Bunlar grup 2be'de yer almakta ve GSBL olarak adlandırılmaktadır. Sefoksitin, sefotetan ve klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır. Özellikle *Klebsiella spp.* ve *E.coli* suşlarında yaygındır. Bu grupta yer alan enzimlerden biri de PER-1 enzimidir. Bu enzim ilk kez Türkiye'den izole edilen bakteriyel suşlarda saptanmıştır (22, 23).

2br: Klavulanik asitten etkilenmeyen, geniş spektrumlu beta-laktamazlar bu gruba alınmıştır. TEM-30 dan TEM-36'ya kadar olan TEM enzimleri ve TRC-1 enzimi bu gruptadır.

2c: Bu grup içinde karbenisilini hidroliz eden, klavulanik asite duyarlı enzimler yer almaktadır. PSE-1, PSE-3, PSE-4 beta-laktamazları, *Aeromonas hydrophilia*'nın AER-1 enzimi, *Moraxella catarrhalis*'in BRO-1 ve BRO-2 enzimleri, *Vibrio cholerae*'nin SAR-1 enzimi de bu gruptadır.

2d: Bu grup, kloksasilini penisilinden daha hızlı hidroliz eden beta-laktamazları içermektedir. OXA enzimleri bu gruptadır. Bunlardan OXA-11 enzimi, Türkiye'de izole edilen bir suşta saptanmıştır (24). Klavulanik asit ve sulbaktama dirençlidirler. Grup 2'nin diğer alt gruplarında bulunan tüm enzimler, moleküler sınıf A'da yer alırken, sadece bu alt grup moleküler sınıf D'de yer almaktadır.

2e: Bu grupta yer alan beta-laktamazlar sefalosporinaz olmalarına karşın, grup 1'dekilerden farklı olarak klavulanik asitle inhibe olmaktadır. *B.fragilis*'in CepA enzimi, *Bacteriodes uniformis* ve *Bacteriodes vulgatus*'un kromozomal CblA ve CfxA, *E.coli*'den izole edilen FEC-1 ile *S.maltophilia*'nın L2 ve *Yersinia enterocolitica*'dan izole edilen Bla-1 enzimleri bu grupta yer almaktadır (16).

2f: Bu grupta, *E.cloacae*'nin indüklenebilen IMI-1 enzimi, *E.cloacae*'nin kromozomal NMC-A enzimi ve *S.marcescens*'in Sme-1 enzimi yer almaktadır. Karbapenemleri hidroliz etmekte, klavulanik asit ile inhibe olmaktadır (16).

Grup 3 metallo-beta-laktamazlar: B sınıfı olan bu beta-laktamazlar, monobaktamlar hariç tüm beta-laktamları ve karbapenemleri hidrolize etmektedirler.

Sıklıkla etki spektrumlarını genişletecek bir diğer enzimle birlikte üretilirler. Diğer enzimlerden farklı olarak aktif bölgelerinde serin yerine bir Zn^{+2} iyonu bulunmaktadır. Beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezler fakat EDTA ile inaktive olmaktadır. 3 alt gruba bölünmüştür. 3a'da genellikle penisilinleri karbapenemlerden daha hızlı hidrolize eden IMP-1-8 ve VIM-1-3 enzimleri yer almaktadır. 3b'de *Aeromonas*'ın gerçek karbapenemazları, 3c'de sadece *Legionella gormanii*'nin yüksek sefalosporinaz aktivitesi olan metalloenzimleri yer almaktadır.

Grup 4: Bu grup, klavulanik asit ile pek de iyi inhibe olmayan küçük bir penisilinazlar grubundan oluşmaktadır. Biri dışında hepsi kromozomaldır. Yapıları henüz tam olarak saptanamamıştır ve molekül sınıfı henüz belirlenmemiştir. *Alcaligenes faecalis*, *B.fragilis*, *Campylobacter jejuni*'den izole edilen enzimler, *Clostridium butyricum*'un indüklenebilen enzimi, *E. coli*'nin plazmid kontrolündeki SAR-2 beta-laktamazı bu gruba dahil edilmiştir. Aynı zamanda *Pseudomonas cepacia*'daki beta-laktamazlar da bu gruba dahil edilmiştir.

BETA- LAKTAMAZLARIN İSİMLENDİRİLMESİ

Beta-laktamazlar çeşitli şekillerde isimlendirilmektedir. Bu enzimlerin isimlendirilmesinde gerçekçi bir temel yoktur. Örneğin, TEM enziminin adı, dirençli bakterinin izole edildiği Temoniera adlı hastanın adından kısaltılmıştır. Bazı beta-laktamazlara ilk tanımlayanın adı verilmiş, daha sonra biyokimyasal çalışmalar tamamlandığında adı değiştirilmiştir. Örneğin, SHV-1, ilk kez 1992 yılında Pitton tarafından tanımlandığı için PIT-2 olarak adlandırılmıştır. CTX-1, sefotaksime direnci gösterdiğinden bu ad verilmiştir. Ancak nükleotid dizi analizlerine göre bu enzimin TEM'i kodlayan genlerdeki nokta mutasyonlarından sonra ortaya çıktığının belirlenmesi ile TEM-3 olarak değiştirilmiştir (25). Bazı enzimler tercih ettikleri substratlara göre (CARB, FUR, IMP, OXA), bazıları biyokimyasal özelliklerine göre (SHV, NBC), bazıları genlerine (Amp, CepA), bazıları izole edildikleri bakterilere (AER, PSE), suşlara (P99), hasta isimlerine (TEM, ROB), hastaneye (MIR, RHH), eyaletlere (OHIO), bazıları da enzimi bulan yazarların isimlerine göre (HMS) adlandırılmıştır (26). Bunlardan bazıları geçerliliklerini yitirmiştir. Örneğin, ilk kez *Pseudomonas*'lardan izole edilmiş olan PSE (*Pseudomonas* spesifik enzime) enziminin *Enterobacteriaceae*'de de bulunduğu artık bilinmektedir (17). Aynı

şekilde son yıllarda büyük bir hızla artmakta olan TEM enziminden türeyen enzimlere CAZ (seftazidimaz), CTX (sefotaksimaz) ve IRT (inhibitör rezistans) gibi tanımlayıcı isimler verilmiş, bu da bir karmaşaya yol açmıştır. Bu konuda önerilen, TEM'den köken alan tüm enzimlerin numara ile (TEM-26, TEM-43 gibi) belirtilmesidir (26).

GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZLAR

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, sınıf A'da yer alan (grup 2be, grup 2e) ve sınıf D (grup 2d) beta-laktamazlardan oluşur. Birçok gram negatif bakteride bulunurlar. Geniş spektrumlu penisilinlere, 3. kuşak sefalosporinlere ve kısmen sefepime etkili; karbapenemlere, sefamisinlere ve beta-laktamaz inhibitörlerine etkisizdirler. GSBL'ların çoğunluğu, TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 geniş spektrumlu enzimlerinden türeyenler olarak TEM ve SHV tipi enzimlerdir. Geri kalanlar ise, CTX-M tipi enzimler veya OXA'lardan GSBL spektrumuna sahip olanlar ya da henüz gruplandırılmamış olanlardır. Yapısal özellikler ve evolüsyon açısından GSBL'lar dokuz farklı grup içinde sınıflandırılmaktadır: Bu gruplar, TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES/IBC, TLA, BES ve OXA'dır (27). Günümüzde TEM türü beta-laktamazların sayısı 130'u, SHV türü beta laktamazların sayısı 50'yi ve CTX-M tipi beta laktamazların sayısı da 40'ı geçmiştir (7,28)

TEM GRUBU GSBL'LER:

GSBL fenotipi gösteren ilk TEM türevi TEM-3'tür ve 1987 yılında bildirilmiştir (4,29,30). TEM-1 gram negatif bakterilerde en sık bulunan enzimdir ve ampisiline dirençli *E. coli*'lerin %90'ında dirençten bu enzim sorumludur. TEM-1 ve TEM-2 enzimleri sıklıkla transpozonlar tarafından kodlanan dar spektrumlu enzimlerdir; penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidroliz edebilirler. Ancak oksimino-sefalosporinlere karşı aktiviteleri yoktur. GSBL fenotipi oluşturma yönünden, 104. pozisyonda glutamat yerine lizin, 164. pozisyonda arjinin yerine serin veya histidin, 238. pozisyonda glisin yerine serin girmesi gibi bazı aminoasit değişiklikleri daha önemlidir (30). TEM grubu beta laktamazlar *E.coli* ve *K.pneumoniae* başta olmak üzere *E.aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* ve *Salmonella spp.* gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinde sık bulunmaktadır. Nadir de olsa *P.aeuruginosa*'da da bildirilmiştir (29,31) Buna karşın TEM-4, TEM-

21, TEM-24 ve TEM-42 *P.aeruginosa*'da, TEM-17 *Capnocytophaga ochracea*'da bildirilmiştir (28).

SHV GRUBU GSBL'LER:

Bu grup enzimlerin öncüsü olan SHV-1 enzimi en sık *K.pneumoniae*'da bulunmaktadır. Genellikle de kromozomal bir enzimdir. Ampisilin, tikarsilin ve piperasiline direnç oluşturmaktadır. Oksiimino-sefalosporinlere karşı aktivitesi yoktur (4). SHV türü enzimlerin ilk türü 1983 yılında bulunmuş ve SHV-2 olarak tanımlanmıştır. TEM grubu GSBL'lere kıyasla SHV-1'den köken alan enzim sayısı ve aminoasit değişikliği olan pozisyonlar daha azdır. Bunlarda karakteristik değişiklik 238. pozisyonda glisin yerine serin amino asidinin girmesidir. SHV grubu enzimler *K.pneumoniae*'dan başka *Citrobacter diversus*, *E.coli* ve *P.aeruginosa*'da bildirilmiştir (29,30).

OXA GRUBU GSBL'LER:

OXA grubu enzimler Ambler grup D'de yer alan ve daha çok *P.aeruginosa*'da bulunan GSBL'lerdir. Bu enzimlerin OXA-1 den OXA-10'a kadar olanları dar spektrumlu olup substrat olarak oksasilin ve kloksasilini tercih ederler (4,29,30,32). TEM ve SHV'de olduğu gibi aminoasit dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oksiimino-sefalosporinleri hidroliz edebilen geniş spektrumlu enzimler haline gelmişlerdir (32,33). OXA-11,14,15 ve 16 seftazidim direncine yol açarken, OXA-17 seftotaksime direnç oluşturmaktadır. OXA-31 ise sefepime direnç oluştururken seftazidime duyarlıdır (34). OXA-24 ayrıca karbapenemaz aktivitesi göstermektedir. Fakat bu GSBL değildir (29,30).

CTX-M

Son yıllarda GSBL'lerin arasına yeni bir grup katılmıştır. CTX-M olarak tanımlanan bu grup beta-laktamazlar substrat olarak seftotaksimi tercih etmektedir. Seftazidimi bir miktar hidroliz etmekle birlikte klinikte dirence yol açacak miktarda değildir. Bu enzimlerin önemli bir özelliği bunlara karşı tazobaktamın inhibitör etkisinin klavulanik aside ve sulbaktama göre fazla olmasıdır. İlk CTX-M beta laktamaz 1989 yılında Almanya'dan *E.coli*'de bildirilmiş, o tarihten bugüne kadar *Salmonella spp.* başta olmak üzere bir çok *Enterobacteriaceae* türünde saptanmıştır.

1995 yılından itibaren büyük bir artış göstermiştir. Bu enzimler büyük olasılıkla *Kluyvera ascorbata*'nın kromozomal AmpC beta-laktamazlarından köken almıştır. Sefalosporinleri hidroliz etme özellikleri TEM ve SHV türü GSBL'ler gibi sadece dar spektrumlu enzimlerdeki aminoasit değişiklikleri sonucu değil, enzimin omega halkasındaki ve beta ucundaki yapısal değişiklikler sonucudur (29,30). Günümüzde CTX-M ailesinde 40 enzim bulunmaktadır ve bunlar amino asit dizilerindeki benzerliklere göre CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 ve CTX-M-25 olarak tanımlanan 5 gruba ayrılmıştır (Tablo-2) (29,30,35,36). Bunların içinde CTX-M-14, CTX-M-3 ve CTX-M-2 en yaygın olan enzimlerdir. Bu enzimler hem insanlardan hem de sağlıklı hayvanlardan izole edilmişlerdir. Yayılmaları hem plazmidlere hem de ISEcp1 gibi hareketli genetik elementlere bağlıdır. CTX-M enzimlerini üreten mikroorganizmaların çoğunlukla hastane infeksiyonlarından izole edilmelerine karşın SHV ve TEM enzimlerinden farklı olarak *Vibrio cholerae*, tifo dışı *Salmonella* ve *Shigella spp.* gibi toplumdaki infeksiyon etkenlerinde de bildirilmektedir. Sefotaksim ve seftriaksonun toplumda yaygın kullanımının CTX-M enzimlerinin ortaya çıkışında rol oynadığı düşünülmektedir (36). Ülkemizden bildirilen CTX-M grubu beta laktamazlar, 14 *E.coli* izolatında ve bir salgında izole edilen 15 *Salmonella typhimurium* suşunda, ayrıca bir *Shigella sonnei*'de üretilen CTX-M-3, bir *K.pneumoniae*' de saptanan CTX-M-15 ve bir *K.pneumoniae* suşunda belirlenen CTX-M-2'dir (37,38).

Tablo 2 : CTX-M enzimleri ve alt grupları

GRUP	ENZİMLER
CTX-M-1	CTX-M-1,-3,-10,-11,-12,-15(UOE-1),-22,-23,-28,-29,-30
CTX-M-2	CTX-M-2,-4,-5,-6,-7,-20,Toho-1
CTX-M-8	CTX-M-8
CTX-M-9	CTX-M-9,-13,-14,-16,-17,-18,-19,-21,Toho-2
CTX-M-25	CTX-M-25,-26

İNHİBİTÖRLERE DİRENÇLİ BETA-LAKTAMAZLAR

Beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları klinikte kullanılmaya başlandıktan sonra bu antibiyotiklere karşı dirençli *E.coli* suşları bildirilmeye başlanmıştır (39).

Bu enzimlerin TEM beta-laktamazlarından köken alan beta-laktamaz inhibitörlerine dirençli varyantların (IRT) olduğu belirlenmiştir. TEM-50 ve TEM-68 gibi nadir örnekler dışında IRT'ler üçüncü kuşak sefalosporinleri hidroliz etmemektedir, buna karşın TEM veya SHV türü enzimlerden köken aldıkları için GSBL'ler ile birlikte ele alınmaktadırlar (40,41). Bu enzimler önceleri IRT (inhibitorresistant TEM) olarak isimlendirilmiş, ancak daha sonra köken aldıkları TEM yada SHV 'de sıralamaya girmişlerdir. Örneğin IRT-1, TEM-31; IRT-2, TEM-44; IRT-3, TEM-32; IRT-14, TEM-45 olarak yeniden numaralanmıştır. Günümüzde inhibitörlere dirençli enzimlerin sayısı 22 civarındadır (42). IRT'ler en sık olarak *E.coli*'de bulunmakla birlikte *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *P.mirabilis* ve *Citrobacter freundii*' de de bildirilmektedir. İnhibitörlere dirençli TEM türevleri klavulanik asit ve sulbaktama ve bunların klinik kullanımda olan kombinasyonlarına dirençli, tazobaktam ve piperasilin/tazobaktam kombinasyonuna duyarlıdırlar (41).

DİĞER GSBL'LER

Son yıllarda genişlemiş spektrumlu enzimlerden olup TEM, SHV veya OXA beta-laktamazlardan köken almamış bazı enzimler bildirilmeye başlanmıştır. Bu enzimlerden biri PER-1 enzimidir. Bu enzim ilk kez Fransa'da bir Türk hastadan izole edilen bir bakteride saptanmış, kromozomal bir enzim olarak tanımlanmıştır. Kısa bir süre sonra Hacettepe Üniversitesi'nde 14 *P.aeruginosa* suşunda bulunan GSBL'nin PER-1 olduğu belirlenmiş ve ilk kez plazmid kontrolunda bir enzim olduğu gösterilmiştir. Daha sonra İstanbul'da *Salmonella spp.*'lerde gösterilmiştir. PER-1 enzimi içeren *P.aeruginosa*'nın en belirgin özellikleri, izolatların seftazidim'e çok dirençli olmalarına karşın (MİK >256 µg/ml) piperasilin için daha düşük bir direnç göstermeleridir (MİK 8-16 µg/ml). Bu enzimler klavulanik asit ve tazobaktama duyarlıdır. Bunlardan başka BES-1, FEC-1, GES-1, CME-1, PER-2, SFO- 1, TLA-1, VEB-1 gibi enzimler de GSBL grubunda yer almaktadır (16,29,30).

GSBL TANI YÖNTEMLERİ

GSBL'ler genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri parçalayan ve etkileri klavulanik asitle inhibe olan beta-laktamazlardır. Dolayısıyla hasta prognozu ve uygun tedavi seçimi için GSBL'lerin özel testlerle tanımlanması ve klinisyenin de bu enzimler hakkında bilgi sahibi olması gerekmektedir. Rutin testlerden bazı ipuçları

elde edilebilir:

- Laboratuvarda etkilenen antibiyotiklerde azalmış duyarlılık GSBL göstergesi kabul edilir.
- Önerilen inokulumdan (5×10^5 bakteri/ml) daha yüksek bir inokulumda (5×10^7 bakteri/ml) MİK değerleri 100-500 kat yükselirse (inokulum etkisi) GSBL varlığını gösterir.
- Aztreonam ve 3. kuşak sefalosporinler için MİK 2 µg/ml; seftazidim inhibisyon zon çapı 22 mm; aztreonam ve sefotaksim zon çaplarının 27 mm; seftriakson için 25 mm. olduğu durumlarda GSBL doğrulama testi yapılmalıdır.
- Çoklu direnç özelliği (gentamisin ve SXT) GSBL için ipucu olabilir.

Bir izolatın GSBL ürettiği saptandığında; beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları ve sefamisinler hariç tüm sefalosporinler, penisilinler ve aztreonam dirençli rapor edilmelidir. (7)

GSBL TARAMA TESTLERİ:

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerilerine göre; disk difüzyon veya dilüsyon yöntemleriyle sefotaksim, seftriakson, seftazidim, aztreonam veya sefpodoksime karşı duyarlılığın azaldığının saptanması halinde doğrulama testleri uygulanmalıdır (Tablo-3) (43).

Tablo 3 : GSBL'ler için tarama testi olarak önerilen inhibisyon zonu ve MİK değerleri

Antibiyotik Diski	Zon çapı	MİK
Sefpodoksime (30 µg)	< 22 mm	>2 µg/ml
Seftazidim (30 µg)	< 22 mm	>2 µg/ml
Aztreonam (30 µg)	< 27 mm	>2 µg/ml
Sefotaksim (30 µg)	< 27 mm	>2 µg/ml
Seftriakson (30 µg)	< 25 mm	>2 µg/ml

GSBL DOĞRULAMA TESTLERİ:

Doğrulama testleri klavulanik asit ve indikatör sefalosporin ve/veya

monobaktam arasındaki sinerjinin gösterilmesi temeline dayanmaktadır. Sık olarak kullanılan yöntemler;

1. Kombine disk yöntemi
2. Çift disk sinerji yöntemi
3. E- test yöntemi
4. Mikrodilüsyon yöntemi
5. Üç boyutlu test
6. Moleküler yöntemler

Kombine Disk Yöntemi: Sefotaksim (30 µg) veya seftazidim (30 µg) disklerine 10 µg klavulanik asit eklenir. McFarland 0,5 standardı yoğunluğunda olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonunun yayıldığı Mueller-Hinton Agar (MHA) plaklarına klavulanik asit içeren ve içermeyen sefotaksim ve seftazidim diskleri yerleştirilir. Bir gece 35°C'de inkübasyondan sonra klavulanik asit içeren ve içermeyen disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırılır. Kombinasyon diskleri etrafındaki zon, klavulanik asit içermeyen disk etrafındaki zona kıyasla 5 mm daha genişse izolat GSBL üretimi açısından pozitif kabul edilir. Kombinasyon diski olarak 1 mg klavulanik asit içeren sefpodoksim (10 µg) diskleri de kullanılmaktadır (7).

Çift Disk Sinerji Yöntemi: McFarland 0,5 standardı yoğunluğunda olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton Agar (MHA) plağına yayılır. Plağın ortasına bir amoksisilin-klavulanik asit diski (AMC 20/10 µg) ile disk merkezleri arasındaki uzaklık 30 mm olacak şekilde seftazidim 30 µg (CAZ), seftriakson 30 µg (CRO) veya sefotaksim 30 µg (CTX), aztreonam 30 µg (ATM) veya sefpodoksim 30 µg (POD) diskleri yerleştirilir. Bir gece 35°C'de inkübasyondan sonra sefalosporin veya ATM etrafındaki inhibisyon zonunun AMC diskine doğru genişlemesi veya arada bakterinin üremediği bir sinerji alanının bulunması GSBL varlığını göstermektedir (7).

E-Test Yöntemi: Test stripleri bir ucunda seftazidim (TZ)/sefotaksim(CT), diğer ucunda seftazidim ve klavulanik asit (TZL)/ sefotaksim ve klavulanik asit 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. Özellikle CT-CTL striplerinde klavulanik asitin diğer tarafada difüze olması nedeniyle stripin ortasında bir “fantom zon” görülebilmektedir. Bu zon GSBL göstergesi olarak kabul edilmektedir (7).

Mikrodilüsyon Yöntemi: Sefotaksim ve seftazidim MİK değerleri, hem tek başına hem de klavulanik asit varlığında saptanmaktadır. Klavulanik asit varlığında MİK değerlerinde 8 kat azalma GSBL göstergesi olarak kabul edilmektedir (7).

Üç Boyutlu Test: Test edilecek mikroorganizma agar yüzeyine yayıldıktan sonra agarda bir yarık açılır. Yarığın içi test edilecek mikroorganizmanın üretildiği sıvı besiyeri ile doldurulur. Antibiyotik diskleri bu yarıktan 3 mm uzak olacak şekilde dizilir. Yarığa bakan tarafta, inhibisyon zonunda bozulma, daralma pozitif olarak değerlendirilir (7).

Moleküler Yöntemler: Moleküler yöntemler enzimlerin tanımlanmasında araştırma amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla, DNA probları, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), oligotiplendirme, ligaz zincir reaksiyonu (LCR), izoelektrik odaklama ve nükleik asit dizi analizi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin çoğunda sadece enzim ailesi gösterilebilmektedir. Enzimin kesin olarak tanımlanması bu konuda altın standart yöntem olarak kabul edilen nükleik asit dizi analizi ile mümkün olmaktadır. Bu yöntemle farklı enzim tipleri ve mutasyonlar saptanabilmektedir (7).

GSBL'LERİN KLİNİK ÖNEMİ

GSBL sentezleyen bakterilerin klinikte neden olduğu sorunların başında bu enzimleri sentezleyen bakterilerin yol açtığı direnç problemi gelmektedir. Bu enzimlerden birini sentezlediği saptanan gram negatif bakteriler tüm geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama karşı dirençli kabul edilmelidir. Diğer taraftan da bu enzimleri kodlayan plazmidler aynı zamanda pek çok beta-laktam dışı

antibiyotiğe karşı da genetik materyal taşımaktadır. Dolayısıyla GSBL taşıyan bakterilerde başta aminoglikozidler olmak üzere kinolon, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim/sülfometaksazol direnci de eş zamanlı olarak bulunabilmektedir. Uzun süreli antibiyotik kullanımı, yoğun bakım ünitesinde yatma, altta yatan ciddi hastalığın olması, invaziv girişime maruz kalma, acil abdominal cerrahi, ventilatör kullanımı, intravasküler kateter kullanımı da GSBL sentezleyen bakterilerde kolonizasyonu artırmaktadır. Bakterinin sentezlediği enzimin farklı sefalosporinlere karşı afinitesinin değişik olması ve inokulum etkisi gibi nedenlerle üçüncü kuşak sefalosporinlere duyarlı gibi gözükülebilmektedir. Bu taktirde verilen üçüncü kuşak sefalosporin tedavisi başarısızlıkla sonuçlanmaktadır (44).

GSBL pozitif gram negatif mikroorganizmalar başlıca sepsis, üriner sistem infeksiyonu ve solunum sistemi infeksiyonları başta olmak üzere kateter infeksiyonu, menenjit, kolanjit, batın içi apseye sebep olmaktadır. GSBL'nin gerektiği şekilde rapor edilmemesi nedeniyle klinisyenler konunun öneminin farkında olmamaktadırlar. Ayrıca GSBL'nin aynı veya farklı cins bakteriler ile taşınabilmesi hastanelerde özellikle yoğun bakım ünitelerinde salgınlara neden olabilir. GSBL pozitif suşlarla gelişen infeksiyonlarda komplikasyon riski ve mortalite oranı yüksektir (45). Özellikle uygunsuz antibiyotik tedavisi tedavi başarısızlığına ve mortalitede artışa sebep olmaktadır (46).

TEDAVİ SEÇENEKLERİ

Beta-laktam / beta-laktamaz inhibitörleri: GSBL'ler genellikle klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktam inhibitörleri ile inhibe olmaktadır. Bunların içinde GSBL'ye en etkili tazobaktamdır. İn vivo ve in vitro yapılan çalışmalarda beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörlerinin GSBL pozitif mikroorganizmalara karşı etkili olduğu gösterilmiştir (47). Ancak mikroorganizmalarda yüksek oranda beta-laktamaz yapımı, özellikle inhibitör dirençli beta-laktamaz (IRT)'ların varlığı veya porin defekti olması gibi durumlarda etkisiz kalabilirler. AmpC indüklenebilir beta-laktamazlara beta-laktamaz inhibitörleri etkili değildir. Klavulanik asit beta-laktamaz indüksiyonuna neden olabilmektedir. Bu durum *Pseudomonas* infeksiyonlarında tikarsilin-klavulanik asit ile tedavi sırasında başarısızlığa neden olabilir. Ciddi sistemik infeksiyonlarda beta-

laktam/beta-laktamaz inhibitörlerinin aminoglikozitlerle birlikte kullanımı tedavi başarısını artırabilmektedir (47).

Aminoglikozidler: Aminoglikozidler GSBL pozitif mikroorganizmaların tedavisinde kullanılabilirler. Ancak GSBL taşıyan plazmidlerin aminoglikozid direnç genlerini de taşıyabilmesi olası olduğundan duyarlılık durumuna göre kullanılmalıdır. GSBL pozitif suşlar sıklıkla aminoglikozidlere de dirençlidirler (47,48).

Kinolonlar: Beta-laktamazların beta-laktam antibiyotikler dışındaki antibiyotiklere etkisinin olmamasından dolayı, kinolonlar GSBL pozitif mikroorganizmalarla gelişen infeksiyonların tedavisinde kullanılabilirler. Bununla birlikte GSBL direnci ve kinolon direncinin birlikte görülme sıklığı artmaktadır (49). GSBL pozitif suşlarda %10-40 arasında değişen kinolon direncinin görülmesi, kinolonların kullanımını kısıtlamaktadır (47,48).

Karbapenemler: Karbapenemler GSBL pozitif mikroorganizmalarla gelişen infeksiyonların tedavisinde ilk seçenek antibiyotiklerdir. Tedavide tek başına kullanılabilirler. GSBL pozitif bakteri infeksiyonlarının tedavisinde kombine tedavinin karbapenem tedavisine üstünlüğü olmadığı bildirilmektedir (47).

RİSK FAKTÖRLERİ

Çeşitli kontrollü çalışmalar, GSBL üretimine ilişkin birbirinden bağımsız bazı risk faktörlerinin olduğunu göstermiştir. En sık belirlenmiş olan risk faktörleri, uzun süreli hastanede kalma, yoğun bakım ünitesinde yatma veya daha önceden de hastanede kalma ve çok antibiyotik (özellikle uzun süreli geniş spektrumlu sefalosporin) kullanımınıdır. Birçok çalışmada daha önceden üçüncü kuşak sefalosporin kullanımı bağımsız risk faktörü olarak saptanmıştır (28). 2001'de yapılan bir çalışmada üçüncü kuşak sefalosporin ve/veya aminoglikozid kullanımının GSBL üreten suşla kolonizasyon ve infeksiyon için yaklaşık 18 kat risk taşıdığı gösterilmiştir (29). Transplantasyon hastaları, onkoloji hastaları, yanıklı olgular ve yenidoğanlar GSBL için risk altındadır. Sık tanımlanan diğer risk faktörleri entübasyon ve mekanik ventilasyon, santral venöz, arteriyel veya üriner katater

bulunması, acil intraabdominal cerrahi ya da ve kalp yetmezliğidir (50, 51).

GSBL DİRENCİNİN SINIRLANDIRILMASI

GSBL üreten bakterilerin oluşturduğu infeksiyonların kontrol altına alınması için sürveyans programlarının uygulanması, antibiyotik kullanımının denetlenmesi ve dirençli suşların hastalar arasında yayılmasının engellenmesi gerekmektedir (29,52,53).

Sürveyans: Sürveyans programları antimikrobiyal duyarlılık oranlarını, çeşitli mikroorganizma topluluklarında direncin artışı, aktarılmasını ve direnç genlerinin ekspresyonunu gözlemek için uygulanmaktadır. Yapılan çalışmalar, ülkemizde GSBL üretiminin Avrupa ülkeleri arasında en yüksek düzeylere ulaştığını göstermektedir (4). Bu yüksek düzeydeki sorunun kontrol edilebilmesi için sağlık kurumları kendi imkanlarının izin verdiği ölçüde teknik alt yapı oluşturmak zorundadır. Sağlık kurumları kendilerine en uygun GSBL saptama yöntemini uygulamalıdır (4).

Antibiyotik kullanımının kontrolü: Uygun olmayan dozlarda ve kısa süreli ya da aralıklı antibiyotik kullanımı dirençli mikroorganizmaların artmasına neden olmaktadır. Dirençli mikroorganizmalarla oluşan infeksiyonların mortalitesi yüksektir ve hastanede yatış süresini uzatarak tedavi maliyetinin de yükselmesine yol açmaktadır. Yapılan çalışmalarda geniş spektrumlu sefalosporinlerin özellikle seftazidimin yaygın kullanımı dirençli suşların seleksiyonuna ve GSBL yayılımına neden olmaktadır. Ampirik antibiyotik tedavilerinde üçüncü kuşak sefalosporinlerin kullanımının kısıtlanmasının GSBL üreten mikroorganizma sayısında azalmaya neden olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır. Ancak seftazidim kullanımının kısıtlandığı durumlarda tazobaktam/piperasilin gibi beta-laktam/beta-laktamaz kombinasyonları ve GSBL üreten mikroorganizmalarda ilk seçenek olan karbapenemlere karşı direnç oranlarının artabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle antibiyotik kullanım politikaları değiştirilmeden önce iyice düşünülmeli ve etkileri dikkatlice hesaplanmalıdır (4,52).

İzolasyon önlemleri: İzolasyon ve bariyer önlemleri GSBL üreten

mikroorganizmaların yayılmasını sınırlamada ve salgınların kontrolünde önemli yer tutmaktadır. Amerika Hastalıkları Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) GSBL üreten bakterilerinde içinde olduğu çoklu dirençli mikroorganizmalar için bu konuda önerilerde bulunmuştur (4). Bunlar;

1.Kayıt sistemi: Hastaya ait tıbbi kayıtlara ve yatak başı kartlarına GSBL uyarısı eklenmelidir.

2.Eğitim: Hastaların, hastane personelinin ve ziyaretçilerin, korunma önlemleri ve uygulamaları konusunda eğitilmeleri gerekmektedir.

3.Temas önlemleri: GSBL üreten suşlarla infekte hastalarla mümkünse diğer hastalarla ilgilenildikten sonra ilgilenilmelidir. Hastayla temastan önce ve sonra eller dezenfektan ile temizlenmelidir. Hastaya dokunurken veya ilgilenirken koruyucu önlük ve eldiven kullanılmalıdır. İmha edilmeden önce tüm klinik materyal ayrı bir bölmede muhafaza edilmelidir. Eller yıkanmadan, koruyucu giysiler değiştirilmeden hastadan hastaya geçiş yapılmamalıdır. Eğer mümkünse GSBL üreten mikroorganizmalarla infekte ve kolonize hastalar için ayrı tıbbi cihazlar kullanılmalıdır veya diğer hastalar için kullanmadan önce dezenfekte edilmelidir.

4.Diğer bölümlere ve hastanelere nakil durumlarında yapılması gerekenler: Mümkün olduğunca hasta nakilleri ve hareketleri önlenmelidir. Nakil gerekliyse hastayı kabul edecek bölüm çapraz kontaminasyonu en aza indirmek amacıyla gerekli önlemleri alması için uyarılmalıdır. Eğer mümkünse hasta en kısa sürede taburcu edilmelidir.

5.Hastanın yerleşimi: Eğer şartlar uygunsa hasta tek kişilik odaya yerleştirilmelidir ya da aynı mikroorganizma ile meydana gelen aktif infeksiyonlu hastalar aynı odaya yerleştirilmelidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji laboratuvarına 01 Ocak 2006 – 31 Aralık 2006 tarihleri arasında polikliniklerden ve yatan hastalardan gönderilen, çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş olan 217 *Klebsiella pneumoniae* suşu çalışmaya alındı. Hastalara ait birden fazla örnek çalışma dışında bırakıldı.

SUŞLARIN TANIMLANMASI

Çalışmaya dahil edilen suşlar, kanlı agar ve Eosin Metilen Blue (EMB) agara ekildi ve klasik mikrobiyolojik yöntemlerle tanımlandı. Oksidaz deneyi negatif, katalaz pozitif, EMB agarda laktoz pozitif, “Triple Sugar Iron “ (TSI) besiyerinde dipte ve yatıkta asit reaksiyon veren, sitrat pozitif, yarı katı besiyerinde hareketsiz, indol ve metil kırmızısı deneyi negatif, Voges Proskauer pozitif, üreaz aktivitesi pozitif gram negatif basiller *K.pneumoniae* olarak adlandırıldı (54,55). Gerek duyulduğunda API 20E (bioMerieux®, Fransa) tanımlama kiti kullanıldı.

ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞI

Çalışmaya alınan *K.pneumoniae* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları CLSI önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle çalışıldı. Antibiyotik duyarlılıkları ampisilin (AM 10 µg), sefalotin (KF 30 µg), amikasin (AK 30 µg), amoksisilin-klavulanik asit (AMC 20/10 µg), piperasilin-tazobaktam (TZP 100/10 µg), sefuroksim (CXM 30 µg), sefoksitin (FOX 30 µg), sefotaksim (CTX 30 µg), seftriakson (CRO 30 µg), siprofloksasin (CIP 5 µg), imipenem (IMP 10 µg), trimetprim-sülfometaksazol (SXT 1.25/23.75 µg), aztreonam (ATM 30 µg), seftazidim (CAZ 30 µg), netilmisin (NET 30 µg), tobramisin (TOB 10 µg) antibiyotik diskleri ile test edildi (56).

Bakterilerin 0,5 McFarland eşeline uygun suspansiyonları hazırlandı ve Mueller-Hinton agar plaklarına steril eküvyonla ekimleri yapıldı. Diskler yerleştirildikten sonra 35°C’de 18 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda zon çapları ölçülerek CLSI kriterlerine göre duyarlı (S) ve dirençli (R) olarak değerlendirildi. Orta duyarlı suşlar dirençli olarak kabul edildi. Antibiyotik

duyarlılıkları için kontrol suş olarak *E.coli* ATCC 25922 kullanıldı.

GSBL ÜRETİMİNİN DOĞRULAMA TESTLERİYLE ARAŞTIRILMASI

K.pneumoniae suşları kanlı agar ve EMB besiyerine ekimleri yapıldı ve 35°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Çift Disk Sinerji (ÇDST) ve CT/CTL E-Test yöntemleriyle GSBL incelenmesi için Mueller-Hinton Agar (MHA) kullanıldı. Tüm testlerde negatif kontrol olarak ATCC 25922 *E.coli* ve pozitif kontrol olarak ATCC 700603 *K.pneumoniae* standart suşu kullanıldı (43).

GSBL VARLIĞININ ÇİFT DİSK SİNERJİ TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

Bu amaçla 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri suspansiyonları Mueller-Hinton agar yüzeyine yayıldı, besiyeri merkezine amoksisilin-klavulanik asit (AMC) diski konuldu, ondan 30 mm uzaklıkta olacak şekilde seftriakson (CRO), seftazidim (CAZ), sefotaksim (CTX) ve aztreonam (ATM) diskleri yerleştirildi. Plaklar 35°C'de 18-24 saatlik inkubasyonu takiben CRO, CAZ, CTX veya ATM inhibisyon zonlarında AMC diskinde doğru belirgin genişleme olması veya iki inhibisyon zonu arasındaki bakteri üreyen alanda üremenin inhibe olduğu bir bölgenin görülmesi GSBL pozitifliği olarak kabul edildi (43). İnhibisyon zonu oluşmadığında veya küçük zon oluştuğunda disk aralıkları 20 mm'ye düşürülmüş, zon çapları büyük olduğunda ise 40 mm'ye çıkarılarak test tekrar edilmiştir.

GSBL VARLIĞININ E-TEST YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

GSBL varlığı ticari olarak hazırlanmış bir ucunda sefotaksim ve diğer ucunda sefotaksim-klavulanik asit bulunan E-test şeritleri (AB Biodisk®, Solna, İsveç) ile araştırıldı. %0.85 steril NaCl içinde 0,5 McFarland standardı bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonları, 9 cm çaplı petrilere 4 mm kalınlıkta hazırlanmış Mueller-Hinton besiyerine eküvyonla ekildi. 15 dakika oda ısısında bekletildikten sonra E-test stripleri yerleştirildi. Plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. CLSI önerileri doğrultusunda sefotaksim/klavulanik asit MİK değerinde, sefotaksim MİK değerine göre 8 kat ve üzerinde azalma olduğunda veya sefotaksim inhibisyon elipsindeki deformasyonlar GSBL pozitif, aksi ise GSBL negatif kabul edildi (43).

PCR İLE CTX-M ARAŞTIRILMASI

Bakteri DNA'sının elde edilmesinde DNA saflaştırma kiti (Fermantas KO512 Genomic DNA Purification Kit[®]) kullanıldı ve üretici firmanın talimatları doğrultusunda DNA ekstraksiyonu yapıldı.

DNA EKSTRAKSİYONU

- 37°C'de 24 saatte kanlı agarda üreyen izolatlar 2 ml distile su içerisine 10-20 mg olacak şekilde süspanse edildi.
- Hazırlanan suspansiyon 1,5 ml'lik ependorf tüplerde 7500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısım atıldı ve 200 µl "nükleaz free" distile su ilave edildi.
- Üzerine 400 µl lizis solüsyonu ilave edildi, karıştırılarak vortekslendi ve 65°C de 5 dakika inkübasyona bırakıldı
- Karışıma hemen 600 µl kloroform ilave edildi ve hafifçe alt üst edilerek 10000 rpm 'de 2 dk santrifüj edildi
- 720 µl distile su ile 80 µl 10X presipitasyon solusyonu karıştırıldı.
- Yeni bir tüpe DNA içeren üst kısımdaki sıvı aktarıldı ve hazırlanmış olan 800 µl presipitasyon solüsyonu eklendi. 1-2 dakika oda ısısında karıştırılarak 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra DNA pelleti 100 µl 1.2 M NaCl ile çözdürüldü ve 300 µl soğuk etanol eklendi.
- 10 dakika -20°C'de presipite olması beklendi.
- 10000 rpm de 3-4 dakika santrifüj edildi.
- Etanol pipetle uzaklaştırıldı.
- DNA pelleti 100 µl "nükleaz free" distile su ile tamamen çözdürüldü.

Örneklerin elde edilmiş olan DNA'ları kullanılıncaya kadar derin dondurucuda -20°C'de saklandı ve amplifikasyon öncesi çıkarılarak çözümleri beklendi.

PCR AMPLİFİKASYONU

Nukleotid dizisi ve ampikon büyüklükleri belirlenen universal ve grup primer dizileri Vivantis[®] (Canada) firmasına sentez ettirildi (Tablo-4) (57).

Tablo 4 : Çalışmada kullanılan primerler ve amplicon büyüklükleri

Primer	Nukleotid dizisi	Amplicon büyüklüğü
CTX-M-UNI-V	5'-CVATGTGCAGYACCAGTAA-3'	585 bp
CTX-M-UNI-R	5'-ARGTGACCAGAAYMAGCGG-3'	
CTX-1-F	5-CCCATGGTTAAAAAATCACTG -3	891 bp
CTX-1-R	5-CCGTTTCCGCTATTACAAAC -3	
CTX-2-F	5-ATGATGACTCAGAGCATTCGC-3	893 bp
CTX-2-R	5-TCGCTCCATTTATTGCATCA-3	
CTX-8-F	5-ATGTTAATGACGACAGCCTGTG-3	689 bp
CTX-8-R	5-CCGGTTTTATCCCCGACA-3	
CTX-9-F	5-GATTGACCGTATTGGGAGTTT-3	864 bp
CTX-9-F	5-TATTGAGAGTTACAGCCCTTCG-3	

Elde edilen bakteri DNA'sına (2 µl), PCR karışımı (48 µl) ilave edilerek PCR cihazına (Bio-Rad®) yüklendi. Cihaz kullanılan primere göre programlandı (Tablo 5,6,7) (57).

Tablo 5 : CTX-M universal ve grubunun araştırılmasında hazırlanan PCR karışımı

PCR karışımı	Miktar
"Nükleaz free" distile su	34.25 µl
10X PCR buffer	5 µl
dNTP(2 mM)	1.25 µl
25 mM MgCl	5 µl
Taq polimeraz	0.5 µl
Primer 1 (50 pmol)	1 µl
Primer 2 (50 pmol)	1 µl
Bakteri DNA'sı	2 µl
TOPLAM HACİM	50 µl

Tablo 6 : Universal primerler için PCR döngü ve parametreleri

Başlangıç denatürasyon	95 °C	5 dk	
Denatürasyon	94 °C	45 sn	} 35 döngü
Primer bağlanması	61 °C	45 sn	
Primer uzaması	72 °C	45 sn	
Ek uzama	72 °C	10 dk	

Tablo 7 : Grup primerleri için PCR döngü ve parametreleri

Başlangıç denatürasyon	95 °C	5 dk	
Denatürasyon	94 °C	50 sn	} 30 döngü
Primer bağlanması	50 °C	40 sn	
Primer uzaması	72 °C	60 sn	
Ek uzama	72 °C	10 dk	

“RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA” (RAPD-PCR) İLE KLONAL İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Enterobacteriaceae ailesi suşlarına özgü bir primer olan ERIC-1 ve ERIC-2 (Metis Biyoteknoloji) ile CTX-M pozitif tesbit edilen suşlara RAPD-PCR uygulandı. Profiller, eşit sayıda ve büyüklükte bant varlığı saptanması halinde birbirinin aynı, iki veya daha fazla sayıda değişik bant varsa birbirinden farklı olarak kabul edildi (Tablo-8,9,10) (58).

Tablo 8 : RAPD-PCR için kullanılan primerler

Primer	Nukleotid dizisi
ERIC-1	(5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3')
ERIC-2	(5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3')

Tablo 9 : RAPD-PCR için reaksiyon karışımı

PCR karışımı		
“Nucleas free”distile su	24	µl
10X PCR buffer	5	µl
dNTP(2 mM)	10	µl
25 mM MgCl	5	µl
Taq polimeraz	1	µl
Primer 1 (50 pmol)	1,5	µl
Primer 2 (50 pmol)	1,5	µl
Bakteri DNA'sı	2	µl
TOPLAM HACİM	50	µl

Tablo 10 : RAPD-PCR için PCR döngüsü ve parametreleri

Başlangıç denatürasyon	94°C	5 dk	
	36 °C	1 dk	
Denatürasyon	94 °C	1 dk	} 30 döngü
Primer bağlanması	36 °C	1.5 dk	
Primer uzaması	72 °C	3 dk	
Ek uzama	72 °C	10 dk	

AMPLİFİKASYON ÜRÜNLERİNİN GÖSTERİLMESİ

PCR ÜRÜNLERİNİN GÖSTERİLMESİ

Sonuçların değerlendirilmesinde agaroz jel elektroforez yöntemi kullanıldı ve 1X TBE içinde %2 agaroz jel hazırlandı. Bunun için:

- 1 gr agaroz üzerine 50 ml TBE tamponu eklendi ve manyetik ısıtıcıda eritildi.
- 50°C'ye soğuyunca agaroz içerisine 5 µl etidium bromid ilave edilerek iyice karıştırıldı ve önceden tarakları yerleştirilen elektroforez tankına konularak katılması beklendi. Üzerine örtecek kadar TBE tamponu ilave edildi.
- Tarak çıkarıldıktan sonra ilk kuyucuğa moleküler ağırlık standartı (100 bp

DNA marker Q-Ladder, Heliosis[®]), ikinci kuyucuğa pozitif kontrol (Pozitif CTX-M-15 izolatı İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD'dan Sayın Prof. Dr. Çiğdem Bal'dan temin edilmiştir), üçüncü kuyucuğa negatif kontrol eklendi. Diğer kuyucuklara amplifikasyon ürünlerinden 5'er µl sırası ile alınıp 2 µl yükleme boyası ile karıştırıldıktan sonra her kuyucuğa 5'er µl yüklendi.

- Ardından 150 V'da 20 dakika elektroforez uygulandı.
- Elektroforez sonrası jeldeki bantlar Imaging System EL LOGIC 2200 (Kodak[®]) görüntüleme sisteminde 280-340 nm dalga boyunda incelendi. Bant büyüklükleri, büyüklük "marker"ı ve pozitif kontrol ile karşılaştırıldı.
- Imaging System EL LOGIC 2200 (Kodak[®]) görüntüleme sistemini ile dijital olarak fotoğraflar çekildi.

RAPD-PCR ÜRÜNLERİNİN GÖSTERİLMESİ

Sonuçların değerlendirilmesinde agaroz jel elektroforez yöntemi kullanıldı ve 1X TBE içinde %2 agaroz jel hazırlandı. Bunun için:

- 1 gr agaroz üzerine 50 ml TBE tamponu eklendi ve manyetik ısıtıcıda eritildi.
- 50°C'ye soğuyunca agaroz içerisine 5 µl etidium bromid ilave edilerek iyice karıştırıldı ve önceden tarakları yerleştirilen elektroforez tankına konularak katılaşması beklendi. Üzerine örtecek kadar TBE tamponu ilave edildi.
- Tarak çıkarıldıktan sonra ilk ve son kuyucuklara moleküler ağırlık standartı (100 bp DNA marker Q-Ladder, Heliosis[®]), diğer kuyucuklara amplifikasyon ürünlerinden 5'er µl sırası ile alınıp 2 µl yükleme boyası ile karıştırıldıktan sonra her kuyucuğa 5'er µl yüklendi.
- Ardından 100 V'da 60 dakika elektroforez uygulandı.
- Elektroforez sonrası jeldeki bantlar Imaging System EL LOGIC 2200 (Kodak[®]) görüntüleme sisteminde 280-340 nm dalga boyunda incelendi.
- Imaging System EL LOGIC 2200 (Kodak[®]) görüntüleme sistemini ile dijital olarak fotoğraflar çekildi.

İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Araştırma verilerinin kodlanarak bilgisayarda değerlendirilmesinde "SPSS for Windows Ver. 11.0" paket programı kullanıldı. *K.pneumoniae* ve GSBL pozitif suşların, kliniklere, örneklere ve antibiyotik direnç hesaplamalarında yüzde, ÇDST

ve E-test arasındaki uyum için kappa analizi, GSBL ve CTX-M beta-laktamaz'ı etkileyen faktörleri saptamada ki-kare testleri (Pearson chi-square, Continuity correction, Fisher's exact test) uygulandı. p değerinin <0.05 olması anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 01 Ocak 2006 – 31 Aralık 2006 tarihleri arasında polikliniklerden ve yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen toplam 217 *Klebsiella pneumoniae* suşu çalışmaya alındı.

Suşların 58'i çocuk hastalıkları servisinden, 51'i yoğun bakım ünitesinden, 39'u cerrahi bilimlerden, 29'u dahili bilimlerden, 24'ü çocuk acilden, 9'u çocuk cerrahisinden, 7'si acil servisten gönderilen örneklerden izole edildi (Tablo-11).

Tablo 11 : *K. pneumoniae* suşlarının kliniklere göre dağılımı

Gönderilen klinik	sayı	%
Çocuk hastalıkları	58	26.7
Yoğun bakım ünitesi	51	23.5
Cerrahi bilimler	39	18.0
Dahili bilimler	29	13.4
Çocuk acil	24	11.1
Çocuk cerrahisi	9	4.1
Acil	7	3.2
Toplam	217	100.0

Suşların 152'si idrar, 20'si balgam, 14'ü yara yeri sürüntü örneği, 13'ü kan, 9'u trakeal aspirat sıvısı, 3'ü BOS, 3'ü göbek sürüntüsü, 3'ü göz sürüntüsü örneklerinden izole edildi (Tablo-12).

Tablo 12 : *K.pneumoniae* suşlarının örneklere göre dağılımı

Örnek	sayı	%
İdrar	152	70.0
Balgam	20	9.2
Yara yeri sürüntüsü	14	6.5
Kan	13	6.0
Trakeal aspirat	9	4.1
B.O.S	3	1.4
Göz	3	1.4
Göbek	3	1.4
Toplam	217	100.0

K.pneumoniae suşlarının 128'i (%59.0) yatan hastalardan, 89'u (%41.0) poliklinik hastalarından izole edildi.

Suşların 88'i (%40.6) erkek, 129'u (%59.4) kadın hastalardan izole edildi.

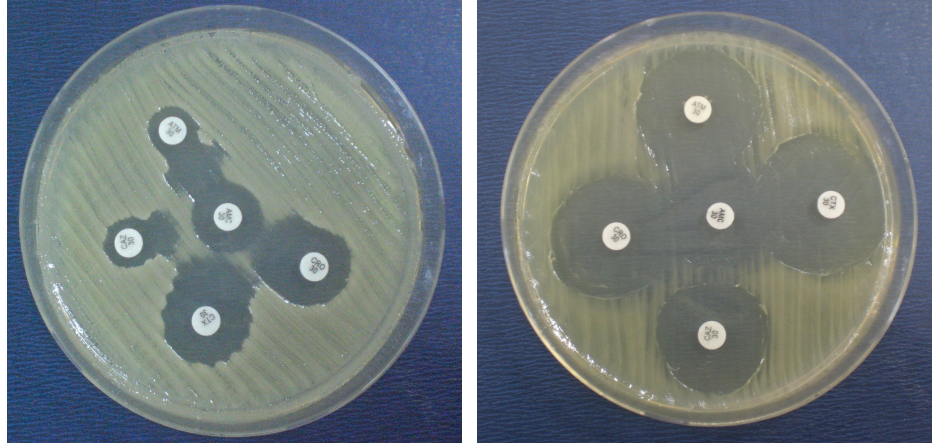
K.pneumoniae suşlarında; sefolotin'e %64.5, tobramisin'e %61.3, AMC'a %59, sefuroksim'e %52.1, sefaperazon'a %48.8, sefotaksim'e %48.4, aztreonam'a %47.5, seftriakson'a %46.1, seftizoksime %41.5, trimetoprim-sülfometaksozol'e %34.6, netilmisin'e %30.9, amikasin'e %12.4, siprofloksasin'e %11.5 oranında direnç saptandı. Tüm suşlar içinde imipenem'e direnç tesbit edilmezken en dirençli antibiyotiğin sefalotin olduğu tesbit edildi (Tablo-13).

Tablo 13 : *K.pneumoniae* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılıkları

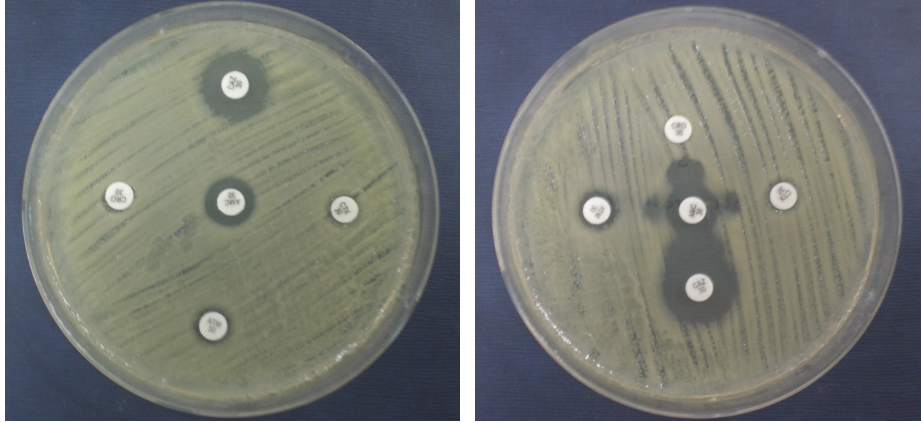
Antibiyotik	Duyarlı		Dirençli	
	n	%	n	%
İmipenem	217	100	0	0.0
Siprofloksasin	192	88.5	25	11.5
Amikasin	190	87.6	27	12.4
TZP	166	76.5	51	23.5
Sefoksitin	165	76.0	52	24.0
Netilmisin	150	69.1	67	30.9
SXT	142	65.4	75	34.6
Gentamisin	136	62.7	81	37.3
Tobramisin	133	61.3	84	38.7
Seftizoksim	127	58.5	90	41.5
Seftriakson	117	53.9	100	46.1
Aztreonam	114	52.5	103	47.5
Sefotaksim	112	51.6	105	48.4
Seftazidim	112	51.6	105	48.4
Sefaperazon	111	51.2	106	48.8
Sefuroksim	104	47.9	113	52.1
AMC	89	41.0	128	59.0
Sefalotin	77	35.5	140	64.5
Ampisilin	13	6.0	204	94.0

GSBL ARAŞTIRMA SONUÇLARI

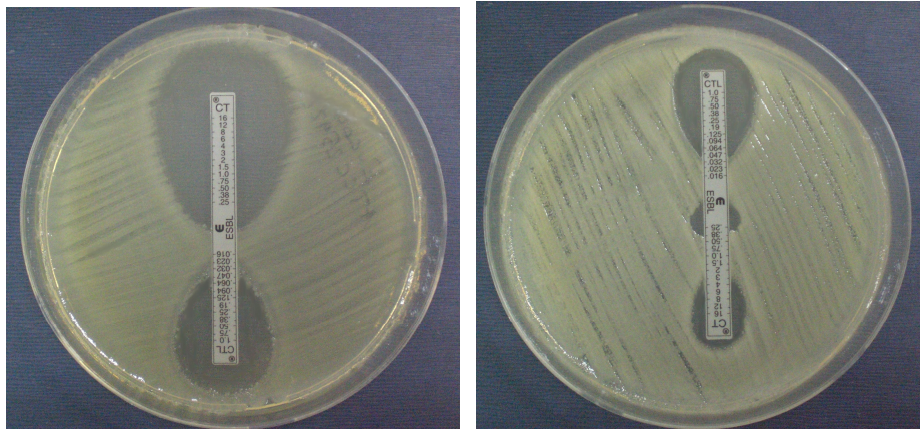
Bir yıllık süreç içinde izole edilen *K.pneumoniae* suşlarında çift disk sinerji yöntemi ile 87 (% 40.1) suшта GSBL tesbit edildi (Şekil-3). ÇDST'inde diskler arası mesafe 20 mm'ye indirildiğinde, 9 suşta GSBL pozitifliği gösterildi (Şekil-4). CT/CTL E-test yöntemi ile 86 (%39.6) suшта GSBL tesbit edildi (Şekil-5). GSBL tesbitinde, ÇDST ile E-Test metodu arasında, kapa analizi ile %99 uyum saptandı. E-Test ile CT MİK değerleri 2 µg/ml ile >16 µg/ml, CTL MİK değerleri 0.032 µg/ml ile 0.5 µg/ml arasında bulundu.



Şekil 3 : Çift disk sinerji testi ile GSBL pozitif *K.pneumoniae* ATCC 700603 (solda), GSBL negatif *E.coli* ATCC 25922 (sağda)



Şekil 4 : Disk yaklaşırma yöntemi ile GSBL'nin gösterilmesi
Sol: Diskler arası mesafe 30 mm, Sağ: Diskler arası mesafe 20mm



Şekil 5 : CT/CTL E-test yöntemi ile GSBL negatif *E.coli* ATCC 25922 (solda), GSBL pozitif *K.pneumoniae* ATCC 700603 (sağda)

GSBL pozitifliği en fazla yoğun bakım ünitesinden (%37.9) ve çocuk hastalıkları servisinde (%29.9) gönderilen örneklerde gözlemlendi (Tablo-14). Yoğun bakım örneklerinin 27'si (%81.8) yenidoğan yoğun bakım ünitesinden, 6'sı (%18.2) anestezi yoğun bakım ünitesinden izole edildi.

Tablo 14 : GSBL pozitif izolatların kliniklere göre dağılımı

Klinik	GSBL pozitif	
	n	%
Yoğun bakım	33	37.9
Çocuk hastalıkları	26	29.9
Cerrahi bilimler	11	12.6
Çocuk acil	9	10.3
Çocuk cerrahi	4	4.6
Dahili bilimler	3	3.4
Acil	1	1.1
Toplam	87	100.0

GSBL pozitif örneklerin %67.8'i idrar, %10.3'ü kan, %6.9'u trakeal aspirat sıvısı, %5.7'si balgam, %3.4 BOS, %3.4 yara yeri sürüntüsü, %2.3'ü göz sürüntü kültürlerinden izole edildi (Tablo-15).

Tablo 15 : GSBL pozitif izolatların örneklere göre dağılımı

Örnek	GSBL pozitif	
	n	%
İdrar	59	67.8
Kan	9	10.3
Trakeal aspirat	6	6.9
Balgam	5	5.7
BOS	3	3.4
Yara yeri sürüntüsü	3	3.4
Göz	2	2.3
Toplam	87	100.0

GSBL pozitifliği yatan hastaların 76'sından (%87.4), poliklinik hastalarının 11'den (%12.6) izole edildi. 5 hastanın, bakterinin izole edildiği tarihten önceki 4 ay içinde hastaneye yatışı tesbit edildi. GSBL'ın yatan hastalardaki sıklığı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde GSBL pozitifliğinin yatan hastalarda anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü ($p < 0.001$).

GSBL pozitif suşların 34'ü (%39.1) erkek, 53'ü (%60.9) kadın hastalardan izole edilmiştir. GSBL pozitifliği ile cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$).

GSBL oluşturan bütün suşların imipeneme duyarlı olduğu tesbit edildi. Etkili diğer antibiotiklerin siprofloksasilin (%81.6), amikasin (%74.7), TZP (%57.5) ve sefoksitin (%54.0) olduğu görüldü. GSBL negatif suşlarda da imipeneme direnç gözlenmezken etkili diğer antibiyotiklerin siprofloksasilin (%93.1), amikasin (%96.2), TZP (%89.2) ve sefoksitin (% 90.8) olduğu tesbit edildi. GSBL oluşturan ve oluşturmayan *K.pneumoniae* suşlarının netilmisin, amikasin, siprofloksasin, AMC, tobramisin, TZP, gentamisin ve sefoksitin direnç oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.001$). GSBL oluşturan ve oluşturmayan *K.pneumoniae* suşlarında SXT direnç oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p = 0.084$) (Tablo-16).

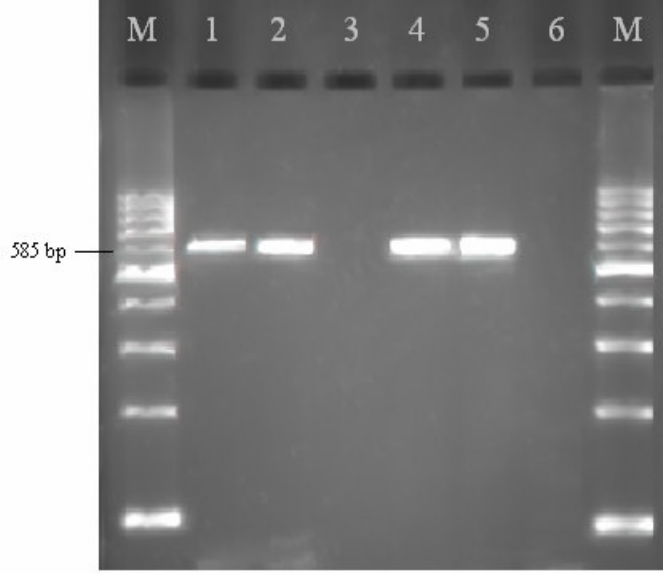
Tablo 16 : GSBL pozitif ve negatif suşların antibiyotiklere duyarlılıkları

Antibiyotik	GSBL pozitif				GSBL negatif				p
	Duyarlı		Dirençli		Duyarlı		Dirençli		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
İmipenem	87	100.0	0	0.0	130	100.0	0	0.0	*
Siprofloksasin	71	81.6	16	18.4	121	93.1	9	6.9	0.01
Amikasin	65	74.7	22	25.3	125	96.2	5	3.8	<0.001
SXT	51	58.6	36	41.4	91	70.0	39	30.0	0.084
TZP	50	57.5	37	42.5	116	89.2	14	10.8	<0.001
Sefoksitin	47	54.0	40	46.0	118	90.8	12	9.2	<0.001
Netilmisin	33	37.9	54	62.1	117	90.0	13	10.0	<0.001
Gentamisin	26	29.9	61	70.1	110	84.6	20	15.4	<0.001
Tobramisin	22	25.3	65	74.7	111	85.4	19	14.6	<0.001
AMC	14	16.1	73	83.9	75	57.7	55	42.3	<0.001

*İmipenem tüm suşlarda duyarlı olduğundan teste alınmadı.

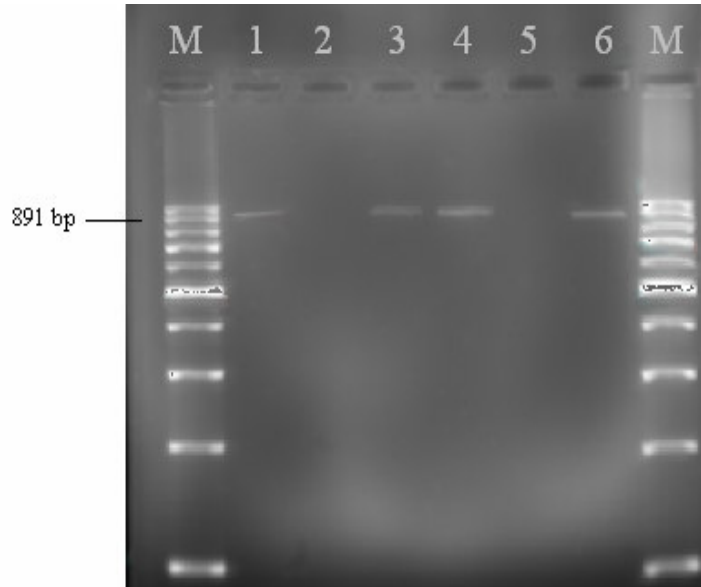
PCR SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

CTX-M Universal primerler kullanılarak GSBL tesbit edilen 87 suş PCR ile çalışıldı. GSBL pozitif *K.pneumoniae* suşlarının 19'unda (%22.9) CTX-M pozitif bulundu. Pozitif kontrol ve CTX-M pozitif suşlarda 585 bp hizasında bant tesbit edildi (Şekil-6).



Şekil 6 : PCR ile CTX-M genlerinin agaroz jeldeki görüntüsü
M: 100 bp'lik moleküler ağırlık standardı, 1: Pozitif kontrol, 3: Negatif kontrol,
2,4,5. Pozitif suş, 6: Negatif suş

CTX-M universal primerleri ile pozitif bulunan 19 suşda, sırasıyla grup-1, grup-2, grup-3 ve grup-4 araştırıldı. Suşların tamamının grup-1'de olduğu görüldü. Pozitif kontrol ve grup-1 pozitif suşlarda 891 bp hizasında bant tesbit edildi. (Şekil-7).



Şekil 7 : PCR ile CTX-M grup 1 genlerinin agaroz jeldeki görüntüsü
M: 100 bp'lik moleküler ağırlık standardı, 1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol,
3,4,6 : Pozitif suş, 5: Negatif suş

CTX-M Grup-1 pozitif 19 suşun 8'i (%42.1) çocuk yoğun bakımdan, 5'i (%26.3) çocuk hastalıkları servisinden, 3'ü anestezi yoğun bakım ünitesinden, 1'er tanede (%5.3) cerrahi bilimler, çocuk acil ve çocuk cerrahi servisinden izole edildiği tesbit edildi (Tablo-17).

Tablo 17 : CTX-M pozitif suşların kliniklere göre dağılımı

Klinikler	CTX-M	
	n	%
Çocuk yoğun bakım ünitesi	8	42.1
Çocuk hastalıkları servisi	5	26.3
Anestezi yoğun bakım ünitesi	3	15.8
Cerrahi bilimler	1	5.3
Çocuk acil	1	5.3
Çocuk cerrahisi servisi	1	5.3
Toplam	19	100.0

CTX-M Grup-1 pozitif 19 suşun 11'i (%57.9) idrar, 3'ü (%15.8) kan, 3'ü (%15.8) trakeal aspirat sıvısından, 1'i (%5.3) balgam ve 1'i (%5.3) yara yeri sürüntü örneklerinden izole edildi (Tablo-18).

Tablo 18 : CTX-M pozitif suşların örneklere göre dağılımı

Materyal	CTX-M	
	n	%
İdrar	11	57.9
Kan	3	15.8
Trakeal aspirat	3	15.8
Balgam	1	5.3
Yara	1	5.3
Toplam	19	100.0

CTX-M Grup-1 pozitif 19 suşun en fazla AMC'a (%94.7) ve netilmisine

(%89.5) dirençli olduğu görüldü. İmipeneme direnç gözlenmezken, en az direnç siprofloksasinde (%26.3) tesbit edildi. CTX-M negatif suşlarda en fazla AMC'da (%80.9) ve tobramisinde (%72.1), en az direnç siprofloksasinde (%16.2) tesbit edildi. TZP'e CTX-M negatif suşlarda %16.8, CTX-M pozitif suşlarda % 63.2 direnç tesbit edildi. CTX-M pozitif ve negatif suşlar arasında siprofloksasin, amikasin, gentamisin, tobramisin ve SXT'de istatistiksel olarak anlamlı fark tesbit edilmedi ($p>0.05$). CTX-M pozitif ve negatif suşlar arasında netilmisin direncinde ($p=0.005$) ve TZP direncinde ($p=0.04$) istatistiksel olarak anlamlı fark tesbit edildi (Tablo-19).

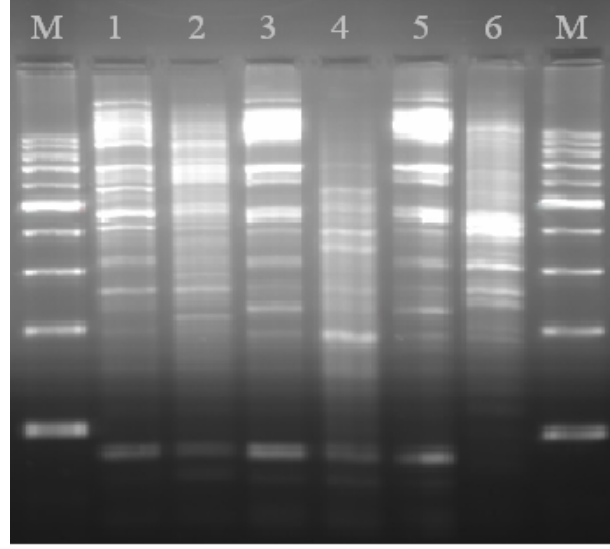
Tablo 19 : CTX-M pozitif ve negatif suşların çeşitli antibiotiklere direnç oranları

Antibiyotik	CTX-M Pozitif				CTX-M Negatif				p
	Duyarlı		Dirençli		Duyarlı		Dirençli		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Siprofloksasin	14	73.7	5	26.3	57	83.8	11	16.2	0.313
Amikasin	11	57.9	8	42.1	54	79.4	14	20.6	0.056
Gentamisin	3	15.8	16	84.2	23	33.8	45	66.2	0.129
Netilmisin	2	10.5	17	89.5	31	45.6	37	54.4	0.005
Tobramisin	3	15.8	16	84.2	19	27.9	49	72.1	0.281
SXT	11	57.9	8	42.1	40	58.8	28	41.2	0.942
AMC	1	5.3	18	94.7	13	19.1	55	80.9	0.146
TZP	7	36.8	12	63.2	43	83.2	25	16.2	0.04
İmipenem	19	100.0	0	0.0	19	100.0	0	0.0	*

*İmipenem tüm suşlarda duyarlı olduğundan teste alınmadı.

RAPD-PCR İLE KLONAL İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Enterobacteriaceae ailesine özgü bir primer olan ERIC-1 ve ERIC-2 primeri ile yapılan RAPD-PCR sonucunda, CTX-M grup-1 pozitif olduğu belirlenen *K.pneumoniae* suşlarında agaroz jelde oluşturduğu bantlara göre 11 ayrı grup tesbit edildi (Şekil-8).



Şekil 8 : RAPD- PCR sonuçlarının agaroz jeldeki görüntüsü.

M: 100 bp'lik moleküler ağırlık standardı, 1-6 çocuk servisinden izolen edilen suşlar

Suşlar gösterdikleri bant profillerine, izole edildikleri kliniklere ve tarihe göre sınıflandırıldı (Tablo-20). Buna göre *K.pneumoniae* suşları arasında en sık rastlanan grubun Kp 3 (n=3), Kp 4 (n=3) ve Kp 5 (n=3) olduğu saptandı. Çocuk yoğun bakım ünitesindeki 8 suşun 5'inin, çocuk servisindeki 5 suşun 4'ünün aynı, diğer servislerdeki suşların farklı bant paternleri gösterdiği tesbit edildi.

Tablo 20 : RAPD PCR ile suşların gruplandırılması

RAPD GRUP	SERVİS	İZOLASYON TARİHİ
Kp 1	Cerrahi bilimler	22.05.2006
Kp 2	Çocuk acil	26.11.2006
Kp 3	Çocuk hastalıkları servisi	04.12.2006
Kp 3	Çocuk yoğun bakım	16.06.2006
Kp 3	Çocuk yoğun bakım	09.11.2006
Kp 4	Çocuk hastalıkları servisi	13.11.2006
Kp 4	Çocuk hastalıkları servisi	03.05.2006
Kp 4	Çocuk yoğun bakım	13.12.2006
Kp 5	Çocuk yoğun bakım	09.08.2006
Kp 5	Çocuk hastalıkları servisi	20.09.2006
Kp 5	Çocuk yoğun bakım	10.08.2006
Kp 6a	Çocuk yoğun bakım	14.02.2006
Kp 6b	Çocuk yoğun bakım	26.02.2006
Kp 7	Anestezi yoğun bakım	21.08.2006
Kp 8	Anestezi yoğun bakım	27.08.2006
Kp 9	Anestezi yoğun bakım	26.06.2006
Kp 10	Çocuk yoğun bakım	10.01.2006
Kp 11	Çocuk cerrahisi servisi	21.09.2006
Kp 12	Çocuk hastalıkları servisi	20.11.2006

TARTIŞMA

K. pneumoniae, gerek infeksiyon etkeni ve gerekse kolonizan bakteri olarak hasta örneklerinden sıkça izole edilmektedir. Hastane kökenli *K.pneumoniae* suşları birçok antibiyotiğe dirençlidir. 1970'li yıllarda bu suşların çoğu sadece aminoglikozid grubu antibiyotiklere dirençli suşlar iken 1980'li yıllarda *Klebsiella* ve *E.coli*'lerde belirlenen bazı enzimlerin yeni kuşak sefalosporinler ve aztreonamı inaktive ettiği gözlenmiştir. TEM-1, TEM-2 veya SHV-1 enzimlerinden köken alan bu enzimler GSBL olarak adlandırılmıştır (59-61).

GSBL'ler ilk olarak Avrupa'dan, daha sonra artarak dünyada diğer bölgelerden bildirilmiştir. Pek çok patojen gram negatif bakteride tespit edilse de GSBL enzimleri en yüksek oranda *K.pneumoniae* izolatlarında görülmektedir (62). Yoğun beta-laktam antibiyotik kullanımı, invaziv girişimler, kateterizasyon, geniş yanıklar ve büyük cerrahi müdahaleler GSBL için başlıca risk faktörleridir (63,64). Türkiye'de GSBL sentezleyen izolatlar ilk kez 1992 yılında bildirildiği belirtilmiştir (65).

GSBL üreten *K.pneumoniae* izolatları, GSBL genlerinin diğer türlere ve cinslere aktarımından sorumludur. GSBL üreten *K.pneumoniae* izolatlarının, aynı zamanda çoklu ilaca dirençle de ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu yüzden hastanelerde GSBL üreten *K.pneumoniae* izolatlarının tanımlanması, uygun şekilde tedavi edilmesi ve kontrol önlemlerinin alınması gerekmektedir (59, 66).

Gram negatif bakterilerde GSBL saptanması için farklı testler geliştirilmiştir. CLSI, GSBL doğrulama testi olarak sefalosporin ve sefalosporinle kombine klavulanik asit disklerinin kullanıldığı disk difüzyon ve mikrodilüsyon testlerini önermektedir (56). Bu testlerin yanı sıra farklı araştırmacılar tarafından geliştirilmiş testler de günümüzde hem araştırma amaçlı laboratuvarlarda hem de rutin laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Bu testlerden, çift disk sinerji testi ve E-test araştırmamızda değerlendirilmiştir.

GSBL saptanmasında en yaygın kullanılan yöntem olan çift disk sinerji testi ilk

kez 1988 yılında Jarlier tarafından tanımlanmıştır (68). Bu test amoksisilin-klavulanik asit diskinin etrafına yerleştirilen sefalosporin disklerinin zonlarında klavulanik asit diskinin doğru genişleme görülmesi esasına dayanmaktadır. Bu testin yapılabilmesi için beta-laktamaz içeren bir antibiyotik diski ile sefalosporin diskleri yeterli olmaktadır. Testte yer alan disklerin çoğu zaten rutin antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılan ve test edilmesi gereken antibiyotiklere ait olduğu için ek mali yük getirmez ve fazladan zaman harcanmasına gerek yoktur. Ancak amoksisilin-klavulanat ve sefalosporin diskleri arasındaki uzaklık ve enzim substrat profili testin duyarlılığını önemli ölçüde etkileyebilmektedir (67-69). Çift disk sinerji yönteminde diskler uygun uzaklıkta yerleştirilmediğinde sinerjik etki gözlenememekte ve bu da testin tekrarına veya sonuçların yanlış olarak negatif değerlendirilmesine sebep olmaktadır. Thomson ve arkadaşları yaptıkları çalışmada çift disk sinerji testinde diskler arası uzaklık 30 mm'den 20 mm'ye yaklaştırıldığında testin duyarlılığının %79'dan %82'ye çıktığını bulmuşlardır (70).

Ho ve ark. 2000 yılında *E.coli* ve *Klebsiella* suşları ile yaptıkları araştırmada çift disk sinerji testinde uzaklık 30 mm'den 25 mm'ye yaklaştırıldığında duyarlılığın %83.8'den %97.9'a çıktığını ve kalan suşlar 20 mm uzaklıkta tekrar test edildiğinde üç suşta daha GSBL üretimi olduğunu saptamışlardır (71).

Çalışmamızda, sefalosporin diskleri AMC diskinden 30 mm uzağa yerleştirildiğinde 78 suşta, 20 mm uzağa yerleştirildiğinde ise 87 suşta GSBL tesbit edildi. Çalışmamızdan elde edilen bu verilere dayanılarak çift disk sinerji testinde diskler arası uzaklığın 20 mm olarak uygulanması ile GSBL saptama oranının daha fazla olacağı kanısına varıldı.

GSBL varlığına ilişkin veriler yıldan yıla, ülkeden ülkeye, bir ülkenin çeşitli bölgelerinde hatta hastaneden hastaneye farklılık göstermektedir (72-74). 1993'te "National Nosocomial Infection Study System"de test edilen *K.pneumoniae* suşlarının %5'inin GSBL pozitif izolatlar olduğu rapor edilmiştir (75). Avrupa'da ise bu oran daha yüksektir. 2000 yılında Fransa ve İngiltere'de yapılan bir çalışmada *Klebsiella* suşlarının %14-16'sının GSBL üreten suşlar olduğu ortaya konmuştur. Bazı bölge ve hastanelerde bu oran %25-40'a ulaştığı belirtilmektedir (60).

Türkiye’de yapılan çalışmalarda *K.pneumoniae* suşlarında GSBL sıklığı %40-90 arasında değişmektedir (76). Abacıoğlu ve ark. yenidoğan ünitesinde 34 hasta arasında gözlenen salgında etiyolojik ajan olarak GSBL oluşturan *K.pneumoniae* soyutlamışlardır (77).

Ülkemizde bu konu ile ilgili olarak çeşitli merkezlerde yapılan çalışmalarda farklı oranlar elde edilmiştir. Tünger ve ark. çalışmalarında hastane infeksiyonu tanısı konan ve yoğun bakım hastalarından izole edilen *Klebsiella* suşlarında GSBL aktivitesini ÇDST yöntemiyle %49.3 olarak bulmuşlardır (78). Dereli ve ark. ise yoğun bakım ünitesinden izole ettikleri 23 *K.pneumoniae* suşunun 22’sinde (%95.6) GSBL pozitifliği bildirmişlerdir (79). Nozokomiyal *K.pneumoniae* suşlarında Tünger ve ark. ÇDST yöntemiyle GSBL oranını % 41.7 olarak tespit etmişlerdir (73). ÇDST yöntemiyle yapılan diğer çalışmalarda, GSBL oranı %30.0-52.0 arasında tespit edilmiştir (80-84). Hastane infeksiyonu etkeni *K.pneumoniae* suşlarında Kuzucu ve ark. (85) %61.8, Gülay ve ark. (86) %88.6, Gültekin ve ark. (61) %54 oranında GSBL pozitifliği belirlemişlerdir. Hastane infeksiyonu etkeni *K.pneumoniae* izolatlarında Yücesoy ve ark. ise E-test metoduyla %57.1 oranında GSBL tespit etmişlerdir (87).

Delialioğlu ve arkadaşları 2005 yılında yayınladıkları çalışmada yatan hastalardan izole edilen *E.coli* suşlarında %29.0, *K.pneumoniae*’de %35.8, *K.oxytoca*’da %6.7 ve poliklinik hastalarından izole edilen *E.coli* suşlarında %7.7, *K.pneumoniae*’de %15.4 oranında GSBL üretimi saptamışlardır (82).

Tüm bu çalışmaların sonuçlarında da görüldüğü gibi bakterilerin izole edildiği hastanelere, servislere göre GSBL üretim oranları değişmektedir.

Çalışmamızda 217 *K.pneumoniae* suşunun %40.1’inde GSBL üretimi saptandı. Hastanede yatan hastalardan izole edilen *K.pneumoniae* suşlarında %87.4 ve poliklinik hastalarından izole edilen *K.pneumoniae* suşlarında %12.6 oranında GSBL pozitifliği saptandı. Hastanemizde saptanan bu oranların Türkiye’de yapılan çok merkezli çalışmalarla, benzer hasta popülasyonlarına ve yoğun bakım kapasitesine sahip büyük üniversite hastaneleriyle uyumlu olduğu gözlemlendi. Ancak araştırmamız

sonucunda elde ettiğimiz GSBL oranları Amerika ve Kanada gibi gelişmiş ülkelere göre yüksek, yine ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerle uyumlu olarak bulundu.

Üniversitemizde, Kaleli ve ark. 1998’de yayınladığı çalışmada, *K.pneumoniae* izolatlarında GSBL oranı %40.0 bulunmuştur (88). Çalışmamızda *K.pneumoniae* izolatlarında GSBL oranı %40.1 bulundu. Laboratuvarımızda kısıtlı antibiyotik bildirim uygulaması ve infeksiyon kontrol önlemlerinin alınması sonucu GSBL oranımızın artmadığı kanaatine varıldı.

Bazı dünya ülkelerine göre nispeten yüksek olarak saptanan bu GSBL üretim oranlarının, toplum kökenli infeksiyonlar ve hastane infeksiyonlarında ampirik tedavide geniş spektrumlu sefalosporinlerin sıkça kullanımına ve yine geniş spektrumlu antibiyotiklerin reçetesiz olarak toplumumuz tarafından gelişigüzel kullanımına bağlı olabileceği düşünüldü.

Beta-laktamazlar, kromozomal, plazmid ya da transpozon kökenli olabilirler ve kolaylıkla yayılabilirler. Bu direnç genlerinin seçilmesi ve yayılması için en uygun ortam antibiyotiklerin yoğun olarak kullanıldığı hastanelerdir.

Du ve ark’nın çalışmasında üçüncü kuşak sefalosporinlerle yapılan tedavinin GSBL üretimi açısından tek bağımsız risk faktörü olduğu belirtilmiştir (89). Vahaboğlu ve ark ’nın yaptığı alışmada, GSBL direncinin en çok saptandığı birimin yoğun bakım ünitesi olduğu bildirilmiştir (90).

Philadelphia Çocuk Hastanesinde yapılan kan akımı infeksiyonlarından izole edilen *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatlarında GSBL üretimi açısından risk faktörlerinin araştırıldığı çalışmada üçüncü kuşak sefalosporin kullanımı anlamlı bir risk faktörü olarak tespit edilmiştir (91).

Çalışmamızda GSBL üreten suşların çoğunlukla Çocuk yaş grubundan (%71.0) izole edilen suşlar olduğu görülmüştür. Çocuklarda beta-laktam grubu antibiyotik kullanımının daha fazla olması, kinolon grubu antibiyotiklerin kullanılmaması gibi nedenlerle GSBL üretiminde sefalosporin kullanımının önemli

bir risk faktörü olabileceği düşünöldü. İzole edilen suşların çoğunun idrar (%67.8) olması, üriner kateterizasyonun anlamlı bir risk faktörü olması, ürolojik patolojisi olan hastaların uzun süreli hastane takibinde olmaları bu hastaların önemli bir risk grubu olduğunu göstermektedir. Özellikle üriner infeksiyonlardan ve kolonizasyonlardan izole edilen gram negatif basillerde saptanan GSBL direnci sıklığı yanıtıcı olmamalıdır. Çünkü kültür alınan olgular genelde ya diğer ajanlara dirençli ya da rekürren olgulardır. Toplum kökenli olgularda direncin bu boyutta olduğunu düşünmek yanıtıcı olacaktır (92).

Çalışmamızda toplum kökenli 11 olguda GSBL pozitif *K.pneumoniae* izole edildi. 5 olgunun son 4 ay içinde hastaneye yatış öyküsü bulunmakla birlikte, bu durum bize yakın gelecekte toplumdan kazanılmış GSBL pozitif gram negatif basil izolasyonunun artabileceği yönünde sinyal vermektedir.

Çalışmamızda, GSBL aktivitesi pozitif *K.pneumoniae* suşlarının en çok izole edildiği bölümler ve GSBL oranları; yoğun bakım ünitesinde %37.9, çocuk hastalıkları servisinde %29.9, cerrahi bilimlerde %12.6, çocuk acilde %10.3, çocuk cerrahisi servisinde %4.6, dahili bilimlerde %3.4 ve acil serviste %1.1; en çok izole edildiği örnekler ve GSBL oranları ise %67.8 idrar, %10.3 kan, %6.9 trakeal aspirat sıvısı olarak bulundu (Tablo-14,15). Bu oranlar arasındaki farkın nedeni klinikler arasında hasta profili, hastaya uygulanan geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi ve süresi, kateterizasyon uygulanması ve süresi, hastane personeli ile hasta ilişkisi gibi faktörlerden kaynaklanabileceğini düşündü.

Eskitürk ve ark. yoğun bakım gerektiren hastalardan izole ettikleri *K.pneumoniae* suşlarında GSBL oranını ÇDST yöntemi ile %52.0, E-test metodu ile de %52.0 olarak bulmuşlardır (93). Hastane infeksiyonu izolatu *K.pneumoniae* suşlarında Abacıoğlu ve ark. ÇDST ile %50.0, E-test ile %62.5 GSBL pozitifliği saptamışlardır (94). Kaçmaz ve ark. ise hastane infeksiyonu etkeni *Klebsiella spp.* ve *E.coli*'de ÇDST'nin fenotipik doğrulama testine göre duyarlılık ve özgülüğünü sırasıyla %82 ve %85 olarak bulmuşlardır (66). Akçam ve ark. yayınladığı çalışmada, 40 *Klebsiella spp.* suşunda, ÇDST ile %35'inde, E-test ile %37.5'inde GSBL saptamışlardır ve GSBL üretimini saptamada ÇDST ve E-test yöntemleri

arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (95). Cormican ve ark. yaptıkları çalışmada, GSBL saptanmasında tarama testi olarak ÇDST'ni %87, E-test yöntemini %100 duyarlı bulmuşlardır (96). Vercauteren ve ark. E-test GSBL stripleri ile GSBL ürettiği bilinen suşların % 81'ini saptarken, ÇDST ile %97 oranında tespit ettiklerini bildirmişlerdir (97).Günaydın ve ark. 77 *Klebsiella spp.* suşunda yaptıkları çalışmada ÇDST ile %46.8, E-Test ile %55.8 GSBL pozitifliği belirlemişlerdir (98).

Çalışmamızda, 217 *K.pneumoniae* suşunda; ÇDST yöntemiyle 87, CT/CTL E-test yöntemiyle 86 suşda GSBL varlığı tespit edildi.

E-testteki farklılığın sebebi, E-testin düşük miktardaki GSBL'leri saptayamaması ve sadece CT/CTL E-test stripleriyle çalışılmasının olabileceği düşünüldü. TZ/TZL E-test ile birlikte kullanıldığında duyarlılığın artabileceği bildirilmektedir. E-testin maliyetinin yüksek olması nedeniyle daha az tercih edilmektedir (98).

Bu çalışmada GSBL belirlenmesinde kullandığımız yöntemler arasında kappa analizi ile %99 uyum saptandı. Bunun da yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olduğu görüldü (66,93-95).

Çalışmamızda çift disk sinerji testinin rutin disk difüzyon testiyle aynı anda uygulanabilecek, ek mali harcama ve zaman gerektirmeyen, rutin laboratuvarlarda kolaylıkla kullanılacak duyarlı bir test olduğu, ancak diskler arası uzaklığın ve enzim substrat profillerinin testin özgüllüğünü önemli oranda değiştireceği için, laboratuvarların diskler arası uzaklığı ve testte kullanılacak antibiyotikleri bulunduğu bölge ve hastanenin genel direnç oranlarını, enzim tiplerini göz önüne alarak belirlenmesinin doğru olacağı kanısına varıldı.

GSBL oluşturan bakterilerin neden olduğu infeksiyonlarında, karbapenemlere alternatif olabilecek tedavi seçenekleri halen tartışılmaktadır. GSBL üreten *K.pneumoniae* suşlarının neden olduğu bakteremi veya sepsis olgularında karbapenemler dışındaki etkin antibiyotiklerle yapılan tedavilere rağmen mortalite oranı yüksek seyretmektedir (99).

Gioia ve Livermore, GSBL üreten yoğun bakım kökenli *Klebsiella* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını incelemiş ve dört yıllık bir dönemde bu suşlarda kinolon ve aminoglikozid direncinin iki-üç kat, piperasilin/tazobaktam direncinin ise yaklaşık iki kat arttığını ve yüksek düzeyde dirençli suşların ortaya çıktığını saptamışlardır. Bu sonuçlar, GSBL infeksiyonlarında kullanılacak antibiyotiklerin etkinliğinde hızlı bir azalma olduğunu göstermektedir (100).

Mumcuoğlu ve ark. ÇDST'i ile tespit ettikleri GSBL pozitif suşların antibiyotiklere dirençliliğini, negatiflere göre daha yüksek oranda olduğunu belirlemişlerdir. GSBL negatif ve pozitif kökenlerde amikasin, aztreonam, kloramfenikol, imipenem, sefoksitin, siprofloksasin ve trimetoprim/sülfametoksazol duyarlılığını disk difüzyon ile araştırmışlar, GSBL pozitif suşların direncini sırasıyla bu antibiyotikler için %5.8, %28.8, %61.5, %0.0, %28.8, %5.8, %80.8 olarak, GSBL negatif suşların direncini ise sırasıyla %0.0, %11.0, %39.7, %0.0, %19.2, %3.4, %54.8 olarak saptamışlardır. Çalışmalarında en etkili antibiyotikler olarak amikasin, imipenem ve siprofloksasini bulmuşlardır (101).

Yavuzdemir ve ark. ise ÇDST'i ile tespit ettikleri 50 GSBL pozitif *K.pneumoniae* suşlarının direnç oranlarını disk difüzyon yöntemiyle incelemişler. Direnç oranlarını; amikasinde %50.0, gentamisinde %66.0, netilmisinde %78.0, tobramisinde %86.0, trimetoprim/sülfametoksazolde %72.0, tetrasiklinde %56.0, siprofloksasinde %28.0, sefepimde %36.0, piperasilin/tazobaktamda %28.0 ve meropenemde %6.0 olarak tespit etmişlerdir (102).

Babini ve Livermore, *Klebsiella* türlerinde MİK yöntemiyle yaptıkları duyarlılık testlerinde amikasine %61.0, gentamisine %72.0, piperasilin/tazobaktama %63.0, siprofloksasine %31.0 oranında direnç belirlemişler ve GSBL yapan suşların direncinin, yapmayanlara göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır (103).

Bizim çalışmamızda da, GSBL üreten suşların imipenem ve SXT dışında çalışılan diğer antibiyotik gruplarına karşı daha dirençli olduğu tespit edildi. Bu durum istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.001$) (Tablo-16). Bunun nedeninin GSBL üretiminden sorumlu genlerle diğer dirençlerden sorumlu genlerin aynı plazmidlerle

aktarılmış olabileceği düşünöldü.

Florokinolonlar GSBL üreten gram negatif basiller ile gelişen infeksiyonların tedavisinde karbapenemlerin ardından kullanılabilen en ideal ikinci seçenek antibiyotik olarak değeriendirilmektedir. Ancak kinolonların GSBL pozitif gram negatif basillerde alternatif tedavi olma gücü azalmaktadır ve uygunsuz kinolon kullanımının durdurulmasına yönelik çalışmalarla konuya dikkat çekilmelidir (92). Çalışmamızda kinolon direnci %18.4 oranında bulunmuştur (Tablo-16).

Yaptığımız çalışmada çift disk sinerji testi ile tespit ettiğimiz 87 GSBL pozitif *K.pneumoniae* suşunda imipeneme direnç görülmezken çalışılan diğer antibiyotiklerden siprofloksasin'e %18.4, amikasin'e %25.3, trimetoprim-sülfametoksazol'e %41.4, piperasilin/tazobaktam'a %42.5, gentamisin'e %70.1, amoksisilin/klavulanat'a %83.0 direnç tespit edildi (Tablo-1). Çalışmamızda, antibiyotik direnç oranlarının, suşların izole edildiği birimlere ve birimlerde yoğun antibiyotik kullanımına göre değıştiği de göz önüne alındığında diğer çalışmalarla uyumlu olarak bulundu. Önceleri gentamisin etkili bir antibiyotik olmasına rağmen yoğun bakım üniteleri ve hastanelerin diğer birimlerinde kontrolsüz kullanımı sonucu bu antibiyotiğe de direnç gelişmiştir. Çalışmamızda GSBL pozitif *K.pneumoniae* suşlarında gentamisin direnci literatürlerle uyumlu olarak %70.1 olarak bulundu ve GSBL pozitif *K.pneumoniae* suşlarında amikasine direnç %25.3 olarak tespit edildi. Şu an için etkili görünmekle birlikte yoğun bakım ünitelerinde yoğun antibiyotik kullanımı sonucu gelecekte bu antibiyotiğe karşı da yüksek direnç oranlarından bahsedileceğine kesin gözüyle bakılmaktadır (104).

Bu çalışmada, GSBL pozitif izolatların antibiyotik direnç oranları SXT dışında diğer çalışmalarla uyumlu şekilde negatiflere göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$) (73,101,103) (Tablo-16). Yaptığımız bu çalışmada GSBL üreten *K.pneumoniae* suşlarında imipeneme karşı dirence rastlanmadı. Siprofloksasin (%18.4) ve amikasinin (%25.3), imipenemden sonra en etkili antibiyotikler olduğu tesbit edilmiştir.

2004 yılında, ülkemizde ilk defa izole edilen bir CTX-M-15 suşu bildirilmiştir. İstanbul Tıp Fakültesi'nde yatan bir hastanın idrarından izole edilen *E.coli* suşunun CTX MİK'u 256 µg/ml, CAZ MİK'u ise 64 µg/ml olarak bulunmuştur. IEF'da pI: 5.4, 7.5, 9.1 bantları görülmüş, PCR ile TEM ve CTX-M genleri pozitif olarak saptanmıştır. Dizi analizi ile CTX-M-15 olduğu saptanan suş, CTX'i hidrolize edebilmiştir (105).

Dokuz Eylül Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada üç aylık bir sürede izole edilen 14 GSBL (+) *E.coli* suşunun tamamında PCR ile CTX-M genleri saptanmıştır. Suşların DNA dizi analizi yapıldığında CTX-M-3 ile benzer olduğu görülmüştür. Bu yayın, Türkiye'den ilk CTX-M-3 bildirisi olması nedeniyle dikkat çekicidir (106).

Aktaş ve ark. çeşitli klinik örneklerden izole edilen *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında GSBL varlığını ÇDS, İEF (İzoelektrik fokuslama) ve PCR ile incelemişler, çoğunluğu idrar örneklerinden izole edilen 35 *E.coli* ve 15 *K.pneumoniae* suşunun ÇDS ile GSBL oluşturduğunu tespit etmişlerdir. *E.coli* suşlarının 25'inde (%71.4) TEM, birinde (%3.0) SHV ve hepsinde (%100) CTX-M bulunduğunu bildirmişlerdir. *K.pneumoniae* suşlarının %47.0'sinde TEM, %73.0'ünde SHV ve %47.0'sinde CTX-M tesbit etmişlerdir. PCR ile CTX-M (+) buldukları *K.pneumoniae* suşlarından 12'sini ve *E.coli* suşlarından beşini dizi analizi ile değerlendirmişler ve tamamının CTX-M-15 olduğunu bulmuşlardır (107). Bu veriler, ülkemizde CTX-M (özellikle CTX-M-15) oluşturan suşların yaygın olduğunu göstermektedir.

Paterson ve ark. 7 ülkedeki 12 hastanede kan infeksiyonlarından izole edilen 455 *K.pneumoniae* suşunun ürettiği beta-laktamazları değerlendirmişlerdir. Suşların % 18'inin fenotipik GSBL üreticisi olduğu bulunmuş, IEF ve gen sekanslaması yapılmıştır. Bu suşların en az bir (1-5 arasında) beta-laktamaza sahip olduğu belirlenmiştir. GSBL üreten suşlar arasında en yaygın beta-laktamazın SHV olduğu (% 67) TEM tipi beta-laktamazların (TEM-10, TEM-12, TEM-26, TEM-63) % 16.4 oranında bulunduğu belirtilmiştir. Türkiye'den gönderilen dokuz suşun beşinde PER tipi beta-laktamaz ve bunların ikisinde SHV-2 ve SHV-5 bulunmuştur. Suşların % 23.3'ünde CTX-M tipi beta-laktamazlar (CTX-M-2 ve CTX-M-3) bulunmuştur. CTX-

M tipi beta-laktamazlar, çalışma yapılan ülkelerin tümünde (ABD hariç) saptanmıştır. Daha önce CTX-M bildirilmemiş olan dört ülkede de (Avustralya, Türkiye, Belçika, Güney Afrika) de bu beta-laktamaz saptanmıştır (108).

Bu çalışmada, polimeraz zincir reaksiyonu ile beta-laktamaz genlerinin araştırılması sonucu, suşların 19'unda (%22.9) CTX-M pozitifliği ve bu suşlarında tamamının grup-1'e ait olduğu tesbit edildi.

Edelstein ve ark. 28 Rus hastanesinden izole ettikleri 904 suşu (494 *E.coli* ve 410 *K.pneumoniae*) GSBL üretimi açısından incelemişlerdir. *E.coli*'de piperasilin+tazobaktam direnci %29.5, *K.pneumoniae*'de %45 amoksisilin+klavulanik asit direnci ise *E.coli*'de %84.9, *K.pneumoniae*'de %81.0 olduğu bildirilmiştir. CTX-M üreticileri arasında amoksisilin+klavulanik asite orta veya yüksek seviyede direnç (*E.coli*'de %96.4, *K.pneumoniae*'de %90.8) CTX-M dışı suşlardan (*E.coli*'de %80.0, *K.pneumoniae*'de %75.8) daha yaygın bulunmuştur. CTX-M dışı GSBL üreticileri arasında piperasilin+tazobaktama direnç (*E.coli*'de %36.0, *K.pneumoniae*'de %48.4) CTX-M üreticilerinden (*E.coli*'de %17.9, *K.pneumoniae*'de %37.9) daha az sıklıkta bulunmuştur. CTX-M (+) suşlara karşı piperasilin+tazobaktamın daha iyi aktivite göstermesinin, CTX-M enzimlerinin tazobaktam ile klavulanattan daha iyi inhibe edilmesi gerçeği ile izah edilebileceği belirtilmiştir. Hem *E.coli*, hem de *K.pneumoniae*'nin GSBL(+) suşları arasında aminoglikozid ve siprofloksasine direnç gözlemlendiği belirtilmiştir. *E.coli*'nin %80.8'i, *K.pneumoniae*'nin %85.1'i gentamisine dirençli bulunmuştur. CTX-M oluşturan suşların direnç oranları, diğer GSBL tiplerini taşıyanlara oranla yaklaşık %15.0 daha yüksek bulunmuştur (109).

Çalışmamızda, CTX-M pozitif suşların siprofloksasin, amikasin, gentamisin, tobramisin, SXT ve AMC'a direnç oranları, CTX-M dışı beta-laktamaza sahip suşlardan daha yüksek bulunmuştur (Tablo-19). Antibiyotik direnç oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). TZP'e: CTX-M pozitif suşlarda %63.2, CTX-M negatif suşlarda %16.8 ($p=0.04$), netilmisine: CTX-M pozitif suşlarda %89.5, CTX-M negatif suşlarda %54.4 direnç tesbit edilmiştir ($p=0.005$). Her iki antibiyotik için aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo-19).

Dokuz Eylül Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada, üç aylık bir sürede izole edilen 14 GSBL (+) *E.coli* suşunun tamamında PCR ile CTX-M genleri saptanmıştır. ERIC-2 primeri kullanılarak yapılan RAPD-PCR ile suşlar arasında yedi ayrı patern saptanmıştır (107).

Arpin ve ark. 1999 yılında Fransa'daki sekiz laboratuvarında izole edilen toplam 2599 *Enterobacteriaceae* ailesi suşundan 39'unun (%1.5) genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ürettiğini bulmuşlardır. Bu suşlardan sekizinin *K.pneumoniae*, altısının *E.coli* olduğu belirtilmiş ve yedi farklı GSBL karakterize edilmiştir. Suşlar ERIC-2 primeri kullanılarak RAPD-PCR ile tiplendirilmiştir. *E.coli* suşlarının antibiyotiplendirme ve moleküler tiplendirmeye göre birbirinden farklı olduğu görülmüştür. *K.pneumoniae* suşlarının da ikisi hariç farklı olduğu, bu iki suşun da Kp2 profili gösteren aynı hastadan izole edildiği bulunmuştur (110).

Bu çalışmada *Enterobacteriaceae* ailesine özgü bir primer olan ERIC-1 ve ERIC-2 primeri ile yapılan RAPD-PCR deneyleri sonucunda suşlar elde edilen bant benzerliklerine göre gruplandırılmıştır. Buna göre *K.pneumoniae* suşları arasında en sık rastlanan grubun Kp 3 (n=3), Kp 4 (n=3) ve Kp 5 (n=3) olduğu saptandı. *K.pneumoniae* suşları arasında grup Kp 3, Kp 4 ve Kp 5'e ait suşların aynı bant sayısına sahip olmaları nedeniyle epidemiyolojik olarak ilişkili suşlar olduğu, grup Kp 6a ve 6b'nin ise iki bant farklılığı olması sebebiyle yakın ilişkili suşlar olabileceği bu suşların dışındaki suşların ise birbiriyle ilişkisiz suşlar olduğu düşünüldü (Tablo-20).

GSBL'lar, 1980'li yıllardan beri antibiyotik kullanımının yarattığı seçici baskı sonucu ortaya çıkmış, sayı ve çeşit yönünden artarak tüm dünyada özellikle hastanelerde önemli bir sorun haline gelmiştir. Bu enzimleri üreten mikroorganizmaların oksimino sefalosporinlere ve diğer bazı antibiyotiklere dirençli olması, tedavide kullanılacak antibiyotiklerin sayısını kısıtlamaktadır.

GSBL prevalansı, özellikle genişlemiş spektrumlu sefalosporinlerin klinik kullanıma girme zamanı ve yaygın kullanımı ile ilişkili olduğu için GSBL üreten suş sayısı, ülkeden ülkeye, şehirden şehire, hastaneden hastaneye, hatta aynı hastanenin

farklı servisleri arasında değişim göstermektedir. CTX-M enzimlerinin artışıında, toplum ve hastane kökenli suşlarda sefotaksim ve seftriaksonun yaygın kullanımının rol oynadığı düşünölmektedir (29,30,47).

Hastane ortamının kendisi ve bu ortamda yapılan girişimler GSBL üreten suşların yayılımı için kaynak oluşturmaktadır. Bu yayılımı önlemek için hastane infeksiyon kontrol tedbirlerine titizlikle uyulması, dirençli suşların daha sık izole edildiğı ve kronik hastaların takip edildiğı kliniklerde ve yoğun bakım ünitelerinde, ameliyathane ve pansuman odaları gibi invaziv girişimlerin yapıldığı birimlerde sterilizasyon ve dezenfeksiyon kurallarına uyulması, hasta ile temas eden hastane personelinin el yıkayarak direnci yaymaktan kaçınması gerekmektedir. GSBL üretimini önlemek için de her şeyden önce hastanede yatan hastalara doğru endikasyonda antibiyotik kullanılması için büyük bir titizlik gösterilmesi, özellikle uzun süreli takip edilen kronik hastalarda infeksiyon ve kolonizasyon ayırımı iyi yapılarak antibiyoterapiye karar verilmesi, uygunsuz ve gereksiz antibiyotik kullanımından kaçınılması gerekmektedir. GSBL oluşturan suşların genellikle hastane infeksiyonları epidemileri göz önünde bulundurularak, GSBL üreten suşların saptanması halinde gerekli epidemiyolojik çalışmalar başlatılmalıdır.

Sonuç olarak, tedavisi pahalı ve güç hastane infeksiyonlarına neden olduklarından *K.pneumoniae* suşlarında GSBL üretim oranlarının sürekli izlenmesi, yayılımlarının önlenmesi için geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerin dikkatli kullanılması, kolonize veya infekte hastaların izolasyonu, risk altındaki hastane bölümlerinde dikkatli ve ayrıntılı sürveyans çalışmalarının yapılması gereklidir.

Çalışmamızda, *K.pneumoniae* suşlarının 19'unda, PCR yöntemiyle enzim ailesi ve grubu tanımlanmış olup, bir sonraki aşamada alt tiplerinin belirlenmesinde nükleotid dizi analizinin yapılması gerekmektedir. Bu yöntemle, farklı enzim tiplerinin ve mutasyonlarının saptanması mümkün olabilecektir.

SONUÇLAR

1- Ocak 2006 – Aralık 2006 tarihleri arasında polikliniklerden ve yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen toplam 217 *Klebsiella pneumoniae* suşu çalışmaya alındı.

2- Suşların 58'i (%26.7) çocuk hastalıkları servisinden, 51'i (%23.5) yoğun bakımdan, 39'u (%18.0) cerrahi bilimlerden, 29'u (%13.4) dahili bilimlerden, 24'ü (%11.1) çocuk acilden, 9'u (%4.1) çocuk cerrahisinden, 7'si (%3.2) acil servisten gönderilen örneklerden izole edildi.

3- Suşların 152'si (%70.0) idrar 20'si (%9.2) balgam, 14'ü (%6.5) yara yeri sürüntüsü, 13'ü (%6.0) kan, 9'u (%4.1) trakeal aspirat sıvısı, 3'ü (%1.4) BOS, 3'ü (%1.4) göbek sürüntüsü, 3'ü (%1.4) göz sürüntüsü kültürlerinden izole edildi.

4- *K.pneumoniae* suşlarında; sefolotin'e %64.5, tobramisin'e %61.3, AMC'ye %59, sefuroksim'e %52.1, sefaperazon'a %48.8, sefotaksim'e %48.4, aztreonam'a % 47.5, seftriakson'a %46.1, seftizoksim'e %41.5, trimetoprim-sülfometaksozol'e %34.6, netilmisin'e %30.9, amikasin'e %12.4, ciprofloksasin'e %11.5 oranında direnç saptandı. Tüm suşlar içinde imipenem'e direnç tesbit edilmedi.

5- Suşların 128'i (%59) yatan hastalardan, 89'u (%41.0) poliklinik, 88'i (%40.6) erkek, 129'u (%59.4) kadın hastalardan izole edildi.

6- Bir yıllık süreç içinde izole edilen *K.pneumoniae* suşlarında çift disk sinerji yöntemi ile 87 (% 40.1) suşta GSBL tesbit edildi. ÇDST'inde diskler arası mesafe 20 mm'ye indirildiğinde 9 suşta daha GSBL pozitifliği gösterildi. CT/CTL E-test yöntemi ile 86 (%39.6) suşta GSBL tesbit edildi. GSBL tesbitinde, ÇDST ile E-Test metodu arasında, kappa analizi ile %99 uyum saptandı.

7- GSBL pozitifliği en fazla yoğun bakımdan (%37.9) ve çocuk hastalıkları servisinden (%29.9) gönderilen örneklerde tesbit edildi. Yoğun bakım örneklerinin 27'si (%81.8) yenidoğan yoğun bakımdan, 6'sı (%18.2) anestezi yoğun bakımdan

izole edildi.

8- GSBL pozitif örneklerin %67.8'i idrar, %10.3'ü kan, %6.9'u trakeal aspirat, %5.7'si balgam, %3.4'ü BOS, %3.4'ü yara yeri sürüntüsü, %2.3'ü göz kültürlerinden izole edildi.

9- GSBL pozitifliği yatan hastaların %87.4'den, poliklinik hastalarının %12.6'sından izole edildi. GSBL'in yatan hastalardaki sıklığı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$). GSBL pozitif suşların 34 'ü (%39.1) erkek, 53'ü (%60.9) kadın hastalardan izole edilmiştir. İstatistiksel olarak aradaki fark anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$).

10- GSBL oluşturan bütün suşların imipeneme duyarlı olduğu tesbit edildi. Etkili diğer antibiyotiklerin ise sırasıyla siprofloksasilin (%81.6), amikasin (%74.7), TZP (%57.5) ve sefoksitin (% 54.0) olduğu görüldü. GSBL oluşturan ve oluşturmayan *K.pneumoniae* suşlarının netilmisin, amikasin, siprofloksasin, AMC, tobramisin, TZP, gentamisin ve sefoksitin direnç oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$). GSBL oluşturan ve oluşturmayan *K.pneumoniae* suşlarında SXT direnç oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p = 0.084$).

11- GSBL tesbit edilen 87 suşda PCR ile CTX-M universal araştırıldı. 19 suşda (%22.9) pozitif olarak bulundu.

12- CTX-M universal primerleri ile pozitif bulunan 19 suşa, sırasıyla grup-1, grup-2, grup-3 ve grup-4 primerleriyle PCR uygulandığında; suşların tamamının grup-1'e ait olduğu tesbit edildi.

13- CTX-M Grup-1 pozitif 19 suşun 8'i (%42.1) Çocuk yoğun bakımdan, 5 'i (%26.3) çocuk hastalıkları servisinden, 3'ü (%15.8) anestezi yoğun bakımdan, 1'er (%5.3) tanede cerrahi bilimler, çocuk acil ve çocuk cerrahi servisinden izole edildi.

14- CTX-M Grup-1 pozitif 19 suşun 11'i (%57.9) idrar, 3'ü (%15.8) kan, 3'ü

(%15.8) trakeal aspirat sıvısından, 1'i (%5.3) balgam ve 1'i (%5.3) yara yeri sürüntüsü örneklerinden izole edildi.

15- CTX-M Grup-1 pozitif 19 suşun en fazla AMC'a (%94.7) ve netilmisine (%89.5) dirençli olduğu görüldü. İmipeneme direnç gözlenmezken, en az direnç siprofloksasinde (% 26.3) tesbit edildi. CTX-M negatif suşlarda en fazla AMC'da (%80.9) ve tobramisinde (%72.1), en az direnç siprofloksasinde (%16.2) tesbit edildi. TZP'e CTX-M negatif suşlarda %16.8, CTX-M pozitif suşlarda % 63.2 direnç tesbit edildi. CTX-M pozitif ve negatif suşlar arasında siprofloksasin, amikasin, gentamisin, tobramisin ve SXT'de istatistiksel olarak anlamlı fark tesbit edilmedi ($p>0.05$). CTX-M pozitif ve negatif suşlar arasında TZP ve netilmisin direncinde istatistiksel olarak anlamlı fark tesbit edildi ($p<0.05$).

16- *Enterobacteriaceae* ailesine özgü bir primer olan ERIC-1 ve ERIC-2 primeri ile yapılan RAPD-PCR sonucunda, 19 *K.pneumoniae* suşlarının agaroz jelde görülen bantlarına göre 11 ayrı grup tesbit edildi. En sık rastlanan grubun Kp 3 (n=3), Kp 4 (n=3) ve Kp 5 (n=3) olduğu saptandı.

ÖZET

Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) üretimi, 1980'li yıllardan beri geniş spektrumlu sefalosporinlerin gram negatif bakterilerin sebep olduğu infeksiyonlarda yaygın biçimde kullanımı sonucu ortaya çıkmış, sayı ve çeşit yönünden hızla artarak tüm dünyada özellikle hastanelerde önemli bir sorun haline gelmiştir.

Bu çalışmada, Pamukkale Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 217 *Klebsiella pneumoniae* suşunda GSBL varlığı araştırıldı. GSBL üretimi, çift disk sinerji testi ve E-test yöntemi ile değerlendirildi. GSBL pozitif suşlarda PCR ile CTX-M genleri ve CTX-M pozitif tesbit edilenlerde CTX-M grubu araştırıldı.

Klebsiella pneumoniae suşlarının 87'sinde (%40.1) GSBL bulunmuştur. İki yöntemin tutarlılık analizlerinde ise istatistiksel olarak birbirleriyle uyumlu olduğu görülmüştür. Antibiyotik duyarlılık deneyleri CLSI'e göre disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. İmipeneme dirençli suş bulunmamıştır. İmipenemden sonra en etkili antibiyotiğin ciprofloksasin (%81.6) ve amikasin (%74.7) olduğu bulunmuştur. GSBL üreten izolatların direnç oranları, GSBL üretmeyenlere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (p<0.05). CTX-M genlerine spesifik primerler kullanılarak PCR yapılmıştır. 19 suşun (% 22.9) CTX-M grup-1 taşıdığı bulunmuştur. RAPD-PCR ile *Klebsiella pneumoniae* suşlarında 11 grup belirlenmiştir.

Sonuç olarak, GSBL tespitinde, rutin antibiyogramlarda disk dizilimleri değiştirilerek uygulanan ÇDST, ucuz ve güvenilir bir yöntem olarak değerlendirilmiştir. Hastane infeksiyonları ile etkili bir mücadele için, GSBL sıklığının araştırılması ve klinisyenlerin doğru antibiyotiğe yönlendirilmesi en önemli önlemlerden biri olacaktır.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik direnci, Gram negatif basil, GSBL üretimi, *K.pneumoniae*, PCR, RAPD-PCR

SUMMARY

Production of Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) have been existed due to frequent usage of the “extended spectrum” cephalosporins at the infections caused by gram negative bacteria, count and types of ESBL increased all over the world and became an important problem.

The existence of the ESBL has been investigated in 217 *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens sent from Research and Training of Pamukkale University. The existence of the ESBL has been investigated by double disk synergy test and E-test. By using PCR methods CTX-M genes were investigated in the ESBL positive strains. After determining CTX-M genes, CTX-M group1 primers were studied.

The presence of ESBL has been observed at 87 (40.1%) of the *Klebsiella pneumoniae* strains. Two methods were statistically consistent. Antimicrobial susceptibility tests were performed by disc diffusion method described in CLSI guide. According to antimicrobial susceptibility test results, resistance to imipenem was not detected. Except imipenem, ciprofloxacin (81.6 %) and amikacin (74.7 %) was the most effective antibiotic against to the strains. Furthermore, ESBL positive strains were found resistant to antibiotics than ESBL negative strains ($p < 0.005$). A polymerase chain reaction (PCR) was performed by specific primers for the CTX-M genes. Among the 87 isolates, rates of CTX-M beta lactamases were found 22.9 %. Eleven groups for *K.pneumoniae* were separated with by RAPD-PCR.

As a result, for ESBL detection; double disc synergy test is simple and sensitive. In the measure of the hospital diseases it is important to investigation the frequency of ESBL and guide clinicians to the correct antibiotics.

Key words: Antibiotic resistance, Gram negative rod, ESBL production, *K.pneumoniae*, PCR, RAPD-PCR

KAYNAKLAR

1. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum β -lactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. J Infect 2003;47:273-95.
2. Bush K. Is it important to identify extended spectrum beta-lactamase producing isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15:361-4.
3. Coudron PE, Moland S, Sander CC. Occurrence and detection of extended spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* at a Veterans Medical Center. J Clin Microbiol 1997; 35:2593-6.
4. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. J Infect 2003; 47:273-95.
5. Gür D. Beta laktamazlar. Hacettepe Tıp Dergisi 2002; 33(2):102-10.
6. Bryan LE, Godfrey AJ. Beta lactam antibiotics: Mode of action and bacterial resistance. "Lorian V (ed): Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th edition" 1997; 599-664.
7. Gülay Z. ESBL'lerin tanı yöntemleri. "Yeni ve yeniden gündeme gelen infeksiyonlar: Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar". Bilimsel Tıp Yayınları, Ankara 2004; 13-26.
8. Gür D. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel tıp kitabevleri, 2002: 182-93.
9. Gülay Z. Hücre duvar sentezini etkileyen antibakteriyeller. ANKEM Derg 2003; 17(3):192-204.

10. Kfoury JNS, Araj GF. Recent development in beta-lactamases and extended spectrum beta-lactamases. *British Journal Medicine* 2003; 327:1209-13.
11. Opal SM, Medeiros AA. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th edition, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone Inc, 2005:253-70.
12. Tanır G, Göl N. Antibiyotik Direnci. *Klinik Derg* 1999; 47-54.
13. Sarı H. Karbapenemlere dirençli gram-negatif basil izolatlarında imipenem-EDTA /meropenem-EDTA disk yöntemi ve modifiye hodge testi ile metallo-beta-laktamaz varlığının araştırılması. Uzmanlık tezi, İstanbul 2005.
14. Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Scand J Infect Dis* 1991; 7-16.
15. Pool K. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61:2200-23.
16. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1211-33.
17. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:557-84.
18. Gür D. Hastane infeksiyonlarında önem kazanan gram negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. *Hastane İnfek Derg* 1997; 1:38-45.
19. Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997; 24:19-45.
20. Yuluğ N. β -laktamazlar ve klinik açıdan önemi. *ANKEM Derg* 1997; 11:205-7.

21. Livermore DM. Beta-lactamase mediated resistance and opportunities for its control. J Antimicrob Chemother 1998; 41:24-41.
22. Danel F, Hall LMC, Gür D, Akalın HE, Livermore DM. Transferable production of PER-1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1995; 35:281-94.
23. Vahapoğlu H, Hall LM, Mülazımoğlu L. Resistance to extended spectrum cephalosporins, caused by PER-1 beta-lactamase in *Salmonella typhimurium* from Istanbul, Turkey. J Med Microbiol 1995; 43:294-9.
24. Hall LMC, Livermore DM, Gür D, Akova M, Akalın HE. OXA-11, an extended spectrum variant of OXA-10 (PSE-) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:1637-44.
25. Heritage J, M'Zali FH, Binzi DG, Hawkey PM. Evolution and spread of SHV extended spectrum beta lactamases in Gram negative bacteria. J Antimicrob Chemother 1999; 44:309-318.
26. Bush K, Jacoby G. Nomenclature of β -lactamases. J Antimicrob Chemother 1997; 39:1-3.
27. Bal Ç. Beta laktamazlar: Güncel durum. Flora 2003; 8(2):111-123.
28. Gür D. ESBL'lerin genel özellikleri ve ESBL tipleri. "Yeni ve yeniden gündeme gelen infeksiyonlar: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar". Bilimsel Tıp Yayınları, Ankara 2004; 5-13.
29. Bradford PA. Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century. Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14:933-51.
30. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum β -Lactamases: a clinical update.

Clin Microbiol Rev 2005; 18:657-86.

31. Welthagen GF, Poirel L, Nordman P. Ambler class A extended-spektrum B-lactamases in *Pseudomonas aeuroginosa*. Novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2003; 45:183-9.

32. Rice L. Evaluation and clinical importance of extended spectrum of beta lactamases. Chest 2001; 119:391-6.

33. Nordman P, Guibert M. Extended spektrum beta lactamases in *Pseudomonas aeuroginosa*. Microbiology 1998; 42:128-31.

34. Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages JM. Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeuroginosa*. Antimicrobial Agents Chemother 2001; 45:2615-20.

35. Bush K. New beta-lactamases in gram negative bacteria. Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infec Dis 2001; 32:1085-89.

36. Gülay Z, Terek B, Eraç B. High prevalence of CTX-M type extended-spektrum beta-lactamases in members of *Enterobacteriaceae* in Turkey. 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disaeses, 2004, Prague, Czech Republic. Abstract no:752.

37. Bal C, Gonullu N, Aktas Z, Salcioğlu M. Dissemination of CTX-M type extended spektrum beta lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* in Istanbul, Turkey. International Congress of International Union of Microbiological Societies (UIMS), 2005. Bacteriology and Applied Microbiology, San Francisco, USA. Abstract no: B-751.

38. Bal C, Aktas Z, Gonullu N, Ang O. Prevalence of TEM-SHV and CTX-M-type extended spektrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in İstanbul, Turkey. International Congress of International Union of Microbiological Societies (UIMS),

2005. Bacteriology and Applied Microbiology, San Francisco, USA. Abstract no: B-759.

39. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. *Enterobacteriaceae*. ‘‘Bailey & Scott’s Diagnostic Microbiology ’’ Baltimore 1994; 362-387.

40. Philippon A, Arlet G, Lagrange PH. Origin and impact of plasmid mediated extended-spectrum beta-lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13:17-29.

41 Qinn JP. Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13:39.

42. <http://www.lahey.org/studies/webt.htm> adresinden 12 Mart 2007 tarihinde ulaşılmıştır.

43. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standarts for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standarts M2-A6 Wayne, PA. 2003.

44. Akova M. Genişletilmiş spektrumlu Beta-laktamazlar ve klinik önemi. In (Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D). Önemli ve sorunlu gram negatif bakteri infeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi 2004; 85-95.

45. Ramphal R, Ambrose PG. Extended spektrum beta-lactamases and clinical outcomes: Current data. Clin Inf Dis 2006; 42:164-72.

46. Kang C, Kim SH , Park WB, Lee KD, Kim C. Bloodstream infections due to extended spektrum beta-lactamases producing *E.coli* and *K.pneumoniae*: Risk factors for treatment outcome with special emphasis on antimicrobial. Antimicrobial Agents Chemother 2004; 48:4574-81.

47. Bonnet R. Growing group of extended spektrum beta lactamases: The CTX-M enzymes. Antimicrobial Agents Chemother 2004; 48:1-14.

48. Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, Patel JB, Edelstein PH. Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended spectrum betalactamases producing *E.coli* and *K.pneumoniae*. Clin Infect Dis 2001; 33:1288-94.
49. Balkan İİ, Gençer S, Batirel A, Özer S. Florokinolonlara karşı direnç gelişimine katkıda bulunan çeşitli risk faktörlerinin analizi. Flora 2005; 10:65-73.
50. Esen Ş. ESBL'lerin epidemiyolojik özellikleri. Yeni Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar. Bilimsel Tıp Yayınevi. 2004; 28-34.
51. Quinn JP. Clinical significance of extended-spectrum β -lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13:39-42.
52. Akova M. Dikkat: genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) var! ANKEM Derg. 2004; 98-103.
53. Kfoury JNS, Araj GF. Recent developments in beta lactamases and extended spectrum beta lactamases. BMJ. 2003; 327:1209-1913.
54. Bilgehan H. *Enterobacteriaceae*. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları. Fakülteler Kitabevi 2000; 425-51.
55. Koneman E W, Allen S D, Jonda W M, Schreckenber P C, Winn WC, JR: Enterobacteriaceae, Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6thed., Lippincott Company, Philadelphia, Newyork. 2006; 211.
56. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement M100-S16 CLSI Pennsylvania, USA 2006.
57. S.H. Jeong, I.K. Bae. Dissemination of transferable CTX-M-type extended

spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in Korea. Journal of Applied Microbiology 2005; 98:921–927.

58. Aktaş Z, Kipritçi Ö. Transplantasyon ünitesinde yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının PAPD-PCR yöntemiyle tiplendirilmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2006; 36:88-93.

59. Podscun R, Ullmann U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998; 11:589-603.

60. Aydoğan H, Başustaoğlu A. Nozokomiyal patojen olarak *Klebsiella* türlerinin mikrobiyolojik, klinik ve epidemiyolojik özellikleri. Hastane Infeks Derg 2000; 4:135-43.

61. Gültekin M, Ögünç D, Günseren F, Çolak D, Kırbaş İ, Mamıkoğlu L. Hastane infeksiyonu etkeni *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* suşlarının genişlemiş spektrumlu β-laktamaz ve antibiyotik duyarlılık özelliklerinin araştırılması. Infeks Derg 1999; 13:515-20.

62. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:1697-704.

63. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum betalactamase- producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. Clin Infect Dis 2001; 32:1162-8.

64. Özsoy MF, Öncül O, Yıldırım A, Pahsa A. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar: klinik önemi ve getirdiği sorunlar. Flora 2001; 6:3-9.

65. Gür D. Hastane infeksiyonları ve antimikrobiyal ajanlara çoğul dirençli gram-negatif bakteriler. Hastane Infeks Derg 2000;4:218-25.

66. Kaçmaz B, Çakır ÖF, Aksoy A. Hastane kaynaklı infeksiyonlardan izole edilen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* türlerinde genişlemiş spektrumlu betalaktamaz saptanması. ANKEM Derg 2005; 19:125-129.
67. Gülay Z, Biçmen MK, Yuluğ N. Genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz varlığının saptanmasında kullanılan çeşitli yöntemlerin değerlendirilmesi. ANKEM Derg 1998; 12:514- 521.
68. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta lactamases conferring transferable resistance to newer beta lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 1989; 10:867- 878.
69. Sirot S. Detection of extended spectrum plasmid mediated beta lactamases by disk diffusion. Clin Microbial Infect 1996; 2:35-42.
70. Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended spectrum beta lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. Antimicrob Agent Chemother 1992; 36:1877-1882.
71. Ho PL, Tsang NC, Que TL, Ho M, Yuen KY. Comparison of screening methods for detection of extended spectrum beta lactamases and their prevalence among *Escherichia coli* and *Klebsiella species* in Hong Kong. APMIS 2000; 108:237-40.
72. Pai H, Lyu S, Lee HJ, Kim J, Kwon Y, Kim JV, Choe KW. Survey of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Prevalence of TEM-52 in Korea. J Clin Microbiol 1999; 37:1758-63.
73. Tünger Ö, Arısoy AS, Özbakkaloğlu B, Gazi H. Nozokomiyal gram-negatif bakterilerde genişlemiş-spektrumlu ve kromozomal beta-laktamaz varlığının araştırılması. Flora 2001; 6:37-41.
74. Löker K, Beşirbellioğlu B, Kısa Ö, Aydoğan H, Dizer U, Pahsa A. Hastane

infeksiyonlardan izole edilen *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, izolatlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığının saptanması ve izoelektrik fokuslama yöntemi ile tiplendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi* 2001; 15:319-324.

75. Akçam FZ, Gönen İ, Kaya O, Yaylı G. Hastane infeksiyonu etkeni enterobakterilerde beta-laktam antibiyotiklere duyarlılık ve ESBL sıklığının araştırılması. *SDÜ Tıp Fak Derg* 2004; 11:6–9.

76. Köksal İ. Nozokomiyal üriner sistem infeksiyonlarının tedavisi. *Klimik Derg* 2000; 13:21 – 2.

77. Abacıoğlu YH, Aslani MM, Gülay Z, İnan S, Yuluğ N. Resistotyping and plasmid profile analysis of multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated durring a nosocomial outbreak. *İnfeks Derg* 1993; 9:63-8.

78. Tünger A, Hilmioğlu S, Dibek MA, Çavuşoğlu C, Aktaş L, Özkan F, Özinel MA. Hastane infeksiyonu etkeni olarak soyutlanan *Klebsiella pneumonia* ve *Escherichia coli* kökenlerinde genişlemiş spektrumlu β -laktamaz sıklığı. *İnfeks Derg* 1998; 12:165-8.

79. Dereli Y, Kuzu İ, Ak Ö, Ersöz G, Benzonana N, Kul Y, Özer S. Yoğun bakım ünitesinden izole edilen gram-negatif bakterilerde β -laktamazlar ve çeşitli antibiyotiklere duyarlılık. *ANKEM Derg* 1997; 11:98-103.

80. Kiremitçi A, Durmaz G, Aybey A, Us T, Akgün Y. *Escherichia coli* ve *Klebsiella* suşlarında NCCLS tarama ve fenotipik doğrulama yöntemleriyle genişlemiş spektrumlu β -laktamaz (ESBL) varlığının araştırılması. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre Kitabı Kuşadası 2004; 340-4.

81. Gönüllü N, Aktaş A, Salcıoğlu M, Bal Ç, Anğ Ö. Comparative in vitro activities of five quinolone antibiotics, including gemifloxacin, againts clinical isolates. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7:499-503.

82. Delialioğlu N, Öcal ND, Emekdaş G. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinde genişlemiş spektrumlu β -laktamaz oranları. ANKEM Derg 2005; 19:84-87.
83. Aydemir Ş, Uluer S, Akıncı P, Tünger A, Çilli F, Özinel MA. Toplum ve hastane kökenli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinde genişlemiş spektrumlu betalaktamaz üretiminin araştırılması. XXXI.Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre Kitabı Kuşadası 2004; 392-6.
84. Karavelioğlu S, Karatuna O, Söyletir G. Marmara Üniversitesi Hastane'sinde infeksiyon etkeni olarak saptanan *Enterobacteriaceae* izolatlarında ESBL bulunma sıklığı, 6.Antimikrobik ve Kemoterapi Günleri, Toplantı kitabı, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti İstanbul 2004; 161-5.
85. Kuzucu Ç, Kabakçıoğlu M, Özışık A, Ezen FO, Acar NS. Nozokomiyal gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu ve kromozomal beta laktamaz varlığının saptanması. Flora 1999; 4:102-6.
86. Gülay Z, Amyes SGB, Yuluğ N. Hastane infeksiyonlarından soyutlanan *Klebsiella pneumoniae* suşlarının beta-laktam antibiyotiklere duyarlılığının ve beta-laktamaz tiplerinin incelenmesi. Mikrobiyol Bült 1996; 39:1-8.
87. Yücesoy M, Biberöğlu K, Yuluğ N. İnfeksiyon etkeni gram-negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılık paternlerinin E testi ile araştırılması. Infeks Derg 1996; 10:229-35.
88. Kaleli İ, Özen N, Şengül M, Cevahir N, Aksit F. Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların çift disk sinerji yöntemiyle belirlenmesi. ANKEM Derg 1998; 12:442-446.
89. Du B, Long Y, Liu H, Chen D, Liu D, Xu Y, Xie X. Extended-spectrum beta-lactamases in producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. Intensive Care Med 2002; 28:1718-23.

90. Vahaboğlu HM, Mülazımoğlu L, Erdem İ, Yıldırım İ, Taşer B, Avkan V. Taksim Hastane'sinde β -laktam antibiyotiklere karşı gelişen direncin sürveyansı. *Klimik Derg* 1993; 6:79-82.
91. Zaoutis ET, Goyal M, Chu JH. Risk factors for outcomes of bloodstream infection caused by extended spectrum beta-lactamase-producing *E.coli* and *Klebsiella species* in children. *Çocukcs* 2005; 115:942-9.
92. Balkan İİ, Gençer S, Batirel A, Özer S. Florokinolonlara karşı direnç gelişimine katkıda bulunan çeşitli risk faktörlerinin analizi. *Flora* 2005; 10:65-73.
93. Eskitürk A, Korten V, Söyletir G. Akut bakım gerektiren hastalarda gelişen infeksiyonlardan izole edilen *Klebsiella* türlerinde antibakteriyel duyarlılık paternlerinin ve geniş spektrumlu beta-laktamaz sıklığının araştırılması. *ANKEM Derg* 1996; 10:14-8.
94. Abacıoğlu YH, Yücesoy M, Gülay Z, Yuluğ N. "Extended spectrum β lactamases" saptanmasında E testi ile çift disk sinerji yönteminin karşılaştırılması. *Infeks Derg* 1995; 9:93-8.
95. Akçam F Z, Gönen İ, Kaya O, Yaylı G. Hastane infeksiyonu etkeni çeşitli gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz yapımının iki yöntemle araştırılması. *Klimik Derg* 2004; 17:47-50.
96. Cormican MG, Marshall SA, Jones RN. Detection of extended-spectrum β lactamases (ESBL) production strins by the E-test ESBL screen. *Journal of Clinical Microbiology* 1996; 34:1880-5.
97. Vercauteren E, Descheemaeker P, Leven M, Sanders CC, Goossens H. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum β -lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian Teaching Hospital. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2191-97.

98. Günaydın M, Eroğlu C, Uyar Y, etin M, Snbl M, Leblebicioğlu H. Determination of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) production by double disk synergy method and E test in *Klebsiella* strains. ANKEM Derg 2001; 15:79-83.
99. Kim YK, Pai H, Lee HJ. Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:1481-91.
100. Gioia SB, Livermore DM. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella spp.* collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. J Antimicrob Chemother 2000; 45:183-9.
101. Mumcuoğlu İ, Gndz T, Baydur H. *Escherichia*, *Klebsiella* ve *Proteus* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığı ve eşitli antibiyotiklere direnç durumu. ANKEM Derg 2004; 18:9-11.
102. Yavuzdemir ř, Aysev AD, Griz H. Hastane kökenli ESBL yapan 50 *Klebsiella pneumoniae* suşunun bazı antibiyotiklere direnç oranları ve ESBL belilenmesinde diskler arası mesafenin nemi. Flora 2001; 6:196-200.
103. Babini GS, Livermore DM. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella spp.* collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. J Antimicrob Chemother 2000; 45:183-9.
104. etin BD, Gündüz A, şensoy A, Korkmaz F, Seber E. Hastane infeksiyonu etkeni gram (-) omaklarda GSBL retimi ve antibiyotik duyarlılıkları. Infeks Derg 2002; 16(4):463-70.
105. Aktaş Z, Gönüllü N. Hastanede yatan bir hastanın idrar örneğinden izole edilen *Escherichia coli* suşunda CTX-M-15 tipi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazın tanımlanması. Mikrobiyol Bült 2005; 39:421-9.

106. Gülay Z, Biçmen M, Atay T. Cefotaximase-M type beta lactamase production in *Escherichia coli* isolated at a university hospital in Turkey. 13th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Glasgow, UK. 10-13 May 2003; 9(1):381, P-1564.

107. Aktaş Z, Gönüllü N, Şalcıoğlu M, Bal Ç. *E.coli* ve *K.pneumoniae*'de genişlemiş spektrumlu beta laktamazların izoelektrik fokuslama ve PCR ile araştırılması. 6. Antimikrobik Kemoterapi Günleri-Klinik Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler, Program ve Özet Kitabı 2004; 160.

108. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM. Extended spectrum beta lactamases in *K.pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV and CTX-M type beta lactamases. Antimicrob Agent Chemother 2003; 47(11):3554-60.

109. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended spectrum beta-lactamase producing *E.coli* and *K.pneumoniae* in Russian hospitals. Antimicrob Agent Chemother 2003; 47(12):3724-32.

110. Arpin C, Dubois V, Coulange L. Extended spectrum beta lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in community and private health care centers. Antimicrob Agent Chemother 2003; 47(11):3506-14.