



T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İDRAR ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN  
GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ  
(GSBL) POZİTİF *ESCHERICHIA COLI*  
SUŞLARINDAKİ GSBL ENZİM TİPLERİNİN  
İZOELEKTRİK ODAKLAMA ve PCR YÖNTEMLERİ  
ile ARAŞTIRILMASI**

**Uzmanlık Tezi**

**Dr. Duygu DAĞLAR**

**Antalya, 2007**

## 1. GİRİŞ

Gram negatif bakteriler hastane kaynaklı infeksiyonlara neden olan etkenlerin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. Özellikle hematoloji-onkoloji servislerinde yatan hastalar ile yenidoğan yoğun bakım ünitelerindeki hastalarda ciddi infeksiyonlara neden olabilmektedir. Hastane ortamında sık ve geniş çaplı antibiyotik kullanımı çoklu dirençli suşların yayılımını kolaylaştıran ve tedaviyi güçleştiren faktörlerden biridir. Geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerin yaygın kullanımı ile bunlara karşı dirençli bakteriyel türlerin ortaya çıkışı artmıştır (1).

Beta-laktamaz sentezi özellikle enterik Gram negatif bakteriler için en önemli antibiyotik direnç mekanizmasıdır. Beta-laktamazlar, beta-laktam halkasındaki siklik amid bağına parçalayarak etki gösterirler. Beta-laktamaz genleri bakteride kromozomal kontrolünde olabilir veya plazmid ya da transpozonlarda yerleşmiş transfer edilebilir genlerde kodlanır. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi plazmid kaynaklı beta-laktamazlar *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında yaygın bulunan enzimlerdir ve bu enzimler plazmidler aracılığıyla diğer bakterilere aktarılırlar (2,3). Plazmid kaynaklı beta-laktamazlar, başlangıçta penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidrolize edebilen enzimler iken sonraları bu enzimleri kodlayan genlerde ortaya çıkan mutasyonlar sonucu genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) adı verilen, üçüncü kuşak sefalosporinleri ve aztreonamı hidrolize edebilen beta-laktamazlar tanımlanmıştır (4). Bu enzimlerin en önemli özelliği klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktamaz enzim inhibitörlerine duyarlı olmalarıdır. GSBL enzimleri esas olarak TEM ve SHV enzimlerinden köken alsalar da TEM ve SHV kökenli olmayan yeni plazmid kaynaklı GSBL'larda (CTX-M, OXA-1, PER-1, PER-2 gibi) de tanımlanmıştır. Bu yeni enzimler sefamisinler de dahil bütün sefalosporinlere karşı etkilidir (5). GSBL'lar ülkemizde ve tüm dünyada yaygın olarak bulunmaktadır. Günümüzde 200'den fazla GSBL tanımlanmıştır (6).

GSBL üreten suşlarla oluşan infeksiyonlar sıklıkla, hastanede uzun süre yatanlarda, operasyon geçirenlerde, arteriyel ve üriner kateteri olanlarda ve özellikle yoğun bakım servislerindeki hastalarda görülmekle birlikte toplum

kökenli infeksiyonlarda da sıklığı artmaktadır. GSBL'lar çoğunlukla hastane kökenli *Enterobacteriaceae* üyeleri tarafından eksprese edilirler. En sık *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ve *Escherichia coli* (*E. coli*) suşlarında olmakla birlikte diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde de saptanmaktadır (7,8).

GSBL enzimleri plazmid aracılığıyla kolay yayılmaları nedeniyle klinik izolatlar arasında tüm dünyada hızla artış göstermektedir. GSBL üreten suşların salgınlara yol açabilmeleri, bu suşların etken olduğu infeksiyonlarda tedavi başarısızlığı ve mortalite artışı gibi ciddi klinik problemlerin ortaya çıkışı GSBL enzimlerinin klinik laboratuvarlarda saptanmasını gerekli kılmaktadır (9,10).

GSBL üreten bakteriler geniş spektrumlu sefalosporinlere ve aztreonama dirençli oldukları halde rutin antibiyotik duyarlılık testlerinde duyarlı olarak bulunabilirler ve tedavi sırasında sorunlara yol açabilirler (3). GSBL enzimlerinin saptanmasında *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* fenotipik tarama ve doğrulama testlerinin kullanılmasını önermiştir (11).

CLSI sıvı mikrodilüsyon testi ile üçüncü kuşak sefalosporinlerden herhangi birinin (sefotaksim, seftazidim, aztreonam, seftriakson) MİK değeri  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$  olarak saptandığında ya da disk difüzyon testinde seftazidim inhibisyon zon çapının  $\leq 22$  mm; aztreonam ve sefotaksim zon çaplarının  $\leq 27$  mm; seftriakson zon çapının  $\leq 25$  mm olduğu durumlarda GSBL varlığı için doğrulama testi yapılmasını önermektedir. Doğrulama testlerinde GSBL'ların beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı olma özelliğinden faydalanılmaktadır. CLSI'e göre; klavulanik asit (10  $\mu\text{g}$ ) içeren genişlemiş spektrumlu beta-laktam disklerinin zon çaplarında  $\geq 5$  mm genişleme saptanması ya da standart sıvı dilüsyon testinde çift kat seri dilüsyon ile test edilen ilaçlardan birinin klavulanik asitle birlikte test edildiğindeki MİK değerinin, tek başına test edildiğindeki MİK değerine göre  $\geq 3$  dilüsyon azalması GSBL varlığını gösterir (11). Fenotip temeline dayalı doğrulama yöntemlerden hiç birisi Gram negatif bakterilerde GSBL varlığını doğru saptamada %100 duyarlı ve özgül değildir. Günümüzde klinik izolatlarda GSBL'ların doğru tanımlanması gerekliliği bilinmektedir (12).

GSBL'm ilk belirlendiği dönemlerde izoelektrik odaklama yöntemi ile bakterinin sentezlediği kromozomal veya plazmid kontrolündeki birkaç enzim

ayırtebileliyordu. (13). Ancak çoğu özdeş izoelektrik noktasına sahip enzim tiplerinin sayılarının artması nedeniyle beta-laktamazların tam olarak tiplendirilebilmesi ve spesifik GSBL tipinin belirlenmesi için günümüzde moleküler yöntemlere gerek vardır. En sık ve yaygın kullanılan moleküler yöntem “Polymerase Chain Reaction (PCR)”dır (14,15). DNA dizi analizi TEM ve SHV genlerindeki nükleotid değişikliklerini tam olarak saptayabilen tek yöntemdir. Bu analiz spesifik beta-laktamaz genlerini saptamada standart olma özelliğini korumaktadır (16,17).

GSBL sıklığı, antibiyotik kullanım politikalarına bağlı olarak ülkeler ve hastaneler arasında değişiklik gösterebilmektedir. Genel olarak dünyada GSBL üretiminin *Klebsiella sp.* türlerinde daha yaygın olduğu bildirilmektedir (18,19). Özellikle son on yıl içinde plazmidler tarafından kodlanan GSBL sıklığında büyük artış gözlenmektedir.

Ülkemizde ilk GSBL sentezleyen suşlar *K. pneumoniae*'de 1992 yılında bildirilmiştir (20). Son çalışmalara göre Türkiye Avrupa ülkeleri içinde GSBL sıklığının en yüksek olduğu ilk üç ülke arasındadır (21).

Bu çalışmanın amacı; Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Birimi'nde idrar örneklerinden izole edilen ve fenotipik tarama-doğrulama testleri ile GSBL pozitif olduğu saptanan 56 *E. coli* suşunda, GSBL enzim tiplerinin izoelektrik odaklama ve PCR ile araştırılmasıdır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Beta-Laktam Grubu Antibiyotikler

Beta-laktam antibiyotikler yaygın kullanım alanı bulunan bakterisid etkili ve toksisiteyi düşük olan ilaçlardır. Beta-laktam antibiyotikler başlıca 5 grupta toplanırlar:

1. Penisilinler
2. Sefalosporinler
3. Monobaktamlar
4. Karbapenemler
5. Beta-laktamaz inhibitörleri

Bu gruptaki tüm antibiyotiklerin ortak özellikleri yapılarında “beta-laktam” halkası adı verilen dört atomlu bir halka taşımalarıdır. Her grup beta-laktam antibiyotiğin özellikleri bu halkaya bağlanan başka halkalar ve yan zincirlerle belirlenir. Monobaktamlar sadece beta-laktam halkasından oluşur, monosiklik yapıdadır. Beta-laktamaz inhibitörleri beta-laktam antibiyotik olmalarına rağmen tek başlarına antibakteriyel etkileri pratik olarak yoktur (22,23).

#### 2.1.1. Beta-Laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması

Bakterilerin hücre duvarında yer alan peptidoglikan tabakası mikroorganizmanın yapısını ve bütünlüğünü sağlar. Bu tabaka çapraz bağlanan kısa peptid zincirleri ile sağlamlaşır. Bu çapraz bağlantı transpeptidasyon reaksiyonu sonucu oluşur. Transpeptidaz reaksiyonu oluşturan enzimlere penisilin bağlayan proteinler “PBP” adı verilir. Beta-laktam antibiyotiklerin temel hedefi penisilin bağlayan proteinlerdir. Beta-laktam antibiyotikler tarafından PBP’leri inhibe edilen bakteride peptidoglikan sentezlenemez ve hücre duvar yapısı bozulur (24). Hücre duvar yapısı bozulan bakteride ozmotik direnç kaybı ve ölüm meydana gelir (25).

Beta-laktam antibiyotiklerin hücre zarındaki hedeflerine bağlanabilmeleri için Gram negatif bakterilerin dış membranındaki porin (Outer Membran Protein: OMP) adı verilen içi su dolu protein kanallarından geçmeleri, sitoplazmik membranla dış membran arasındaki periplazmik boşlukta yer alan beta-

laktamazlardan etkilenmemeleri gerekmektedir (25). Gram pozitif bakterilerde ise dış membran olmayıp sitoplazmik membran üzerinde kalın bir peptidoglikan tabakası bulunur. Beta-laktamazlar bu tabakaya yapışık veya bakteri hücresi etrafında serbest olarak yer alırlar (26).

### **2.1.2. Beta-Laktam Antibiyotiklere Direnç Gelişimi**

Beta-laktam antibiyotikler toplum ve hastane kökenli infeksiyonların tedavisinde sık kullanılan antibakteriyel ajanlar arasındadır. Ancak yaygın kullanımları sonucu beta-laktam antibiyotiklere direnç oranlarının giderek arttığı gözlenmektedir (27).

Bakteriler beta-laktam antibiyotiklere karşı üç temel yolla direnç geliştirirler (28,29):

1. İlacın hedefine etkin konsantrasyonda ulaşmasının engellenmesi,
  - a- girişinin kısıtlanması (porin kaybı)
  - b- dışarı atılması (efluks mekanizması)

Genellikle Gram pozitif bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere karşı permeabilite engeli bulunmamasına karşın, Gram negatif bakterilerde dış membran, beta-laktam antibiyotiklere karşı doğal bir engel oluşturmaktadır. Beta-laktam molekülüleri, bakteri hücresindeki hedeflerine ulaşabilmek için dış membranda bulunan porinlerden geçmek zorundadır. Kromozomal mutasyonlar sonucu porin proteinlerinde oluşan değişiklikler geçirgenlikte bir azalmaya, bunun sonucunda da çeşitli penisilinler, sefalosporinler ve hatta karbapenemlere karşı direnç gelişimine yol açmaktadır. Bu tip direnç, özellikle enzimatik direnç ile birlikte bulunduğu büyük sorunlara neden olmaktadır (30).

Gram negatif bakterilerde beta-laktam antibiyotikler, dış membrandaki “outer membrane protein (OMP)” adı verilen porlar yolu ile hücreye girmektedir. Beta-laktam antibiyotikler dış membrandan porin F ve porin C adı verilen başlıca iki kanal aracılığı ile geçerler (31). 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 (24).

İmipenem dış membrandan ayrıca D2 proteini adı verilen özel bir porini kullanarak da geçer. Dolayısıyla bir Gram negatif bakteri porin F ve porin C proteinlerini mutasyona uğratarak tüm beta-laktamlara direnç geliştirebilirken, imipeneme duyarlı kalır. Öte yandan, özellikle *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ve *Enterobacter sp.* suşlarında dış membrandan D2 proteininin kaybolması bakteriyi imipeneme dirençli hale getirebilir (32).

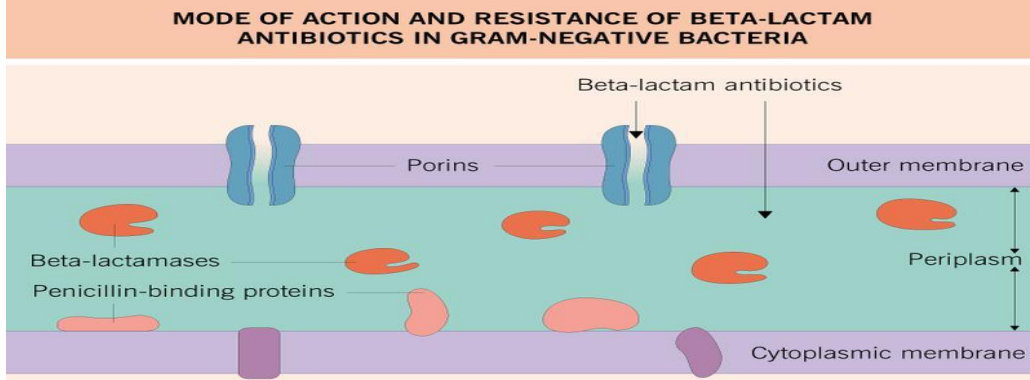
2. Hedef PBP yapısında değişiklik sonucu antibiyotiğin bağlanmasının engellenmesi,

PBP'lerin yapısındaki değişim beta-laktam direncinde önemli bir mekanizma olup bazı Gram pozitif koklarda ve *Pseudomonas sp.*'de gözlenmiştir. Kromozomal mutasyonlar sonucunda PBP'lerin beta-laktam antibiyotiklere karşı ilgilerinde azalma olabilir. Bu da beta-laktamlara karşı göreceli ya da tam bir dirence yol açabilir. PBP'lere bağlı direnç, penisiline dirençli *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*)'de, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ve *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*)'de, penisiline dirençli *Neisseria gonorrhoeae* ve *Neisseria meningitidis*' de, ampisiline dirençli *Haemophilus influenzae*'da ve penisilin ve sefalosporinlere dirençli enterokoklarda kesin olarak gösterilmiştir (33,34).

3. Beta-laktam antibiyotikleri parçalayan beta-laktamaz enzimlerinin sentezlenmesi,

Beta-laktam antibiyotiklere karşı direncin en sık nedeni, bakterilerin bu antibiyotikleri inaktive eden beta-laktamaz enzimlerini sentezlemesidir. Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler, beta-laktamaz ailesindeki enzimlerden biri veya birkaçı tarafından inaktive edilebilirler (35). Beta-laktamaz genleri bakteri kromozomunda veya plazmid, transpozon, integron gibi hareketli genetik elemanlarda bulunabilir (36).

Gram pozitif bakterilerde dış membran olmadığından ilk mekanizma ile direnç gelişmesi söz konusu değildir, ikinci mekanizma ile direnç gelişimi daha sık görülür. Buna karşın Gram negatif bakterilerde her üç mekanizma ile de direnç gelişebilmektedir. Beta-laktam antibiyotiklere direnç de sıklıkla yukarıda sayılan mekanizmaların birkaçının ortak etkilerinin bir sonucudur (33).



**Şekil 2.1** Gram-negatif bakterilerde beta-laktamlara direnç

## 2.2. Beta-Laktamazlar

Beta-laktamazlar; beta-laktam antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının amid bağı parçalayarak bu antibiyotikleri etkisiz hale getiren enzimlerdir. Penisilin, 1928 yılında Alexander Fleming tarafından keşfedildikten sonra 1940 yılında Abraham ve Chain *E. coli*'den elde ettikleri ekstrenin penisilinin etkisini ortadan kaldırdığını göstermişlerdir. Bu araştırmacılar elde ettikleri enzime "penisilinaz" adını vermişlerdir (37).

1960'lardan sonra semisentetik penisilinler, metisilin ve ampisilin, 1. kuşak sefalosporinlerden sefaloridin ve sefalotinin geliştirilmesiyle Gram negatif basillerde bulunan beta-laktamazlar önemli bir direnç mekanizması haline gelmiştir. Bunun nedeni tamamen antibiyotik kullanımı ile ilişkilidir. Metisilin ve ampisilin kullanıma girmesiyle penisiline dirençli stafilokokların yayılımı azalmış, Gram negatif bakterilerin oranı artmıştır. Gram negatif bakterilerde çok daha fazla çeşitte beta-laktamaz bulunduğu ve plazmid kontrolünde sentezlenebildiğinden çok kısa sürede dirençte artış gözlenmiştir. Buna bağlı olarak ilaç endüstrisinde yeni grup beta-laktam ilaçlar geliştirilmiş, ancak bilindiği gibi bunlara karşı da yeni beta-laktamazlar ortaya çıkmıştır (1,37).

Beta-laktamazlarla hidrolize olmayan yeni beta-laktamların geliştirilmesi 1980'li yıllarda 3. kuşak sefalosporinlerin yaygın olarak kullanılmasına yol açmıştır. 1983 yılında Almanya'da *K. pneumoniae* suşlarında, 3. kuşak sefalosporinleri de parçalayan plazmid kaynaklı bir beta-



laktamaz bulunmuştur (38). Bu yeni beta-laktamaz *Klebsiella* türlerinde sık olarak bulunan SHV-1 beta-laktamazından mutasyonla oluşan SHV-2 enzimidir. Bunun ardından Fransa'da seftazidime dirençli *K. pneumoniae* suşlarında, seftazidimi hidrolize eden TEM-2 enziminden yalnız iki aminoasit farkı bulunan plazmid kaynaklı beta-laktamaz belirlenmiştir (5).

Beta-laktam ajanların yaygın kullanımı, beta-laktamazların evrimsel değişikliklere uğramasına, sayı ve etki spektrumlarının inanılmaz bir ivme ile artmasına neden olmuştur. 1995'den 2000 yılına kadar bazı önemli beta-laktamaz gruplarında enzim sayısı hemen hemen iki katına çıkmıştır (35).

### 2.2.1. Beta-Laktamazların Sınıflandırılması

Beta-laktamazlar için farklı zamanlarda bir çok sınıflandırma şeması önerilmiştir. Bu sınıflandırmalar içinde en çok ikisi kullanılmaktadır. Ambler tarafından 1980 yılında yapılmış olan birinci sınıflandırma enzimleri kodlayan nükleotid dizilerine dayanan moleküler sınıflandırmadır.

Dizileri bugüne değin belirlenebilen beta-laktamazlar moleküler sınıflandırmada A,B,C ve D olmak üzere dört moleküler sınıfta toplanmaktadır. A, C ve D sınıfları aktif bölgelerinde "serin" içermekte, B sınıfında ise aktif bölgede "çinko" bulunmaktadır. Ambler sınıf A enzimleri çoğunlukla plazmid kontrolunda olan penisilinazlardır. Sınıf B beta-laktamazlar, aktif bölgelerinde  $Zn^{+2}$  bağımlı bir tiyol grubu bulunan metalloenzimlerdir. Bu enzimlerin çoğu karbapenemaz aktivitesi taşımaktadır. C sınıfı enzimler sefalosporinazdır ve çoğunlukla kromozom kontrolundadır. Kromozomal AmpC geni tarafından kodlandıkları için, AmpC tipi enzimler olarak da bilinirler ve *Salmonella* türleri haricinde tüm Gram negatif basillerde bulunan beta-laktamazlardır. D sınıfı enzimler oksasilinazlardır ve oksasilini hızla hidrolize ederler (1,39).

Beta-laktamazların en yeni sınıflandırma şeması, 1995 yılında Bush, Jacoby ve Medeiros tarafından yapılan, beta-laktamazların biyokimyasal özellikleri ve substrat profillerine göre dört gruba ayrıldığı sınıflandırmadır. Beta-laktamazların sınıflandırılması ve karşılaştırılması Çizelge 2.1'de gösterilmiştir (39,40).

**Çizelge 2.1.** Beta-laktamazların sınıflandırılması (39, 40)

Beta-laktamaz grubu	Molekül sınıfı	Özellikleri ve örnek enzimler
1	C	Gram negatif bakterilerin kromozomal ve plazmid kökenli AmpC enzimleri (MIR-1, BIL-1, MOX-1, CMY-1, LAT-1, FOX-1, ACT-1). Karbapenemler dışındaki tüm beta-laktamlara direnç oluşturur. Klavulanik asit ile inhibe olmaz.
2a	A	Stafilokok ve enterokoklardaki penisilinazlar
2b	A	Çoğunlukla Gram negatif bakterilerdeki geniş spektrumlu beta-laktamazlar (TEM-1, TEM-2, SHV-1, SHV-11, SHV-19, SHV-25)
2be	A	Oksiiminosefalosporin ve monobaktamlara direnç oluşturan genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (TEM-3-29, TEM-42,43, TEM-47-50, SHV-2-9, SHV-12-18, SHV-20-25, PER-1,2, CTX-M-1-16, GES-1,2, VEB-1,2, TOHO-1,2, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	A	İnhibitörlere dirençli TEM (IRT) beta-laktamazlar (TEM-30-36, TEM)
2c	A	Karbenisilini hidroliz eden enzimler (PSE-1, PSE-3, PSE-4, CARB-3-5, BRO-1-3, SAR-1)
2d	D	Oksasilini hidroliz eden enzimler ;OXA tipi enzimler (OXA-1-31) Dar spektrum: OXA-1-10, OXA-20,27,30,31 GSBL etkili: OXA-11-19, OXA-28 Karbapenem hidrolizi yapanlar: OXA-23-27
2e	A	Klavulanik asit ile inhibe olan sefalosporinazlar <i>P. vulgaris</i> 'in indüklenebilir sefalosporinazları
2f	A	Karbapenemleri hidrolize eden, aktif bölgesinde serin içeren ve klavulanik asit ile inhibe olan enzimlerdir. <i>E. cloacae</i> 'nın NMC-A ve <i>Serratia</i> 'nın Sme-1 enzimi
3	B	Karbapenemler ve monobaktamlar dışındaki beta-laktamlara direnç oluşturan metalo-betalaktamaz. Klavulanik asitle inhibe olmazlar <i>Xanthomonas maltophilia</i> 'nın L1 ve <i>Bacteroides fragilis</i> 'in CcrA enzimi
4	?	<i>Pseudomonas cepacia</i> 'nın penisilinazları

### **2.2.2. Beta-Laktamazların İsimlendirilmesi**

Beta-laktamazlar tercih ettikleri substratlara (CARB, FUR, IMP, OXA), biyokimyasal özelliklerine (SHV, NBC), genlerine (Amp, CepA), izole edildikleri bakterilere (AER, PSE), suşlara (P99), hasta isimlerine (TEM, ROB), hastaneye (MIR, RHH), eyaletlere (OHIO) ve bulan kişiye göre (HMS) isim almışlardır. Son yıllarda büyük bir hızla artmakta olan TEM enziminden türeyen enzimlere ise CAZ (seftazidimaz), CTX (sefotaksimaz) veya IRT (inhibitör rezistan TEM) gibi tanımlayıcı adlar verilmiş ve bu da bir karmaşaya yol açmıştır. Bu konuda önerilen ise, TEM'den köken alan tüm enzimlerin TEM-26, TEM-43 gibi numara ile belirtilmesidir (41).

### **2.2.3. Plazmidler ve Antibiyotik Direncindeki Roller**

Plazmidler bakteri hücrelerinin kromozomu dışında sitoplazmada yer alan halka yapısında DNA parçalarıdır. Plazmidlerin taşıdığı genetik şifre bakterinin yaşaması için mutlak gerekli değildir. Ancak plazmidler antibiyotik direnci gibi bakteriye çevre koşullarına dayanmada üstünlük sağlayabilecek bazı özellikler kazandırabilir. Bir plazmid üzerinde birden fazla antibiyotik grubuna karşı direnç sağlayacak genetik şifre taşınabilir. Örneğin bir bakteri, plazmidleri üzerinde değişik beta-laktamazları kodlayan genlerle birlikte aminoglikozidleri parçalayan enzim sentezini sağlayan genetik şifreyi taşıyabilir. Plazmidler bir bakteriden diğerine transfer edilebilir. Bu sayede plazmid aracılığı ile sağlanan direnç kolayca bakteriler arasında yayılabilmektedir (42).

### **2.2.4. Gram Negatif Bakterilerin Önem Taşıyan Beta-Laktamazları**

#### **a-Kromozomal Beta-Laktamazlar**

Hemen hemen tüm Gram negatif bakteriler kromozomal kaynaklı beta-laktamaz üretebilirler. Beta-laktamaz genellikle spesifiktir ve aktivitesi çok düşüktür. Ancak bunların miktarı, sentez yolu ve dirençteki rolleri farklıdır. Enterobakterilerin kromozomal enzimlerinin büyük çoğunluğu sınıf C'de yer alır. AmpC olarak da tanımlanan bu enzimler Bush sınıflandırmasına göre

Grup 1' de yer almaktadır.

Kromozomal AmpC tipi enzimler, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Aeromonas spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii* (*C.frendii*), *Serratia spp.*, *Morganella morganii* (*M. morganii*), *Providencia stuartii* (*P. stuartii*) ve *Providencia rettgeri* (*P. rettgeri*)' de tanımlanmıştır. Bu enzimler aktif bölgelerinin özellikleri nedeniyle birinci, ikinci, üçüncü kuşak sefalosporinleri, penisilinleri ve monobaktamları hidrolize edebilirler. Sefalosporinlerden sefepim, grup 1 kromozomal enzimlerin etkilerine göreceli olarak dayanıklıdır. Bu enzimler, aktif bölgelerinin yapısal özellikleri nedeniyle klavulanik asit ve sülfonların beta-laktam halkalarına bağlanamazlar. Bu nedenle de beta-laktamaz inhibitörlerine dirençlidirler (27,43).

Enzim ekspresyonu “indüklenebilir”, “yüksek düzeyde yapısal” veya “düşük düzeyde yapısal” olabilmektedir. *P. aeruginosa*' da bulunan Grup 1 beta-laktamazlar indüklenebilen türdedir. Bu bakteriler bazı beta-laktam antibiyotiklerle (ampisilin, 1. kuşak sefalosporinler gibi) karşılaştıklarında, kromozomal beta-laktamaz sentezi hızla artar (indüksiyon). Ancak indüksiyon geçici bir olay olup, ortamda sentezi artan beta-laktamazın, antibiyotiği inaktive etmesi sonucu durur. Böylece bakteri başlangıçtaki düşük düzeyde enzim sentezleyen haline döner.

İndüklenebilir kromozomal beta-laktamaz taşıyan Gram negatif bakterilerde normalde  $10^{-5}$ - $10^{-7}$  arasında bir sıklıkla baskılanmış dereprese mutantlar bulunur. 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 mikroflorasına yerleşmesine bağlı olarak da hastane infeksiyonu epidemileri ortaya çıkabilmektedir (1,44).

İndüklenebilir beta-laktamaz ürettiği bilinen bakterilerde dikkat edilecek noktalar şunlardır (45):

-İndüklenebilir beta-laktamaz varlığı laboratuvarından bildirilmemiş olsa da

*Enterobacter spp, C. freundii, Serratia spp, P. stuartii, P. rettgeri, Pseudomonas spp. ve Hafnia alvei* suşlarının bu özellikte olduğu ve antibiyogramlarda antibiyotiklere duyarlı görülebilecekleri unutulmamalıdır.

-Bu suşlarla gelişen infeksiyonlarda 2. ve 3. kuşak sefalosporinler ve aztreonam'ın tek başlarına kullanılmasından kaçınılmalıdır.

-Tedavi sırasında direnç gelişebileceğinden, uzun süreli tedavi gerekiyorsa bu suşların antibiyotik duyarlılık testleri 3-4 günde bir tekrarlanmalıdır.

-Dereprese beta-laktamazlar sentezleyen ve aynı zamanda dış membran porinleri eksik olan *P. aeruginosa* suşları vardır. Bunlar birçok beta-laktam antibiyotik yanında karbapenemlere, sefepim ve sefpiroma da dirençlidirler.

-İndüklenebilen AmpC tipi beta-laktamazı olmayan bakteri türlerinde kromozomal beta-laktamazların aşırı üretimi ile olan direnç özelliğinin görülmesi plazmid kaynaklı AmpC tipi beta-laktamazı düşündürmelidir (46,47).

### **b- Plazmid Aracılığı İle Sentezlenen Beta-Laktamazlar**

Plazmid kaynaklı beta-laktamazlar;

1. Dar spektrumlu enzimler,
2. Oksasilinazlar,
3. Karbenisilinazlar,
4. GSBL'lar,
5. TEM, SHV veya OXA dışında diğer sınıf A oksimino-beta-laktamazlar,
6. Sefalosporinazlar
7. Karbapenemazlar olarak yedi grupta toplanmaktadır (Çizelge 2.2) (25).

**Çizelge 2.2 Bazı plazmid kökenli beta-laktamazların özellikleri (25)**

Beta-laktamazlar	Sıklığı	Konak bakterisi	Spesifik
<b>• DAR SPEKTRUMLULAR</b>			
TEM-1	Çok sık	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>H. influenzae</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>Vibrio cholerae</i>	En yaygın plazmid kaynaklı beta-laktamaz, hemen hemen bütün bakterilerde bulunur.
TEM-2	Sık	<i>Enterobacteriaceae</i>	TEM-1 'den bir aminoasit değişikliği vardır.
SHV-1	Sık	<i>Enterobacteriaceae</i>	Sıklıkla <i>K. pneumoniae</i> 'de kromozomal genlerle kodlanır.
<b>• OKSASİLİNAZLAR</b>			
OXA-1	Sık	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i> ' de 2. sıklıkla bulunur.
OXA-2	Sık	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Salmonella</i> 'da 2. sıklıkla bulunur.
OXA-3...10		<i>Enterobacteriaceae</i>	OXA-1 'e göre daha geniş bir aktiviteye sahiptirler.
<b>•KARBENİSİLİNAZLAR</b>			
CARB-1(PSE-4)	Nadir	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P. aeruginosa</i>	
CARB-2(PSE-1)	Sık	<i>P.aeruginosa</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>P aeruginosa</i> ' da en sık bulunur.
CARB-3...6	Nadir	<i>P. aeruginosa</i>	
<b>• GSBL</b>			
TEM türevi: TEM-3...29 TEM-42, 43, 47, 48, 49, 50, 52, 60, 61	Tüm dünyada nozokomiyal salgınlarda sıklıkla sıklıkla.	<i>K. pneumoniae</i> , daha az sıklıkta diğer <i>Enterobacteriaceae</i>	TEM-1 ve TEM-2'den 1 ile 5 aminoasit değişikliği sonucu oluşurlar.
SHV Türevi: SHV-12	Tüm dünyada nozokomiyal salgınlarda sıklıkla.	<i>K. pneumoniae</i> , daha az sıklıkta diğer <i>Enterobacteriaceae</i>	SHV-1 'den 1 ile 3 aminoasit değişikliği sonucu oluşur.
OXA Türevi: OXA-11, OXA-14-OXA-16	Türkiye'de nozokomiyal izolatlar	<i>P. aeruginosa</i>	
CTX-M-1 (MEN-1)	Fransa ve Almanya klinik izolatları	<i>E. coli</i>	
PER-1	Türkiye'nin farklı hastanelerinden klinik izolatlar	<i>P. aeruginosa</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>Acinetobacter sp.</i>	
<b>• SEFAMİSİN AZLAR</b>			
CEP-1	Nadir	<i>Proteus mirabilis</i>	
CEP-2	Nadir	<i>Achromobacter</i>	
CMY-2...5	Nadir	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Citrobacter</i> 'in kromozomal beta-laktamazına benzer.
LAT-1	Yunanistan nozokomiyal izolatlar	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Citrobacter</i> 'in kromozomal beta-laktamazına benzer
<b>• KARBAPENEMAZLAR</b>			
IMP-1	Nadir	<i>P. aeruginosa</i>	İmpenemi parçalayan metallo enzimlerdir

Plazmidler tarafından kodlanan beta-laktamazlardan en önemli olanları Gram negatif bakterilerde bulunan TEM ve SHV enzimleri ve bunların genişlemiş spektrumlu türevleridir. Bunların tümü Ambler moleküler sınıf A'da yer alır.

### 2.3 Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar

Geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotikler Gram negatif bakterilerle oluşan infeksiyonların tedavisinde 1980'li yıllardan itibaren kullanılmaya başlanmıştır. Bu yeni beta-laktam antibiyotiklere, beta-laktamazlarla gelişen direnç hızla artmıştır (36). Geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize eden, plazmid ile kodlanan beta-laktamaz ilk olarak 1983 yılında Almanya'da *Klebsiella ozaenae* suşundan izole edilmiştir. Bu beta-laktamaz SHV-2 tipinde olup sefotaksimi seftazidime oranla daha fazla hidrolize etme yeteneğindedir ve SHV-1 enziminde 238. pozisyonda glisin yerine serin girmesiyle oluşmuştur (48).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, Ambler moleküler sınıf A'da yer alan grup 2be, grup 2e ve sınıf D (grup 2d) beta-laktamazlardan oluşur. Birçok Gram negatif bakteride bulunurlar. Bu enzimlerin etki spektrumlarının oksimino-beta-laktamları da kapsamaması nedeniyle genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar olarak adlandırılmışlardır. GSBL'lar; geniş spektrumlu penisilinlere, 1,2,3. jenerasyon sefalosporinlere (sefamisinler hariç) ve kısmen sefepime etkili, karbapenemlere, sefamisinlere ve beta-laktamaz inhibitörlerine etkisizdirler.

Klasik olarak tanımlanan GSBL'ların büyük çoğunluğu TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimlerinden köken almıştır. Köken alınan ana enzimin moleküler yapısındaki aminoasitlerden bir ile dördünün yerine farklı aminoasitlerin gelmesi sonucu GSBL'ler oluşur. Günümüzde TEM türü beta-laktamazların sayısı 130'u, SHV türü beta-laktamazlarınki 50'yi geçmiştir. Bu üç enzimin türevleri dışında son yıllarda bunlardan köken almayan CTX-M, PER, VEB vb. genişlemiş spektrumlu enzimlerde büyük bir artış olmuştur (49). SHV ve TEM türevi enzimler grup A'da yer almaktadır. OXA türevi olan GSBL'ler ise grup D'de yer alan oksasilinazlardır. GSBL türü enzimler Gram negatif

bakterilerde sıklıkla bulunmaktadır. Özellikle *Enterobacteriaceae* ailesinden *K. pneumoniae*'de en sık gözlenmekle birlikte *E. coli* ve *Salmonella spp.*'de de sıklığı artmaktadır (50). *Enterobacteriaceae* ailesi dışında GSBL üreten mikroorganizmaların sıklığı daha az olup bunların içinde en sık *P. aeruginosa*'da gözlenmektedir (51). Son yıllarda GSBL üretimi *Acinetobacter sp*, *Burkholderia cepacia* ve *Alcaligenesis faecalis* izolatlarında da bildirilmiştir (36).

### 2.3.1 GSBL tipleri

**a-TEM grubu GSBL'ler:** Plazmid kökenli bilinen en eski enzim olan TEM-1 bakteride ampisilin, penisilin ve birinci kuşak sefalosporin direncine neden olur. TEM-1 Gram negatif bakterilerde en sık bulunan enzimdir ve ampisiline dirençli *E. coli*'lerin %90'ında dirençten bu enzim sorumludur. TEM-1'in yapısında bir aminoasit değişikliğine (39. pozisyondaki glutamin yerine lizinin geçmesi) neden olan mutasyon sonucu TEM-2, bu enzimin yapısında 2 aminoasit değişikliği ile de TEM-3 ortaya çıkar. TEM-1 ve TEM-2 etki spektrumu açısından benzer (penisilin ve türevlerine karşı aktif) birer penisilinazdır . Sıklıkla transpozonlar tarafından kodlanan dar spektrumlu enzimler olup; penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidroliz edebilirler. Ancak oksiiimino-sefalosporinlere karşı aktiviteleri yoktur (46). İlk olarak 1987 yılında bildirilen TEM-3, GSBL fenotipi gösteren ilk TEM tipi beta-laktamazdır. (36,50).

TEM enziminde 12 farklı pozisyonda oluşan aminoasit değişikliklerinin kombinasyonları, izoelektrik noktaları 5.2-6.5 arasında değişen, seftazidim ve sefotaksim gibi spesifik oksiiimino-sefalosporinleri hidroliz etme yeteneğinde, 100'ün üzerinde farklı GSBL fenotipini ortaya çıkarmıştır. Bu enzimlerin bir kısmı inhibitör dirençli TEM (IRT) türünde enzimler olup, geniş spektrumlu sefalosporinleri inhibe etmediklerinden ötürü gerçek anlamda GSBL olarak kabul edilmezler. Günümüzde sayısı 20'den fazla bulunan IRT türü enzimler klasik GSBL'lerin aksine beta-laktamaz inhibitörlerinin etkilerine (özellikle sulbaktam ve klavulanik asit) karşı dirençlidir. Ancak tazobaktam bu enzimleri inhibe edebilmektedir.



TEM kökenli GSBL'ler en sık *E. coli*, *K.pneumoniae*'de tanımlanmış olmakla birlikte, *Salmonella sp*, *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*), *M. morgani* ve *P. aeruginosa* türlerinde de bulunabilecekleri bildirilmiştir (51,52,53,54). TEM tipi enzimlerin özellikleri Çizelge 2.3'te gösterilmiştir (36).

**b-SHV grubu GSBL'ler:** SHV-1 enzimi en sık *K. pneumoniae*'de bulunur ve bu bakterideki plazmid aracılığıyla gelişen ampisilin direncinin yaklaşık %20'sinden sorumludur. Ampisilin, tikarsilin ve piperasiline karşı direnç oluşturmaktadır. Oksiimino-sefalosporinlere karşı aktivitesi yoktur (52). SHV türü enzimlerin ilk türevi 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, 240. pozisyonda glutamin yerine lizin girmesidir. Sonuçta 238. pozisyondaki serin rezidüsü seftazidime, 240. pozisyondaki lizin rezidüsü ise sefotaksime karşı hidroliz etkinliği açısından önemlidir. SHV grubu enzimler *K. pneumoniae*'den başka *Citrobacter diversus*, *E.coli* ve *P. aeuroginosa*'da bildirilmiştir. SHV tipi GSBL'lerin özellikleri Çizelge 2.4'te gösterilmiştir (36).

**Çizelge 2.3.** TEM tipi beta-laktamazların özellikleri (36)

İzoelektrik nokta (pI)	Enzimler	Enzim Tipi		
		Geniş spektrum	GSBL	İnhibitör dirençli
5.2	TEM-12, TEM-55, TEM-57, TEM-58		X	
	TEM-30, TEM-31, TEM-35, TEM-36, TEM-37, TEM-38, TEM-41, TEM-45, TEM-51, TEM-73, TEM-74			X
5.3	TEM-25		X	
5.4	TEM-1	X		
	TEM-7, TEM-19, TEM-20, TEM-65		X	
	TEM-32, TEM-33, TEM-34, TEM-39, TEM-40, TEM-44			X
5.42	TEM-29		X	
5.55	TEM-5, TEM-17		X	
5.59	TEM-9		X	
5.6	TEM-2	X		
	TEM-10, TEM-11, TEM-13, TEM-26, TEM-63		X	
	TEM-50		X	X
	TEM-59			X
5.7	TEM-68		X	X
5.8	TEM-42		X	
5.9	TEM-4, TEM-6, TEM-8, TEM-27, TEM-72		X	
6.0	TEM-15, TEM-47, TEM-48, TEM-49, TEM-52, TEM-66, TEM-92		X	
6.1	TEM-28, TEM-43		X	
6.3	TEM-3, TEM-16, TEM-21, TEM-22		X	
6.4	TEM-56, TEM-60		X	
6.5	TEM-24, TEM-46, TEM-61		X	
Bilinmiyor	TEM-14, TEM-53, TEM-54		X	
	TEM-76, TEM-77, TEM-78, TEM-79, TEM-81, TEM-82, TEM-83, TEM-84			X

**Çizelge 2.4.** SHV tipi beta-laktamazların özellikleri (36)

İzoelektrik nokta (pI)	Enzimler	Enzim Tipi		
		Geniş spektrum	GSBL	İnhibitör dirençli
7.0	OHIO-1, LEN-1	X		
	SHV-3, SHV-14		X	
7.5	SHV-24		X	
7.6	SHV-1, SHV-11,	X		
	SHV-2, SHV-2a, SHV-6, SHV-8, SHV-13, SHV-19, SHV-20, SHV-21, SHV-22		X	
7.8	SHV-4, SHV-7, SHV-18		X	
8.2	SHV-5, SHV-9, SHV-12		X	
	SHV-10			X

**c-CTX-M grubu GSBL'ler:** Bu grup enzimler substrat olarak sefotaksimi tercih etmektedir (36). CTX-M tipi beta-laktamaz ilk olarak 1989 yılında Almanya'da *E.coli* suşunda bildirilmiştir. Daha sonraları *Salmonella typhimurium* ve *E. coli* başta olmak üzere birçok *Enterobacteriaceae* türünde saptanmıştır. Günümüzde yaklaşık 40 farklı enzim gösterilmiştir. CTX-M-14, CTX-M-3 ve CTX-M-2 en yaygın enzimlerdir. Yayılmaları hem plazmidler hem de ISEcp1 gibi hareketli genetik elemanlarla olmaktadır. CTX-M enzimlerini üreten mikroorganizmaların çoğunlukla hastane infeksiyonlarından izole edilmelerine karşın SHV ve TEM enzimlerinden farklı olarak *Vibrio cholerae*, tifo dışı *Salmonella sp.* ve *Shigella sp.* gibi toplum kaynaklı infeksiyon etkenlerinde de bildirilmektedir. Sefotaksim ve seftriaksonun toplumda yaygın kullanımının CTX-M enzimlerinin ortaya çıkışında rol oynadığı düşünülmektedir (56).

CTX-M grubu enzimlerin sayısı hızla artmaktadır. *Enterobacteriaceae* izolatlarında saptanan bu enzimler, dünyanın bir çok yerinden rapor edilmiştir (57).

**d-OXA grubu GSBL'ler:** OXA tip beta-laktamazlar oksasilini hidrolize etme yeteneklerinden dolayı bu ismi almışlardır. Bu grup enzimler fonksiyonel grup 2d ve moleküler sınıf D'de yer almalarıyla TEM ve SHV enzimlerinden ayrılırlar. En sık *P. aeruginosa*'da bulunmakla birlikte diğer Gram negatif bakterilerde de saptanmaktadır. En yaygın olanı OXA-1 beta-laktamazıdır ve *E. coli* suşlarının %1-10'unda saptanmıştır (1). Bu enzimlerin OXA-1 den OXA-10'a kadar olanları dar spektrumlu olup substrat olarak oksasilin ve kloksasilini tercih ederler (1,36,52).

TEM ve SHV'de olduğu gibi aminoasit dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oksiiimino-sefalosporinleri hidrolize edebilen geniş spektrumlu enzimler haline gelmişlerdir (1,58). OXA-11,14,15 ve 16 seftazidim direncine yol açarken, OXA-17 seftoksime direnç oluşturmaktadır (36). OXA-31 ise sefepime direnç oluştururken seftazidime duyarlıdır (59). OXA-24 ayrıca karbapenemaz aktivitesi göstermektedir. Fakat bu GSBL enzimi değildir. Bu enzimlerin önemi, klavulanik asit ve sulbaktama dirençli olmaları ve hastane infeksiyonlarından soyutlanan kökenlerde saptanmalarıdır (21).

**e-PER grubu GSBL'ler:** PER ile TEM ve SHV tipi GSBL'lar %25-27 oranında homoloji gösterirler (60,61). İlk olarak Fransa'da bir Türk hastadan izole edilen *P. aeruginosa* suşunda saptanmıştır. PER-1 enzimi penisilin ve sefasporinleri hidrolize eder ve klavulanik asit ile inhibe olur (62). *P. aeruginosa* dışında *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), *A. faecalis* ve *P. mirabilis* suşlarında da saptanmıştır (63,64,65).

PER-1 ile %86 homoloji gösteren PER-2 enzimi sadece Güney Afrika'da bulunmaktadır (61).

**f-VEB grubu GSBL'ler:** VEB-1 enzimi; PER-1 ve PER-2 enzimleriyle %38 oranında homoloji gösterir. Seftazidim, seftoksime ve aztreonama yüksek düzeyde direnç gösterirler ve klavulanik asit ile inhibe olurlar. VEB-1 ilk olarak Vietnam'da *E. coli* suşundan izole edilmiştir (66).

**g-Diğer GSBL'ler:** GES-1-2, BES-1, TLA-1, TOHO-1-2, BES, SFO, TLA

### 2.3.2. Epidemiyoloji

GSBL üreten organizmalar ilk olarak Avrupa'da saptanmıştır. İlk büyük salgın 1986 yılında Fransa'da bir hastanenin yoğun bakım ünitesindeki 54 hastada bildirilmiştir (67). Günümüzde Avrupa'da yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Klebsiella* izolatlarının %20-25'inde GSBL saptanmaktadır. Son çalışmalara göre Türkiye Avrupa ülkeleri içinde en yüksek GSBL sıklığına sahip ilk üç ülke arasındadır (68). Avrupa ülkelerinde GSBL dağılımları açısından farklılıklar gözlenmektedir (69).

TEM-10 yıllardır Amerika'da salgınlar yapmış (21,70), oysa yakın zamanda Avrupa'dan rapor edilmiştir (71). Benzer olarak TEM-3 Fransa'da (72), TEM-47 Polonya'da (73) bulunmaktadır. Türkiye dahil dünyada en yaygın olan enzim ise SHV-2'dir (10,21).

### 2.3.3. GSBL tanı yöntemleri

GSBL enzimlerinin tüm dünyada hızla artması, klinik izolatlarda yaygın olmaları, plazmid aracılığı ile kolay yayılmaları, salgın, sağaltım başarısızlığı, mortalite artması gibi ciddi klinik problemlere neden olmaları ve rutin duyarlılık testleri ile tanımlanmalarının güç olması nedeniyle özel yöntemler ile doğru saptanmaları gerekmektedir (10,74).

GSBL üreten bakteriler geniş spektrumlu sefalosporinlere ve aztreonama dirençli oldukları halde rutin antibiyotik duyarlılık testlerinde duyarlı olarak bulunabilirler ve tedavi sırasında sorunlara yol açabilirler (9).

*K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis* ve *Klebsiella oxytoca*'da, GSBL enzimlerinin saptanmasında CLSI fenotipik tarama ve doğrulama testlerinin kullanılmasını önermiştir.

#### **a-GSBL tarama testleri:**

CLSI sıvı mikrodilüsyon testi ile sefotaksim, seftazidim, seftriakson, aztreonam MİK değeri  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$ , sefpodoksim MİK değeri ise  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$  olarak saptandığında ya da disk difüzyon testinde seftazidim inhibisyon zon çapının  $\leq 22$  mm, sefpodoksim zon çapının  $\leq 17$  mm, aztreonam ve sefotaksim

zon çaplarının  $\leq 27$  mm; seftriakson zon çapının  $\leq 25$  mm olduğu durumlarda GSBL varlığı için doğrulama testi yapılmasını önermektedir (izelge 2.5) (11). Fenotip temeline dayalı doğrulama yöntemlerden hiç birisi Gram negatif bakterilerde GSBL varlığını doğru saptamada %100 duyarlı ve özgül değildir. Günümüzde klinik izolatlarda GSBL'nin doğru tanımlanması gerekliliği bilinmektedir (12).

**Çizelge 2.5.** GSBL'ler için tarama testi olarak önerilen inhibisyon zonu ve MİK değerleri (CLSI)-(11)

Antibiyotik	İnhibisyon zonu (mm)	MİK ( $\mu\text{g/mL}$ )
Sefotaksim	$\leq 27$	$\geq 2$
Seftriakson	$\leq 25$	$\geq 2$
Seftazidim	$\leq 22$	$\geq 2$
Sefpodoksim	$\leq 17$	$\geq 8$
Aztreonam	$\leq 27$	$\geq 2$

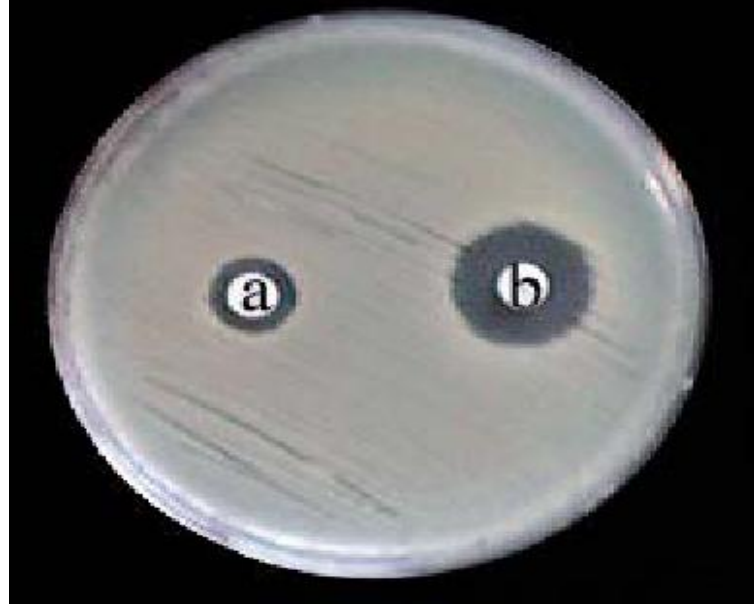
### **b-GSBL doğrulama testleri**

Doğrulama testlerinde GSBL'lerin beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı olma özelliğinden faydalanılmaktadır. Sık olarak kullanılan yöntemler;

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

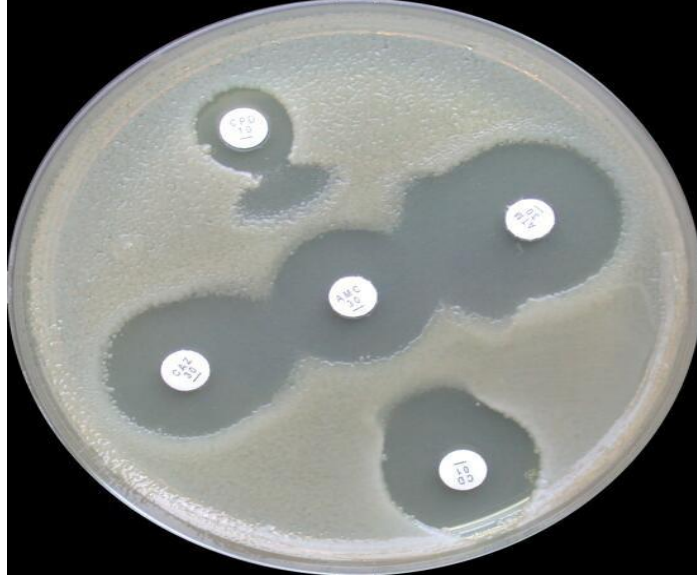
**1-Kombine disk yöntemi:** 0.5 McFarland yoğunluğundaki bakteri süspansiyonunun yayıldığı Mueller Hinton besiyerine klavulanik asit (10  $\mu\text{g}$ ) içeren ve içermeyen seftazidim (30  $\mu\text{g}$ ) ile sefotaksim (30  $\mu\text{g}$ ) diskleri yerleştirilir. 35°C'de bir gece inkübasyondan sonra, klavulanik asit içeren ve içermeyen disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırılır. Kombinasyon diskleri etrafındaki inhibisyon zonu, klavulanik asit içermeyen

disk etrafındaki inhibisyon zonundan  $\geq 5$  mm daha geniş olan suşlar, GSBL üretimi açısından pozitif olarak kabul edilir (Şekil 2.2.) (74).



**Şekil 2.2.** Kombine disk yöntemi. a: seftazidim (30 µg), b: seftazidim/klavulanik asit (30/10 µg) (74).

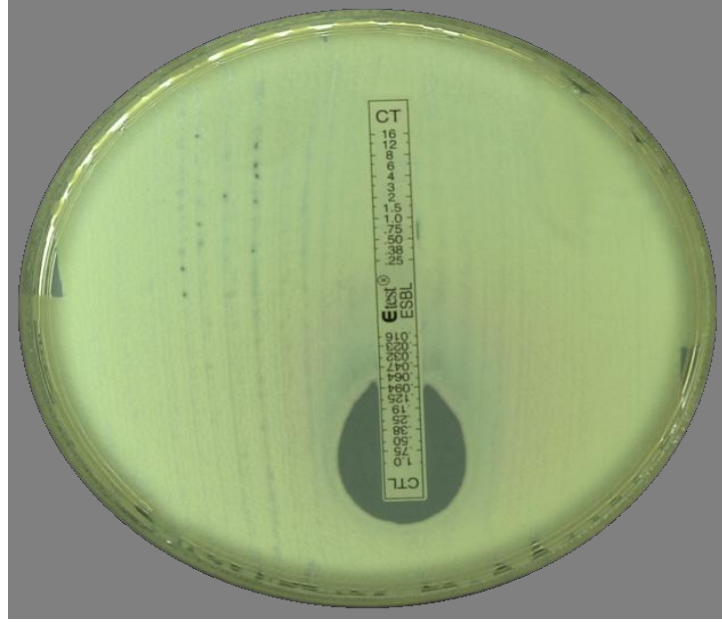
**2-Çift disk sinerji yöntemi:** Jarlier ve ark. (6) tarafından geliştirilen ve GSBL'nin belirlenmesinde en yaygın kullanılan testlerden biridir. McFarland 0,5 bulanıklık standardına eşdeğer olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton besiyerine yayılır. Plağın ortasına bir amoksisilin-klavulanik asit diski (AMC 20/10µg) ile disk merkezleri arasındaki uzaklık 30 mm olacak şekilde seftazidim (CAZ), seftriakson (CRO) veya sefotaksim (CTX), aztreonam (ATM) veya sefpodoksim (POD) diskleri yerleştirilir. 35°C'de 18 saat inkübasyondan sonra test edilen sefalosporin veya aztreonam etrafındaki inhibisyon zonunun AMC diskine doğru genişlemesi veya arada bakterinin üremediği bir sinerji alanının bulunması GSBL varlığını gösterir (Şekil 2.3.) (74).



**Şekil 2.3.** Çift disk sinerji yöntemi. GSBL üreten suşlarda amoksisilin/klavulanik asit diskinin etrafına (20-30 mm) yerleştirilen seftazidim, sefepim, sefoksitin, aztreonam inhibisyon zon çaplarının genişlemesi (GSBL enziminin klavulanik asit varlığında inhibe olmasıyla beta-laktam antibiyotiğin aktivitesinin artması) (74).

**3-E-test yöntemi:** “E-test ESBL” stripleri (AB Biodisk, İsveç), bir ucunda seftazidim (TZ), diğer ucunda seftazidim ve klavulanik asit (TZL) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Disk difüzyon için bildirilen standartlarda hazırlanan plaklarda inkübasyondan sonra, eliptik inhibisyon zonunun stripi kestiği değer MİK değerini vermektedir. TZ ve TZL MİK değerleri birbirine oranlandığında MİK değerinde  $\geq 8$  kat fazla azalma olması GSBL varlığını gösterir. Benzer şekilde sefotaksim ve sefotaksim-klavulanik asit (CT-CTL) içeren E-test stripleri de bulunmaktadır. (Şekil 2.4.)(37).





**Şekil 2.4.** E test ile GSBL tayini (37).

**4-Mikrodilüsyon yöntemi:** Sefotaksim ve seftazidim MİK değerleri, hem tek başına hem de klavulanik asit varlığında saptanır. Klavulanik asit varlığında MİK değerlerinde  $\geq 8$  kat azalma GSBL göstergesi olarak kabul edilir (74).

**5-Üç boyutlu test (M3D):** Bakterilerin kanlı agar besiyerlerindeki bir gecelik taze pasajlarından hazırlanan 0,5 McFarland bulanıklığındaki süspansiyonları Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, Almanya) besiyerine ekilerek 35 °C’de dört saat etüvde inkübe edilir. Bu süre sonunda hücreler santrifüj edilerek ve ardından beş kez dondurulup çözdürülerek enzim ekstraksiyonu yapılır. Standart disk difüzyon testi için Mueller Hinton agara ATCC 25922 *E. coli* suşu inoküle edilerek plağın ortasına sefoksitin (30 µg) diski konulur. Diskten 5 mm uzaklıkta olacak şekilde steril bistüriyle yarıklar açılır ve yarıklara pipet yardımıyla 25-30 µL elde edilen enzimlerden konulur. Petriler 35 °C’lik etüvde bir gece inkübasyona bırakılır. Ertesi gün inhibisyon zonuyla kesişen yarıklardaki suşlardan 3 mm’ye eşit ve 3 mm’den fazla distorsiyona neden olanlar “üç boyutlu test pozitif” olarak kabul edilir (73).

### **Moleküler Tanı Yöntemleri**

Spesifik GSBL tipini belirlemek için moleküler yöntemlere gerek vardır. GSBL'nin ilk belirlendiği dönemlerde izoelektrik noktanın belirlenmesi varolan GSBL'leri göstermek için yeterli idi. Ancak sayıları 90'ın üzerinde olan TEM tipi enzimlerin çoğu özdeş izoelektrik noktasına sahip olduğundan, bu test daha uzun süre yararlı olmamıştır. En sık ve en yaygın kullanılan moleküler yöntem beta-laktamaz genlerine spesifik oligonükleotid öncüllerin kullanıldığı PCR'dır. Bu yöntemle ancak enzimin bağlı olduğu aile saptanabilir, enzim varyantları arasında ayırım yapılamaz (10).

#### **2.3.4. GSBL sentezleyen bakterilerin klinikte neden olduğu sorunlar**

**a-Direnç:** GSBL sentezleyen bakterilerin klinikte neden olduğu sorunların başında bu enzimleri sentezleyen bakterilerin yol açtığı direnç problemi gelmektedir. Bu enzimlerden birini sentezleyen Gram negatif bakteri saptandığında tüm geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama karşı dirençli olarak kabul edilmelidir. Ayrıca bu enzimleri kodlayan plazmidler aynı zamanda birçok beta-laktam dışı antibiyotiğe karşı genetik materyal taşıyabilmektedir (75). Dolayısıyla GSBL pozitif bir bakteride başta aminoglikozidler olmak üzere kinolon, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim-sülfametoksazol direnci de eş zamanlı olarak bulunabilir (76).

**b-Hastaların kolonizasyonu:** Hastanede yatan hastalarda GSBL sentezleyen bakterilerle kolonizasyonu arttıran çeşitli risk faktörleri tanımlanmıştır. Bunlar arasında uzun süreli antibiyotik kullanımı, uzun süre yoğun bakımda yatma, altta yatan ciddi ve ağır hastalık varlığı, invaziv işleme maruz kalma sayılabilir.

**c-Laboratuvarda GSBL Saptanmasında Karşılaşılan Sorunlar:** GSBL sentezleyen bir bakteri, sentezlediği enzimin farklı sefalosporinlere afinitesinin değişik olması ve inokulum etkisi gibi nedenlerle üçüncü kuşak sefalosporinlere duyarlı gibi görünebilir. Örneğin TEM-26 gibi bir GSBL taşıyan suşu in vitro seftazidime dirençli (MİK > 257 µg/mL), sefotaksime ise duyarlı (MİK 0.5µg/mL) olabilir. Bunun nedeni TEM-26'nın düşük

yoğunluklarda bile seftazidime yüksek afinite göstermesi, buna karşın sefotaksime hidrolitik aktivitesinin ancak infeksiyon ortamında olduğu üzere bakteri yoğunluğunun arttığı durumlarda ortaya çıkmasıdır. İnokulum etkisi adı verilen bu etki, bakteri yoğunluğunun arttığı durumlarda GSBL'ların in vitro koşullarda kullanılan yoğunluklarda hidrolize edemediği beta-laktamları inaktive etmesi şeklinde açıklanmaktadır.

### 2.3.5. GSBL üreten bakterilerde tedavi seçenekleri

**a-Beta-laktam / beta-laktamaz inhibitörleri:** GSBL'lar genellikle klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam ile inhibe olurlar. Bunların içinde GSBL'ye en etki olanı tazobaktamdır. İn vivo ve in vitro yapılan çalışmalarda beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörlerinin GSBL pozitif mikroorganizmalara karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak mikroorganizmalarda yüksek oranda beta-laktamaz yapımı, özellikle inhibitör dirençli beta-laktamaz (IRT)'ların varlığı veya porin defekti olması gibi durumlarda bu antibiyotikler etkisiz kalabilirler. Beta-laktamaz inhibitörleri indüklenebilir AmpC beta-laktamazlarına etkili değildir. Ayrıca klavulanik asit beta-laktamaz indüksiyonuna neden olabilir. Bu durum *Pseudomonas sp.* infeksiyonlarında tikarsilin-klavulanik asit ile tedavi sırasında başarısızlığa neden olabilir. Ciddi sistemik infeksiyonlarda beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörlerinin aminoglikozidlerle birlikte kullanımının tedavi başarısını arttırabileceği bildirilse de bu infeksiyonlarda tedavi seçeneği karbapenemlerdir (56).

**b-Aminoglikozidler:** Aminoglikozidler GSBL pozitif mikroorganizmalarla oluşan infeksiyonların tedavisinde kullanılabilirler. Ancak GSBL taşıyan plazmidlerin aminoglikozid direnç genlerini de taşıyabilmesi olası olduğundan aminoglikozidler duyarlılık testleri sonucuna göre kullanılmalıdır. GSBL pozitif suşlar sıklıkla aminoglikozidlere de dirençlidir (56,77).

**c-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 (78). GSBL pozitif suşlarda %10-40 arasında değişen kinolon direncinin görülmesi, kinolonların kullanımını kısıtlamaktadır (56,77).

**d-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 yoktur (56).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Bakteri suşları:

Nisan 2004-Mart 2005 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Birimi'nde; idrar kültürlerinden izole edilen 1198 *E. coli* suşunun 217'sinde Phoenix 100 otomatize bakteri tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile GSBL pozitifliği saptanmıştır. Bu suşlar arasından yatan hastalara ait, her hastadan tek izolat olacak şekilde seçilen ve fenotipik tarama ve doğrulama testleri ile GSBL ürettiği doğrulanan 56 *E. coli* suşu çalışmaya alınmıştır. Suşların saf kültür halindeki pasajları daha sonraki çalışmalar için boncuklu stok tüplerinde stoklanarak -20 °C'de saklanmıştır.

##### 3.1.2. Ayraçlar

###### 1- EDTA (ethylenediaminetetraacetate) (Sigma E5134)

	<u>0.5 M</u>	<u>0.2 M</u>
Na <sub>2</sub> EDTA	18.6 g	7.44 g
Distile H <sub>2</sub> O	100 mL	100 mL

EDTA pH 8.0'da erir. 1-2 g NaOH pelleti ile istenen pH elde edilerek otoklavlanmıştır.

###### 2- TBE (10X)

Tris base (Sigma T6066)	108 g
Boric acid (Sigma B6768)	55 g
0.5 M EDTA	40 mL
Distile su	1000 mL' ye tamamlanmıştır.

Oda ısısında 1 ay stabildir.

###### 3- Agaroz (Sigma A5093)

###### 4- Etidium bromide (Amresco 0492-Q)

###### 5- Jel yükleme tamponu (Sigma G2526)

###### 6- dNTP karışımı (100 mM her biri) (Bioron 110011)

(2,5 mM / herbiri, toplam 10 mM)

dATP (100 mM)	25 µL
dCTP (100 mM)	25 µL
dGTP (100 mM)	25 µL
dTTP (100 mM)	25 µL
Distile su	900 µL

-20 °C’de saklanmıştır.

#### **7- Marker’lar:**

GeneRuler 50 bp DNA Ladder Plus, (Fermentas SM0371)

IEF Standart 4.45-9.6 (Biorad 161-0310)

#### **8- Super Taq DNA Polimeraz (Bioron)**

##### **İçeriği:**

10X PCR buffer

25 mM MgCl<sub>2</sub>

#### **9- Fosfat tamponu 0,1 M pH 7.0**

**A-** 0,2 M sodyum fosfat, mono-sodyum tuzu

13,8 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O (MW=138) distile suda çözülüp, 500 mL’ye tamamlanmıştır.

**B-** 0,2 M sodyum fosfat, di-sodyum tuzu

26,81 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7 H<sub>2</sub>O (MW=268,1) distile suda çözülüp, 500 mL’ye tamamlanmıştır.

A (39 mL) + B (61 mL) + distile su (100 mL) şeklinde karıştırılmıştır.

#### **10- Nitrosefin (Oxoid SR112C), 1 mg**

Kendi çözücüsü içinde (Fosfat tamponu + DMSO) sulandırılmıştır (500 µg/mL).

#### **11- Poliakrilamid jel**

- Monomer konsantrat (T= % 25, C= %3)

Acrylamide (Sigma A 8887) 30 g

Bis (N,N’-Methylene-bis-acrylamide) (Sigma M 7256) 0.8 g

Distile su içerisinde çözdürülerek final volüm distile su ile 100 mL’ye tamamlandıktan sonra solüsyon 0.45 µm’lik filtreden geçirilmiştir. Işıktan

korumak için balon jopenin etrafı alimünyum folyo ile kaplanarak +4 °C’de saklanmıştır (1 ay stabildir).

- TEMED (N, N’-Tetramethylene-ethylenediamine) (Sigma 87689):%5 lik solüsyonu hazırlanmıştır. ( TEMED 500 µL + Distile su 9.5 mL)

- %40 Ampholyte (Bio-lyte 3/10) (Biorad 163-1112)

- % 10 (w/v) Ammonium persulfate (Merck 1.01201.0100)

0.1 g ammonium persulfate 1 mL distile suda çözdürülür. Solüsyon kullanımından hemen önce günlük olarak hazırlanmıştır.

- %87 gliserol (w/v)

87 g gliserole distile su eklenerek 100 mL’ye tamamlanmıştır.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Antimikrobiyal duyarlılık testi**

Laboratuvara gönderilen idrar örneklerinden izole edilen ve Phoenix 100 otomatize bakteri tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile GSBL pozitif olarak saptanan suşların, ampisilin (AMP), amoksisilin-klavulanat (AMC), piperasilin-tazobaktam (TZP), meropenem (MP), sefoksitin (FOX), aztreonam (AZT), levofloksasin (LEV), siprofloksasin (CIP), gentamisin (GN), amikasin (AK), trimetoprim-sulfametaksazol (TMP-SXT) duyarlılıkları incelenmiştir.

### **3.2.2. Kombine disk yöntemi**

Çalışmaya alınan suşlara kombine disk yöntemi uygulanmıştır. Kombine disk yönteminde GSBL’ların beta laktamaz inhibitörlerine duyarlı olma özelliğinden faydalanılmaktadır.

0.5 McFarland yoğunluğundaki bakteri süspansiyonunun yayıldığı Mueller Hinton agara kombine disk yöntemi için, klavulanik asit (10 µg) içeren ve içermeyen seftazidim (30 µg) ile sefotaksim (30 µg) diskleri yerleştirilmiştir. 35°C’de bir gece inkübasyondan sonra, klavulanik asit içeren ve içermeyen disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırılmıştır. Kombinasyon diskleri etrafındaki inhibisyon zonu, klavulanik asit içermeyen disk etrafındaki

inhibisyon zonundan  $\geq 5$  mm daha geniş olan suşlar, GSBL üretimi açısından pozitif olarak kabul edilmiştir (11).

### **3.2.3. E-test yöntemi**

0.5 McFarland yoğunluğundaki bakteri süspansiyonunun yayıldığı Mueller Hinton agara E-test yöntemi için; sefotaksim (CT), sefotaksim-klavulanik asit (CT-CTL) ve seftazidim (TZ), seftazidim-klavulanik asit (TZL) içeren “E-test ESBL” stripleri (AB Biodisk, İsveç) konulmuştur. Hazırlanan plaklarda bir gecelik inkübasyondan sonra, eliptik inhibisyon zonunun stripi kestiği değer MİK değeri olarak alınmıştır. TZ-TZL ve CT-CTL MİK değerleri birbirine oranlandığında MİK değerinde  $\geq 8$  kat fazla azalma olması durumunda GSBL üretimi pozitif olarak kabul edilmiştir.

### **3.2.4. İzoelektrik odaklama (Isoelectric Focusing; IEF) yöntemi**

İzoelektrik odaklama, proteinlerin ayırımında yaygın olarak kullanılan, sabitlenmiş bir pH gradientinde gerçekleşen elektroforez olarak tanımlanan bir yöntemdir. Proteinler sahip oldukları yüke göre anod veya katoda göç ederler, net yükleri sıfır olduğunda ise sabit kalarak yoğunlaşırlar ve bant oluştururlar. Sabit kaldıkları nokta “izoelektrik nokta” (pI) veya “izoelektrik pH” olarak tanımlanır. Bu yöntem GSBL enzim tiplerinin izoelektrik noktalarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

#### **3.2.4.1. Beta laktamaz eldesi**

Çalışmamızda; beta laktamazların izoelektrik noktalarını belirlemek amacıyla yarı otomatize bir elektroforez sistemi olan "Model 111 Mini IEF Cell" cihazı (Biorad, Hercules, Kaliforniya, ABD) kullanılmıştır. Beta laktamaz eldesi için suşlara sonikasyon uygulanmıştır. Bunun için suşlar 10 mL TSB içerisinde 4 saat 37 °C’de inkübe edildikten sonra 5000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra 1 mL distile su eklenmiş ve 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan itibaren suşlar buz içerisinde tutulmuştur. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve üzerine 1 mL 100 mM (pH 7.0)



fosfat tampon eklenmiştir. Buz üzerinde sonikatör (Bandelin Sonopuls, Berlin) probu tüp içine daldırılarak 70 V'da 15'er saniyelik 4 vuru işlemi ile bakteri hücre duvarı parçalanmıştır. Elde edilen sonikat, +4 °C'de 13.000 rpm'de 10 dakika çevrilmiş, beta laktamazları içeren üst sıvı toplanmış ve -20 °C'de saklanmıştır.

Sonik ekstrede beta laktamaz varlığı nitrosefin yöntemi ile saptanmıştır. 30 µL sonik ekstre, 100 µL nitrosefin çözeltisi (1/10 sulandırılmış) ile karıştırılmış, enzimin nitrosefinde bulunan beta laktam halkasındaki amid bağı parçalamasıyla rengin sarıdan kırmızıya dönüşmesi olumlu olarak değerlendirilmiştir. Renk değişimi olmayan ve renk değişim süresi 5 dakikayı aşan örnekler için sonikasyon işlemi tekrarlanmıştır. Ayrıca her enzim için renk değişim süreleri kaydedilmiş, izoelektrik odaklama yönteminde aynı sürelerle sahip örnekler bir arada incelenmiştir.

#### 3.2.4.2. Poliakrilamid jel hazırlama

125 x 65 x 0.4 mm boyutlarında iki adet poliakrilamid jel hazırlamak için monomer-ampholyte solüsyonu ve kataliz solüsyonları 50 mL'lik falcon tüp içerisinde karıştırılır.

Distile su	9.5 mL	Monomer-ampholyte solüsyonu
Monomer konsantrat	4.3 mL	
%87 gliserol	2 mL	
%40 ampholyte	1 mL	
%10 ammonium persulfate	425 µL	Kataliz solüsyonu
%5 TEMED	250 µL	

Jel destekleyici filmin hidrofobik yüzeyi bir miktar distile su yardımı ile cam plağa yapıştırılarak jel dökme aparatı üzerine yerleştirilmiştir. Daha önceden hazırlanan poliakrilamid jel, jel destekleyici filmin hidrofilik yüzeyi ile jel dökme aparatı arasına pastör pipeti yardımıyla yayılarak floresan ışık altında yaklaşık bir saat kurumaya bırakılmıştır. Jel, ince bir spatula yardımıyla jel dökme aparatından, destekleyici film ve cam plak ile birlikte kaldırılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

### 3.2.4.3. Elektroforez

Jel üzerine yerleştirilen aplikatör striplere her birinden 0.5'er µL olacak şekilde örnekler ve IEF standardı konularak birkaç dakika beklenmiş, jele zarar vermeden aplikatör strip kaldırılmış ve ardından jel Model 111 Mini IEF Cell cihazına yerleştirilerek, 100 V'da 5 mA'de 0.5 W'da 15 dakika, 200 V'da 5 mA'de 1 W'da 15 dakika, 450 V'da 4 mA'de 1.8 W'da 60 dakika olmak üzere toplam 90 dakika beta laktamaz içeren ürünler yürütülmüştür. Bu süre sonunda 0.1 M fosfat buffer içerisine 0.5 mM nitrosefin çözeltisi (500 µg/mL) eklenip jel üzerine yayılarak enzim bantları görünür hale getirilmiştir. Enzimlerin izoelektrik noktaları protein marker IEF Standart 4.45-9.6 ve referans enzimler (TEM-1:5.4, SHV-1:7.6) ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta pI değeri 8.0-8.4 olan enzimler CTX-M, 5.0-5.4 olan TEM, 7.4-7.6 olan SHV enzimi olarak değerlendirilmiştir.

### 3.2.5. PCR ile TEM, SHV, CTX-M ve PER Beta-Laktamaz Genlerinin Saptanması

**Çizelge 3.1.** PCR'da kullanılan Öncül setleri

	Öncül	Polarite	Dizi	Ürün Uzunluğu
TEM	TEM-F	sense	5'-gagtattcaacatttccgtgc-3'	850 bp
	TEM-R	antisense	5'-taatcagtgaggcacctatctc-3'	
SHV	SHV-F	sense	5'-cgccgggttattcttatttgcgc-3'	1016 bp
	SHV-R	antisense	5'-tctttccgatgccgcccagtc-3'	
CTX-M	CTX-F	sense	5'-cgctttgcgatgtgcag-3'	920 bp
	CTX-R	antisense	5'-acggcgatatcgttggt-3'	
PER-1	PER-1F	sense	5'-atgaatgcattataaaagc-3'	924 bp
	PER-1R	antisense	5'-aattgggcttagggcagaa-3'	

## TEM PCR

### Reaksiyon karışımı:

• Steril distile su	32,3 µL
• 10X Taq buffer	5 µL
• 25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 µL (1,5 mM/final)
• dNTP (2,5 mM/her biri)	1,5 µL (100 µM/final)
• *Öncül F (50 pmol/µL)	1,5 µL
• *Öncül R (50 pmol/µL)	1,5 µL
• Taq polimeraz (5U/µL)	0,2 µL (1,25 U/final)
• Ekstraksiyon ürünü	5 µL

Isı döngü programı: Ependorf tüpler ısı döngü cihazına (Perkin Elmer GenAmp 9600, Roche, Almanya) yerleştirilerek aşağıdaki sıcaklıklarda 35 döngü gerçekleştirilmiştir;

95 °C'de 10 dakika	}	35 döngü
95 °C'de 45 saniye		
53 °C'de 45 saniye		
72 °C'de 1 dakika		
72 °C'de 7 dakika		
15 °C ∞		

## SHV PCR

### Reaksiyon karışımı:

• Steril distile su	33,35 µL
• 10X Taq buffer	5 µL
• 25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 µL (1,5 mM/final)
• dNTP (2,5 mM/her biri)	1 µL (100 µM/final)
• *Öncül F (25 pmol/µL)	1,2 µL

- \*Öncül R (25 pmol/μL) 1,2 μL
- Taq polimeraz (5U/μL) 0,25 μL (1,25 U/final)
- Ekstraksiyon ürünü 5 μL

Isı döngü programı: Ependorf tüpler ısı döngü cihazına (Perkin Elmer GenAmp 9600, Roche, Almanya) yerleştirilerek aşağıdaki sıcaklıklarda 35 döngü gerçekleştirilmiştir;

95 °C'de 10 dakika	} 30 döngü
94 °C'de 50 saniye	
60 °C'de 40 saniye	
72 °C'de 1 dakika	
72 °C'de 10 dakika	
4 °C 'de ∞	

### CTX-M PCR

#### Reaksiyon karışımı:

- Steril distile su 33 μL
- 10X Taq buffer 5 μL
- 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2,5 μL (1,5 mM/final)
- dNTP (2,5 mM/her biri) 2 μL (100 μM/final)
- \*Öncül F (25 pmol/μL) 1 μL
- \*Öncül R (25 pmol/μL) 1 μL
- Taq polimeraz (5U/μL) 0,5 μL (1,25 U/final)
- Ekstraksiyon ürünü 5 μL

Isı döngü programı: Ependorf tüpler ısı döngü cihazına (Perkin Elmer GenAmp 9600, Roche, Almanya) yerleştirilerek aşağıdaki sıcaklıklarda 35 döngü gerçekleştirilmiştir;

95 °C’de 12 dakika  
94 °C’de 1 dakika  
50 °C’de 1 dakika  
70 °C’de 2 dakika  
72 °C’de 10 dakika  
4 °C’de ∞

} 30 döngü

### PER-1 PCR

#### Reaksiyon karışımı:

• Steril distile su	32,2 µL
• 10X Taq buffer	5 µL
• 25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 µL (1,5 mM/final)
• dNTP (2,5 mM/her biri)	3 µL (100 µM/final)
• *Öncül F (25 pmol/µL)	1 µL
• *Öncül R (25 pmol/µL)	1 µL
• Taq polimeraz (5U/µL)	0,3 µL(1,25 U/final)
• Ekstraksiyon ürünü	5 µL

Isı döngü programı: Ependorf tüpler ısı döngü cihazına (Perkin Elmer GenAmp 9600, Roche, Almanya) yerleştirilerek aşağıdaki sıcaklıklarda 35 döngü gerçekleştirilmiştir.

95 °C’de 5 dakika  
90 °C’de 1 dakika  
53,5 °C’de 1 dakika  
72 °C’de 2 dakika  
72 °C’de 5 dakika  
4 °C ‘de ∞

} 30 döngü

### 3- Elektroforez:

Sonuçların değerlendirilmesi amacı ile, 1X TBE içinde % 1,5’luk agaroz jel hazırlanarak ve mikrodalga fırında eritildi. 50 mL eriyik içine 5 mg/mL etidyum bromid çözeltisinden 5 µL eklendi ve jel kasetine döküldü, taraklar

yerleştirilerek donmaya bırakıldı. PCR ürünleri jel yükleme bufferı ile 1/6 oranında (2 µL jel yükleme buffer + 10 µL çoğaltılmış ürün) karıştırılarak her bir kuyuya 12 µL, bir kuyuya da GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus marker olacak şekilde jele aktarıldı. Jel 1X TBE içinde 80 V uygulanarak 60-90 dakika yürütüldü. Sonuçlar ultraviyole transilüminatörde 280-340 nm dalga boyunda incelendi. Bant büyüklükleri marker ile karşılaştırıldı ve Çizelge 3.1’de belirtilen ürün uzunlukları ile uyumlu bant büyüklükleri olumlu olarak değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Antimikrobiyal duyarlılık sonuçları

Çalışmaya alınan 56 *E. coli* suşunun antibiyotiklere duyarlılık sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Test edilen antibiyotiklere duyarlılık oranları, sırasıyla Siprofloksasin %19 (11/56), TMP-SXT %33 (19/56), gentamisin %48 (27/56), piperasilin/tazobaktam %48 (27/56), sefoksitin %82 (46/56) olarak bulunmuştur. Suşların tümü ampisiline dirençli iken, amoksisilin klavulanik aside %57’si dirençli, %43’ü ise az duyarlı olarak saptanmıştır. Çalışmamızda amikasin (%100) ve meropenem (%100) GSBL pozitif *E. coli* suşlarında en duyarlı antimikrobiyaller olarak saptanmıştır.

### 4.2. İzoelektrik odaklama

Suşların izoelektrik odaklama yöntemi ile pI değerleri incelendiğinde; en sık olarak pI değeri 8.0-8.4 (%78.5- CTX-M ile uyumlu) olan bandın gözleendiği bunu sırası ile pI değeri 5.0-5.4 (%50-TEM ile uyumlu) ve 7.4-7.6 (%7.1- SHV ile uyumlu) olan bantların izlediği görülmüştür. Sonikatların 17’sinde (%30.4) tek bant; 25’sinde (%44.6) çift bant; 3’ünde (%5.3) üç bant gözlenirken 11’inde (%19.6) herhangi bir bant oluşumu gözlenmemiştir.

Suşların 24’ünde (%42.8) CTX-M ve TEM ile uyumlu bantlar; 16’sında (%28.6) yalnız CTX-M uyumlu bantlar; 3’ünde (%3.6) CTX-M, TEM ve SHV ile uyumlu bantlar bir arada; 1’inde (%1.8) yalnız TEM ile uyumlu bant; 1’inde (%1.8) CTX-M ve SHV uyumlu bantlar bir arada izlenirken 11 suşta (%19.6) herhangi bir bant oluşumu gözlenmemiştir.

Suşların izoelektrik odaklama sonuçları Çizelge 4.2’de; bazı enzim bantlarının görünümü ise Şekil 4.1’de verilmiştir.

**Çizelge 4.1. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları**

Stok no	AK	AMC	AMP	CTX	FOX	CIP	GN	LEV	MP	TZP	TMP-SXT
6700	S	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S
7141	S	I	R	R	R	R	S	R	S	S	R
5447	S	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R
7379	S	I	R	R	R	R	S	R	S	S	R
5638	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
7502	S	R	R	R	S	R	S	R	S	I	R
7529	S	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S
6048	S	I	R	R	R	R	S	R	S	S	R
5713	S	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S
5478	S	I	R	R	S	R	R	R	S	S	R
7032	S	I	R	R	S	S	S	S	S	S	R
7531	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R
5715	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R
5450	S	I	R	R	S	R	R	R	S	S	R
5382	S	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R
6447	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R
6697	S	I	R	R	S	S	S	S	S	S	R
5471	S	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R
7367	S	R	R	R	S	R	R	R	S	I	R
5689	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R
7089	S	I	R	R	S	R	S	R	S	S	S
5158	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
5813	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
5398	S	I	R	R	S	S	S	S	S	S	R
6628	S	I	R	R	S	R	R	R	S	S	R
7292	S	R	R	R	I	R	R	R	S	I	R
6497	S	I	R	R	S	R	S	S	S	S	S
6224	S	I	R	R	S	R	S	R	S	R	R



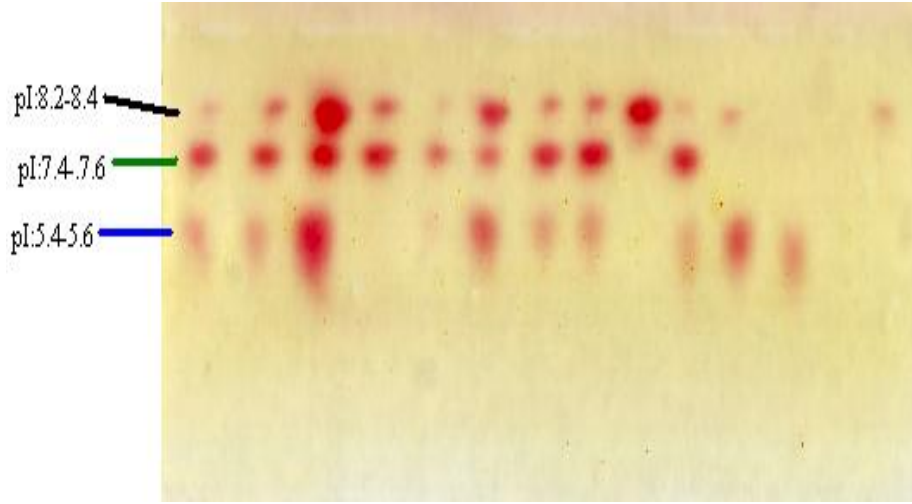
**Çizelge 4.1'in devamı**

Stok no	AK	AMC	AMP	CTX	FOX	CIP	GN	LEV	MP	TZP	TMP-SXT
6047	S	I	R	R	R	R	S	R	S	I	R
5441	S	I	R	R	R	R	S	R	S	I	R
5701	S	R	R	R	S	R	S	R	S	I	S
7216	S	R	R	R	S	R	R	R	S	I	S
5699	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S
6226	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S
7242	S	R	R	R	S	R	R	R	S	I	S
5299	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
7077	S	R	R	R	S	R	S	R	S	I	S
6840	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R
7344	S	I	R	R	S	R	R	R	S	I	S
5988	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R
5548	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R
7141	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R
7256	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R
7533	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R
6697	S	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S
5946	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R
7411	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R
5440	S	I	R	R	S	R	R	R	S	S	S
7103	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R
6981	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R
7535	S	I	R	R	S	R	R	R	S	I	R
5987	S	I	R	R	S	R	R	R	S	R	R
5999	S	I	R	R	S	R	S	R	S	I	S
7529	S	I	R	R	S	R	R	R	S	S	R
5888	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R
5481	S	I	R	R	S	R	R	R	S	I	S

**R:dirençli, S:duyarlı, I:az duyarlı**

**Çizelge 4.2 İzolatların izoelektrik odaklama sonuçları**

<b>Stok no</b>	<b>pI değeri</b>	<b>Stok no</b>	<b>pI değeri</b>
6700	8.2, 5.4	6047	8.2, 5.4
7141	8.2	5441	8.2, 5.4
5447	8.2, 5.4	5701	8.2, 7.6
7379	8.2	7216	8.2, 5.4
5638	8.2	5699	8.2, 5.4
7502	8.2	6226	8.2, 5.4
7529	8.2, 5.4	7242	8.2, 5.4
6048	8.2	5299	8.2, 5.4
5713	8.2, 5.4	7077	8.2, 5.4
5478	8.2, 5.4	6840	8.2, 5.4
7032	8.2, 5.4	7344	8.2, 5.4
7531	8.2, 5.4, 7.6	5988	8.2, 5.4
5715	8.2, 5.4	5548	8.2, 5.4
5450	8.2	7141	8.2, 5.4
5382	8.2	7256	8.2, 5.4, 7.6
6447	8.2	7533	8.2, 5.4, 7.6
6697	8.2, 5.4	6697	ief negatif
5471	8.2, 5.4	5946	ief negatif
7367	8.2	7411	ief negatif
5689	8.2	5440	ief negatif
7089	8.2	7103	ief negatif
5158	8.2	6981	ief negatif
5813	8.2	7535	ief negatif
5398	8.2	5987	ief negatif
6628	8.2, 5.4	5999	ief negatif
7292	8.2, 5.4	7529	ief negatif
6497	8.2	5888	ief negatif
6224	8.2	5481	5.4



Şekil 4.1. IEF sonrası beta-laktamaz bandları

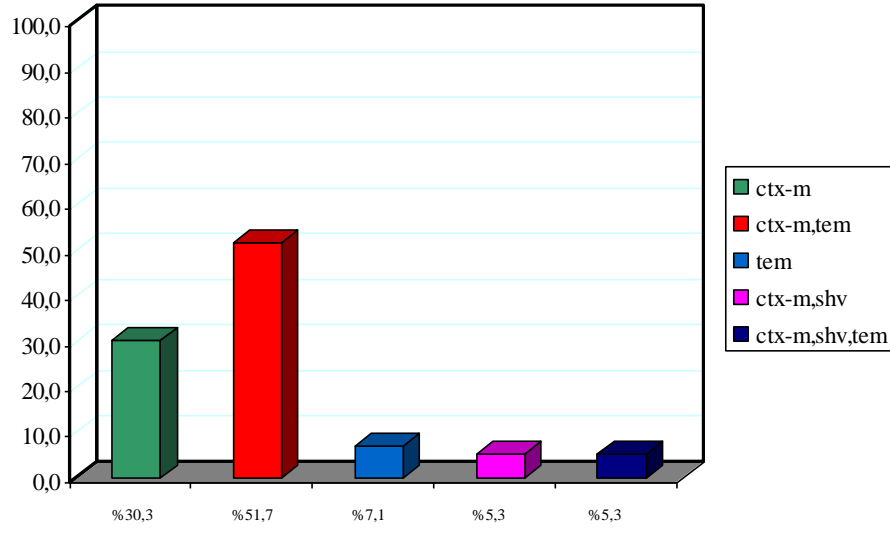
### 4.3. PCR sonuçları

Çalışmaya alınan 56 *E. coli* suşu CTX-M, TEM, SHV ve PER-1 genleri açısından incelenmiştir. CTX-M, TEM, SHV ve PER-1 varlığı bilinen 4 örnek (+) kontrol olarak kullanılmıştır. PCR sonuçlarına göre, 56 suşun 52'sinde (%92.8) CTX-M; 36'sında (%64.2) TEM; 6'sında (%10.7) SHV enzimi pozitif olarak saptanmıştır. Örneklerin 17'sinde (%30.3) tek başına CTX-M, 29'unda (%51.7) CTX-M ve TEM; 4'ünde (%7.1) tek başına TEM, 3'ünde (%5.3) CTX-M ve SHV; 3'ünde (%5.3) CTX-M, TEM ve SHV genleri bir arada saptanmıştır. Suşların hiçbirinde PER enzimi saptanmamıştır.

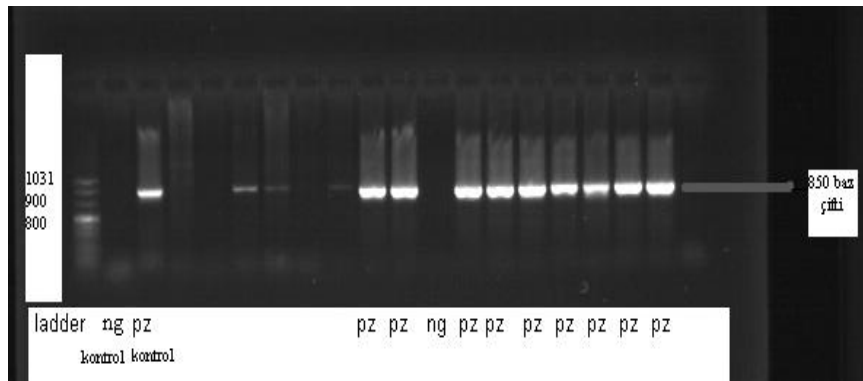
TEM, SHV, CTX-M ve PER PCR sonuçları Çizelge 4.3'de ve Şekil 4.2'de, PCR ürünlerinin bant görünüşleri Resim 4.3, 4.4 ve 4.5'te gösterilmiştir.

**Çizelge 4.3: İzolatların PCR test sonuçları**

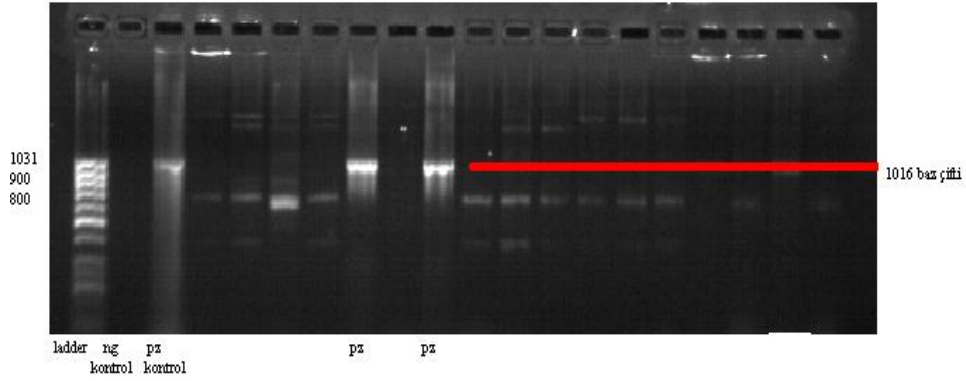
Stok no	ctx-m pcr	tem pcr	Shv pcr	Per pcr	Stok no	ctx-m pcr	tem pcr	Shv pcr	per pcr
6700	+	+	-	-	6047	+	+	-	-
7141	+	-	-	-	5441	+	+	-	-
5447	+	+	-	-	5701	+	-	+	-
7379	+	-	-	-	7216	+	+	-	-
5638	+	-	-	-	5699	+	+	-	-
7502	+	-	-	-	6226	+	+	-	-
7529	+	+	-	-	7242	+	+	-	-
6048	+	-	-	-	5299	+	+	-	-
5713	+	+	-	-	7077	+	+	-	-
5478	+	+	-	-	6840	+	+	-	-
7032	+	+	-	-	7344	+	+	-	-
7531	+	+	+	-	5988	+	+	-	-
5715	+	+	-	-	5548	+	+	-	-
5450	+	-	-	-	7141	+	+	-	-
5382	+	-	-	-	7256	+	+	+	-
6447	+	-	-	-	7533	+	+	+	-
6697	+	+	-	-	6697	-	+	-	-
5471	+	+	-	-	5946	-	+	-	-
7367	+	-	-	-	7411	-	+	-	-
5689	+	-	-	-	5440	+	+	-	-
7089	+	-	+	-	7103	+	-	-	-
5158	+	-	-	-	6981	+	+	-	-
5813	+	-	-	-	7535	+	+	-	-
5398	+	-	-	-	5987	+	-	-	-
6628	+	+	-	-	5999	+	+	-	-
7292	+	+	-	-	7529	+	-	-	-
6497	+	-	+	-	5888	+	+	-	-
6224	+	-	-	-	5481	-	+	-	-



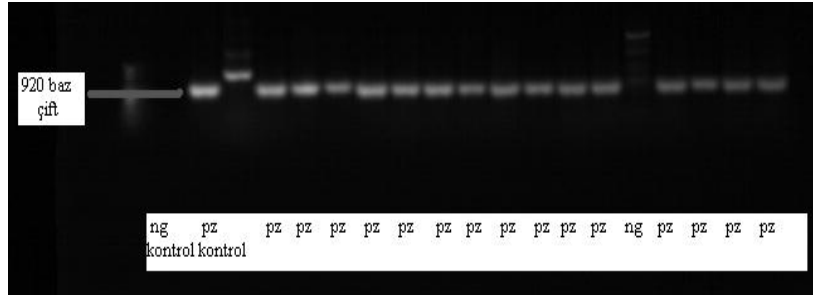
**Şekil 4.2.** PCR sonuçlarına göre çalışmaya alınan *E. coli* suşlarında GSKL enzimlerinin dağılımı



**Şekil 4.3.** TEM PCR bant görünüşleri



Şekil 4.4. SHV PCR bant görünümleri



Şekil 4.5. CTX-M PCR bant görünümleri

#### 4.4. PCR ve izoelektrik odaklama yönteminin uyumu

Çalışmaya alınan 56 *E. coli* suşundan izoelektrik odaklama yönteminde, CTX-M, TEM ve SHV enzimleri ile uyumlu bant oluşumu gözlenen 43 ve bant oluşumu gözlenmeyen 11 suşta PCR yöntemi ile bu enzim genlerinin bir veya birden fazlası pozitif olarak bulunmuştur. IEF'de CTX-M ile uyumlu bant gözlenen 44 suşun tümü CTX-M PCR pozitif olarak bulunmuştur. IEF'de TEM ile uyumlu bant gözlenen 28 suşun tümünde TEM PCR pozitif olarak bulunmuştur. IEF yönteminde SHV ile uyumlu bant gözlenen 4 suşun tamamında SHV PCR pozitif iken SHV PCR'ı pozitif olan iki suşta IEF yöntemi ile CTX-M enzimi ile uyumlu bant görülmüştür. CTX-M, TEM ve SHV enzim varlığını saptamada IEF ve PCR yöntemlerinin uyumu sırası ile %84,6, %77,8 ve %66,6 olarak bulunmuştur. IEF yönteminde bant gözlenmeyen 11 suşun PCR yöntemi ile 5'inde CTX-M ve TEM enzimleri,

3'ünde CTX-M enzimi, 3'ünde TEM enzimi pozitif olarak saptanmıştır. Suşlarda IEF ve PCR yöntemleri ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

**Çizelge 4.4** İzolatların PCR ve izoelektrik odaklama yöntemi sonuçları

Stok no	ctx-m per	tem per	Shv per	Per per	pI değeri	Stok no	ctx-m per	tem per	Shv per	per per	pI değeri
6700	+	+	-	-	8.2, 5.4	6047	+	+	-	-	8.2, 5.4
7141	+	-	-	-	8.2	5441	+	+	-	-	8.2, 5.4
5447	+	+	-	-	8.2, 5.4	5701	+	-	+	-	8.2, 7.6
7379	+	-	-	-	8.2	7216	+	+	-	-	8.2, 5.4
5638	+	-	-	-	8.2	5699	+	+	-	-	8.2, 5.4
7502	+	-	-	-	8.2	6226	+	+	-	-	8.2, 5.4
7529	+	+	-	-	8.2, 5.4	7242	+	+	-	-	8.2, 5.4
6048	+	-	-	-	8.2	5299	+	+	-	-	8.2, 5.4
5713	+	+	-	-	8.2, 5.4	7077	+	+	-	-	8.2, 5.4
5478	+	+	-	-	8.2, 5.4	6840	+	+	-	-	8.2, 5.4
7032	+	+	-	-	8.2, 5.4	7344	+	+	-	-	8.2, 5.4
7531	+	+	+	-	8.2, 5.4, 7.6	5988	+	+	-	-	8.2, 5.4
5715	+	+	-	-	8.2, 5.4	5548	+	+	-	-	8.2, 5.4
5450	+	-	-	-	8.2	7141	+	+	-	-	8.2, 5.4
5382	+	-	-	-	8.2	7256	+	+	+	-	8.2, 5.4, 7.6
6447	+	-	-	-	8.2	7533	+	+	+	-	8.2, 5.4, 7.6
6697	+	+	-	-	8.2, 5.4	6697	-	+	-	-	ief negatif
5471	+	+	-	-	8.2, 5.4	5946	-	+	-	-	ief negatif
7367	+	-	-	-	8.2	7411	-	+	-	-	ief negatif
5689	+	-	-	-	8.2	5440	+	+	-	-	ief negatif
7089	+	-	+	-	8.2	7103	+	-	-	-	ief negatif
5158	+	-	-	-	8.2	6981	+	+	-	-	ief negatif
5813	+	-	-	-	8.2	7535	+	+	-	-	ief negatif
5398	+	-	-	-	8.2	5987	+	-	-	-	ief negatif
6628	+	+	-	-	8.2, 5.4	5999	+	+	-	-	ief negatif
7292	+	+	-	-	8.2, 5.4	7529	+	-	-	-	ief negatif
6497	+	-	+	-	8.2	5888	+	+	-	-	ief negatif
6224	+	-	-	-	8.2	5481	-	+	-	-	5.4

## 5. TARTIŞMA

Geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotikler bakterisid etkili olmaları ve yan etkilerinin az olması nedeniyle sık kullanılan antibiyotiklerdir. Ancak bu ilaçların klinikteki kullanımını arttıkça bu antibiyotiklere karşı özellikle beta-laktamazlara bağlı direnç de artmaya başlamıştır. Özellikle oksiminobeta laktam ajanların kullanıma girmesinden sonra ilk defa 1983'de Almanya'da bir *Klebsiella pneumoniae* suşunun ürettiği SHV-2 enziminin saptanması ile ortaya çıkan ve daha sonra dünyanın çeşitli bölgelerinde *Enterobacteriaceae* ailesi üyesi mikroorganizmalar tarafından üretilen bu enzimler geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere direnç göstermeleri sebebiyle GSBL olarak tanımlanmıştır (48,67,79,80,81).

GSBL oluşturan suşlarla hastane infeksiyonu epidemileri oluşabilmekte ve bu suşlar genellikle çoklu ilaç direncine sahip olduklarından tedavide sorunlar yaşanabilmektedir (82).

Bakterilerdeki GSBL varlığı, beta-laktamazların aşırı üretimi, birkaç enzimin birlikteliği veya enzime bağlı dirence diğer direnç mekanizmalarının eşlik etmesi gibi nedenlerden rutin antibiyotik duyarlılık testleri ile her zaman doğru olarak saptanamamaktadır (83). Bunun yanı sıra GSBL üreten bakteriler sefotaksim, seftriakson gibi geniş spektrumlu beta laktam antibiyotiklere in vitro olarak duyarlı bulunabilmektedirler (84,85). Bu nedenle beta laktamaz enzim tiplerinin doğru olarak belirlenmesi gerekmektedir.

İzoelektrik odaklama yöntemi ile enzim tiplerinin özgül izoelektrik noktaları belirlenerek hangi gruba dahil oldukları tahmin edilebilmektedir (13). Ancak benzer izoelektrik pH'ya sahip beta-laktamazların bulunması nedeniyle enzim tiplerinin sadece izoelektrik noktalara dayanarak belirlenmesi mümkün değildir. Günümüzde özgül enzim tipini belirlemek için moleküler yöntemlerin kullanılması gereklidir (14,15). Enzim genlerindeki nükleotid değişikliklerini tam olarak saptayabilen DNA dizi analizi yöntemi ise halen altın standart olma özelliğini korumakla birlikte, maliyeti yüksek ve emek gerektiren bir yöntemdir.

GSBL enzimleri *Enterobacteriaceae* ailesi içinde en yüksek oranda *K. pneumoniae* suşlarında olmakla birlikte özellikle *E. coli*, *Enterobacter sp.*,



*Salmonella sp.*, *Serratia sp.*, *Citrobacter sp.*, *M. morgani* suşlarında da görülmektedir (38).

Çalışmamızda idrar örneklerinden izole edilen, fenotipik tarama-doğrulama testleri ile GSBL pozitif olduğu saptanan 56 *E. coli* suşunda beta-laktamaz varlığı ve tiplerini araştırmak amacıyla izoelektrik odaklama ve PCR yöntemi çalışılmıştır.

GSBL prevalansının ülkeden ülkeye, şehirden şehire, hastaneden hastaneye değiştiği hatta aynı hastanedeki servisler arasında farklılıklar gösterdiği bildirilmektedir (88,89). Bouchillon ve ark. (90) 2001 yılında yaptıkları, 17 ülkeden 38 farklı merkezin katıldığı çalışmada GSBL oranı *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında sırasıyla %1.2 ile %5.4; ülkelere göre GSBL sıklığı ise Yunanistan'da %27.4, Portekiz'de %15.5, Almanya'da %2.0-2.6 olarak saptanmıştır. Winokur ve ark. (88) *K. pneumoniae*'de GSBL oranını Latin Amerika'da %45, Batı Pasifik Bölgesi'nde %25, Avrupa'da %23, Amerika Birleşik Devletleri'nde %8 ve Kanada'da %5 olarak bildirmişlerdir. Goosens ve ark. (91)'nin Avrupa'da 10 ülkeden 31 merkezin katıldığı çalışmasında GSBL oranı Almanya'da %1.5 Rusya'da %39-47, Polonya ve ülkemizde %20 olarak saptanmıştır. Tonkic ve ark. (92) yaptıkları çalışmada GSBL oranını *E. coli*'de %4.7, *K. pneumoniae*'de ise %36.8 olarak bulmuşlardır. Jain ve ark. (93) Hindistan'da 2995 kan kültüründen izole ettikleri 100 *Klebsiella sp.* suşu ile yaptıkları çalışmada, GSBL oranını %58 olarak bildirmişlerdir. "National Nosocomial Infections Surveillance" (NNIS) verilerine göre; 2003 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde *K. pneumoniae*'de GSBL oranı %20.6, *E. coli*'de ise %5.8'dir (94). Blackmore'un (95) 2006 yılında Yeni Zelanda'da yaptığı çalışmada ESBL oranı *E. coli*'de %0.7 (58/8707), *Klebsiella sp.*'de ise %4.2 (31/746) olarak bildirilmiştir. Ho ve ark. (96) *E.coli* suşlarının % 11'inde, *Klebsiella sp.* suşlarının ise % 13'ünde GSBL saptamışlardır. De Champs ve ark. (97) *Enterobacter sp.* suşlarında % 30, *Proteus sp.* suşlarında % 20 oranında GSBL pozitifliği saptamışlardır. Du ve arkadaşlarının (98) çalışmasında nozokomiyal bakteriyemili hastalardan izole edilen *Klebsiella sp.* suşlarının %28'inde, *E. coli* suşlarının %26.6'sında GSBL varlığı bildirilmiştir. Shehabi ve

arkadaşları (99)'nin çalışmasında çeşitli kültürlerden izole edilen *Klebsiella sp.* suşlarında GSBL üretimi %70, *E. coli* suşlarında ise %30 oranında bulunmuştur.

Ülkemizde hastane kökenli suşlarda yapılmış çok merkezli bir çalışmada, merkezlere göre değişmekle birlikte *E. coli* suşlarının % 0-27 oranında GSBL ürettiği gösterilmiştir (100). Koçoğlu ve ark. (101) toplum kaynaklı üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen 267 *E. coli* suşunda geniş spektrumlu beta-laktamaz oranını %3.4 olarak saptamışlardır. Karavelioğlu ve ark. (102) tarafından 2003 yılında yapılan bir çalışmada GSBL oranı hastane kökenli *E. coli* izolatlarında %26, *K. pneumoniae*'de %38.9 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada GSBL pozitifliği toplum kökenli *E. coli* izolatlarında %2 ve *K. pneumoniae* izolatlarında %4.6 olarak saptanmıştır. Eroğlu ve ark. (103) GSBL oranını toplum kökenli *E. coli* suşlarında % 9.3, hastane kökenlilerde ise % 21.3 olarak bulmuşlardır. Gürdoğan ve ark. (104) toplum kökenli *E. coli* suşlarında GSBL oranını % 7.8, hastane kökenlilerde ise % 9 olarak bildirmişlerdir. Tünger ve ark. (105) çalışmasında yoğun bakım hastalarından izole edilen *Klebsiella sp.* suşlarında GSBL aktivitesi %49.3 olarak bulunurken, bu oran *E. coli* suşları arasında %21.5 olarak saptanmıştır. Küçükateş (106)'in çalışmasında ise GSBL oranı *E. coli* suşlarında %27.7, *K. pneumoniae* suşlarında %57.5 olarak bulunmuştur. Aydemir ve ark. (107) tarafından yapılan çalışmada *Klebsiella sp.* suşlarında GSBL oranı %18.4, *E. coli* suşlarında ise %26.2 oranında bulunmuştur. İpek ve ark. (108) GSBL oranını *E. coli* suşlarında %20; Yetkin ve ark. (109) ise bu oranı %34.5 olarak saptamışlardır.

Yaptığımız çalışmada Nisan 2004-Mart 2005 tarihleri arasında idrar kültürlerinden izole edilen *E. coli* suşlarında GSBL sıklığı %18 (217/1198) olarak saptanmıştır. Tüm bu çalışmaların sonuçlarından da anlaşılacağı gibi GSBL üretim oranları, mikroorganizmaların izole edildiği hastanelere, servislere, seçilen hasta popülasyonuna, seçilen etken popülasyonuna göre değişmektedir.

İzoelektrik odaklama yöntemi, bakterilerde var olan enzim tiplerinin pI değerlerine göre gruplandırılması ile özgül enzim tipini belirlemek için yapılacak olan moleküler yöntemlere yol gösterici olmaktadır. Ülkemizde enzim tiplerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sayısı azdır. Gülay ve ark. (110) hastane

infeksiyonu etkenlerinden *K. pneumoniae* kökenlerinde en sık (%84.1) olarak pI değeri 7.6 olan bant varlığını saptamışlar ve bunu sırası ile izoelektrik noktaları 8.4 (%34.1), 8.2 (%29.5), 5.4 (%29.5), 7.8 (%20.5), 8.6-8.8 (%9.1), 7.2 (6.8), 8.8-9.2 (%4.5), 6.8 (%2.3), 7.0 (%2.3) olan bantların izlediğini göstermişlerdir. Taşlı ve ark. (111) ise yaptıkları çalışmada en sık olarak (%52,7) pI değeri 5.4 bandın gözlendiğini ve bunu sırası ile pI'ları 7.6 (%28.4), 8.2-8.5 (%27), 8.0-8.1 (%23), 8.6-8.8 (%21.6), 7.1-7.4 (%10.8), 5.8-6.1 (%10.8), 6.8-7.0 (%8.1) olan bantların izlediğini bulmuşlardır. Aynı çalışmada *E.coli* suşlarında pI değeri 5.4 olan enzimlerin, *K. pneumoniae* suşlarında ise pI değeri 7.0 ve üzerindeki enzimlerin daha yaygın bulunduğu saptanmıştır. Eroğlu ve ark. (112) çalışmalarında *Klebsiella sp.* türlerinde en sık, pI değeri 7.6 (17/56), 7.2 (15/56) ve 8.4 (12/56) olan enzimleri saptamışlardır. Akata ve ark. (113) 21'i *K. pneumoniae* olan 23 *Klebsiella sp.* kökenin çoğunda pI değeri 7.6 olan enzim belirlemiştir.

Yaptığımız çalışmada IEF bulgularına göre *E. coli* suşlarının 1-3 ayrı bant içerdiği saptanmıştır. Beta-laktamazların izoelektrik noktaları değerlendirildiğinde, en sık pI 8.0-8.4 (%78.5) olan bandın gözlendiği bunu sırası ile pI'ları 5.0-5.4 (%50) ve pI 7.4-7.6 (%7.1) olan bantların izlediği gözlenmiştir. Çalışmamızda 11 suşta (%19.6) herhangi bir bant oluşumu gözlenmemiştir.

IEF yöntemi benzer izoelektrik pH'ya sahip farklı beta-laktamaz enzim ailelerinin ayırımında yetersiz kalabileceğinden beta-laktamaz genine spesifik oligo-nükleotid primerlerle yapılan PCR günümüzde sık kullanılan uygulanması kolay bir moleküler yöntemdir. TEM ve SHV tip enzimler 1990'lı yıllarda en sık gözlenen GSBL enzimleri olup özellikle *K. pneumoniae*'de sık görülmekteydi (63). Günümüzde yapılan çalışmalarda ise CTX-M enzimlerinin baskın hale geldiği ve özellikle *E. coli* türlerinde bu enzimlerin sık görüldüğü bildirilmiştir (57,63,114). Pallecchi ve ark. (115) 2005 yılında 50 *E. coli* suşu ile yaptıkları çalışmada, suşların 44'ünde PCR yöntemi ile CTX-M enzim pozitifliği saptamışlardır. Brigante ve ark. (116) İtalya'da 5 yıl süresince topladıkları izolatlar ile yaptıkları çalışmalarında 200 GSBL pozitif izolatın 53'ünde CTX-M enzimi saptamışlar ve bu sıklığı oksiminosefalosporin kullanımının yaygınlığına

bağlamışlardır. Mugnaioli ve ark. (117) PCR yöntemi ile GSBL pozitif saptanan *Enterobacteriaceae* suşlarındaki CTX-M enzim pozitifliğini %19.7, *E. coli* suşlarında ise %54.8 olarak bildirmişlerdir. Bano ve ark. (118) PCR yöntemi ile toplum kökenli *E. coli* suşlarında yaptıkları çalışmada CTX-M-9, SHV, TEM oranlarını sırası ile %64, %18 ve %18 olarak bulmuşlardır.

Ülkemizde GSBL enzim tiplerini araştıran çalışmalarda da CTX-M enzimlerinin sıklığının giderek arttığı görülmektedir. Gür ve ark. (119) tarafından 2005 yılında yapılan Hitit çalışmasında CTX-M enzim sıklığı, 9 Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde %79, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde %60, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi'nde %57, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde %70, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde %75 ve İbni Sina Hastanesi'nde ise %72 olarak bildirilmiştir. Gülay ve ark. (120)'nın 2002-2003 yıllarında yedi farklı merkezden topladıkları GSBL üreten izolatlar ile yaptıkları çalışmada CTX-M sıklığı *E. coli* izolatlarında %76, *K. pneumoniae*'de %83, *Enterobacter sp.* izolatlarında ise %50 olarak bulunmuştur. Aktaş ve ark. (121) çalışmalarında *E. coli* izolatlarının tamamında, *K. pneumoniae* izolatlarının ise %47'sinde CTX-M enzim varlığını belirlemişlerdir.

Çalışmamızda PCR sonuçlarına göre çalışmaya alınan *E. coli* suşlarının 52'sinde (%92.8) CTX-M; 36'sında (%64.2) TEM; 6'sında (%10.7) SHV enzimi pozitif olarak saptanmıştır. İzolatların 29'unda (%51.7) CTX-M ve TEM; 3'ünde (%5.3) CTX-M ve SHV; 3'ünde (%5.3) CTX-M, TEM ve SHV genleri bir arada saptanmıştır. Çalışmamızda da CTX-M enzim sıklığının %92.8 gibi yüksek oranda çıkması son yıllarda tüm dünyada artan CTX-M sıklığı ile uyumludur.

İlk olarak Fransa'da bir Türk hastadan izole edilen *P. aeruginosa* suşunda saptanan PER-1 enzimi penisilin ve sefasporinleri hidrolize eder ve klavulanik asit ile inhibe olur (62). PER-1 enzimi *P. aeruginosa* dışında *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), *A. faecalis* ve *P. mirabilis* suşlarında da saptanmıştır (63,64,65). Lartigue ve ark. (122) 2005 yılında ilk kez bir *P. stuartii* izolatında PER-1 enzimi saptandığını bildirmişlerdir. Ülkemizde, Bahar ve ark. (123)

tarafından yapılan bir çalışmada üriner *P. rettgeri* izolatında PCR yöntemi ile PER-1 enzimi saptanmıştır. Yaptığımız çalışmada izolatların hiçbirinde PCR ve IEF yönteminde PER-1 enzim varlığı saptanmamıştır.

PCR sonuçları ile IEF yönteminin uyumuna baktığımızda 56 *E. coli* suşunun 52'sinde PCR yöntemi ile CTX-M enzimi saptanmıştır. Bu suşların 44'ünde izoelektrik odaklama yöntemi ile CTX-M uyumlu bantlar elde edilmiş, 8 suшта ise bant gösterilememiştir. PCR yöntemi ile TEM enzimi saptanan 36 suşun 28'inde izoelektrik odaklama yöntemi ile TEM enzimi ile uyumlu bantlar elde edilmiş, 8 suшта ise bant gösterilememiştir. PCR yöntemi ile SHV enzimi saptanan 6 izolatın 3'ünde izoelektrik odaklama yöntemi ile SHV uyumlu bantlar elde edilmiş, 3 izolatta ise bant gösterilememiştir. IEF yöntemiyle hiçbir bandın gözlenmediği fakat PCR yöntemi ile enzim pozitifliği gözlenen toplam 11 izolatta (%19,6) IEF yönteminde bant gözlenmemesinin enzimin zayıf ekspresyonuna bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Gram negatif bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde çoğunlukla geniş spektrumlu beta-laktam ajanlar tek başına veya aminoglikozidler ve florokinolonlar ile kombine edilerek kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılmalarına ve GSBL enzimlerini kodlayan plazmidlerin aynı zamanda beta-laktam antibiyotikler dışında pek çok antibiyotiğe ait direnç genlerini de taşımalarından dolayı GSBL üreten bakterilerde başta aminoglikozidler olmak üzere kinolon, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim-sulfametoksazol direnci de eş zamanlı olarak bulunabilmektedir (124,125).

Yapılan çalışmalarda da GSBL üreten bakterilerde üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinler ile florokinolonlara direncin önemli boyutlara ulaştığı görülmektedir (119). Kızırgil ve ark (126) çalışmalarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarını; meropenem %100, amikasin %89, siprofloksasin %64, piperasilin-tazobaktam %50, trimetoprim-sulfametoksazol %36 ve amoksisilin-klavulanik asit %19 olarak saptamışlardır. Aynı araştırmacılar ayrıca siprofloksasine dirençli suşlarda çoklu direnç

gözlemler; siprofloksasine dirençli suşların %29'unun (6/21) en az bir aminoglikozid antibiyotiğe, %76'sının (16/21) piperasilin-tazobaktama ve tümünün amoksisilin-klavulanat ve ko-trimoksazole dirençli olduğunu saptamışlardır. Gültekin ve ark. (127) çalışmalarında hastane infeksiyonu etkeni GSBL pozitif *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarına en etkili antibiyotiğin imipenem olduğunu bildirmişler ve bir GSBL pozitif *K. pneumoniae* ve bir *E. coli* suşunda imipenem direnci saptamışlardır. Gürdoğan ve arkadaşlarının (104) yaptıkları çalışmada GSBL pozitif *E. coli* suşlarının tümünün imipeneme duyarlı olduğu, bunu sırası ile meropenem, amikasin ve sefepimin izlediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada hastane dışı GSBL pozitif ve negatif *E.coli* suşlarının ofloksasine duyarlılık oranları yüksek bulunmuş ancak hastane kökenli GSBL pozitif *E.coli* suşlarında %56.5 gibi düşük duyarlılık saptanmıştır.

Yaptığımız çalışmada GSBL pozitif *E. coli* suşlarında siprofloksasin, TMP-SXT, gentamisin, piperasilin/tazobaktam ve sefoksitin duyarlılığı sırası ile %19, %33, %48, %48, %82 olarak bulunmuştur. GSBL pozitif *E. coli* suşlarında en duyarlı antimikrobiyaller amikasin (%100) ve meropenem (%100) olarak saptanmıştır. Florokinolonlar GSBL üreten Gram negatif bakteriler ile gelişen infeksiyonların tedavisinde karbapenemlerin ardından kullanılabilen en ideal ikinci seçenek antibiyotik olarak değerlendirilmektedir (128). Ancak çalışmamızda başta siprofloksasin, TMP-SXT ve gentamisin olmak üzere çeşitli antibiyotiklerin direnç oranlarının yüksek olmasını, bu antibiyotiklerin GSBL üreten bakterilerle oluşan infeksiyonların tedavisinde sık kullanılmasına ve bu antibiyotiklere karşı gelişen direncin özellikle CTX-M enzimi başta olmak üzere GSBL enzimlerini taşıyan genlerle plazmidik olarak taşınmasına bağlayabiliriz.

GSBL oluşturan Gram negatif bakterilerin sefamisinlere duyarlı olması beklenir. Çalışmamızda 10 *E. coli* izolatında saptanan sefoksitin direncinin; beta-laktamaz enziminin aşırı üretimi, membran permeabilitesinin azalması, Amp C beta-laktamaz enzimi gibi ek bir direnç mekanizmasının varlığına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Beta-laktam beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları genellikle tek tip GSBL salgılayan suşlara karşı etkilidir. Ancak birçok çalışmada belirtildiği gibi

bugün mikroorganizmaların çoğu birden fazla GSBL salgılamaktadır (63). Bu da beta-laktam beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarının etkinliğini azaltabilmektedir. Babini ve ark. (69)'nın Avrupa'da 35 yoğun bakım ünitesinde izole edilen suşlarla yaptıkları çalışmada; GSBL üreten izolatların piperasilin tazobaktam duyarlılığı %31 iken 1997-1998 yıllarında bu oranın %63'e çıktığı saptanmıştır. Bishara ve ark. (129) GSBL üreten *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarındaki amoksisilin klavulanat direncini sırası ile %95 ve %77; piperasilin tazobaktam direncini ise sırası ile %82 ve %35 olarak bulmuşlardır. Yaptığımız çalışmada amoksisilin klavulanik aside izolatların %57'si dirençli, %43'ü az duyarlı; piperasilin tazobaktama izolatların %28'i dirençli, %23'ü az duyarlı olarak saptanmıştır. İzolatlarımızda görülen beta-laktam beta-laktamaz inhibitör direnci suşların birden fazla GSBL enzimi üretmesine bağlı olabileceği gibi; inhibitör dirençli GSBL enzimlerinin varlığı, Amp C beta laktamaz enzimi üretimi gibi ek direnç mekanizmaları sonucu ortaya çıkmış olabilir.

Çalışmamızda elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde GSBL enzimi pozitif suşların sıklığı ve çoklu ilaç direnç oranlarının yüksekliği dikkat çekicidir. Beta laktamaz enzim tiplerinin doğru olarak belirlenmesi amacıyla uyguladığımız izoelektrik odaklama yöntemi ile saptanan enzim bantları PCR yöntemi ile yüksek oranda uyumlu bulunmuştur. Sonuç olarak; IEF yöntemi bakterilerde var olan beta-laktamaz enzim tiplerinin izoelektrik odak noktalarına göre gruplandırılmasını sağlayarak özgül enzim tipini belirlemek için yapılacak olan PCR yöntemine yol gösterici olmaktadır. GSBL enzim tiplerinin belirlenmesinin, GSBL üreten suşların yayılımını önlemek için gerekli kontrol önlemlerinin alınmasına ve uygun antibiyotik kullanım politikalarının geliştirilmesine yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇLAR

GSBL enzimleri tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygın olarak bulunmakta ve GSBL üreten Gram negatif bakteri infeksiyonları önemli sorunlara yol açmaktadır. Bu infeksiyonların tedavisinde beta-laktam ajanların yaygın kullanımını GSBL üreten bakteri sıklığının artışına ve yeni enzimlerin ortaya çıkışına neden olmuştur. GSBL sıklığı ve enzim tipleri tüm dünyada farklılıklar gösterse de GSBL varlığını ve enzim tipini belirlemek epidemiyolojik açıdan önemlidir. Bu amaçla geliştirilen izoelektrik odaklama yöntemi, beta-laktamazların bir çoğunda izoelektrik noktaların benzer olması nedeniyle beta-laktamazların tiplendirilmesinde yetersiz kalmakta ancak olası enzimlerin gruplandırılmasını sağlayarak PCR gibi enzim sınıfını belirleyebilen moleküler testlere öncü çalışma niteliği taşımaktadır.

Türkiye'nin Avrupa ülkeleri içinde GSBL sıklığı en yüksek olan ülkeler arasında yer alması, hastanelerde GSBL üreten bakterilerin sıklığının izlenmesini zorunlu kılmaktadır. GSBL'lerin hızlı artışı ve salgınlar, sağaltım başarısızlığı, artan mortalite gibi ciddi sorunlara neden olmaları, doğru saptanmalarını ve tiplendirilmelerini gerektirmektedir.

Her geçen gün sayıları artan beta-laktam direncine karşı savaşta her hastanenin kendi infeksiyon ve antibiyotik kontrol programlarının güncellemesi ve etkin uygulaması, hastane bakteriyel florası ve bunların direnç profillerine bağlı olarak en uygun GSBL izleme ve doğrulama yöntemlerinin uygulaması gereklidir.



## 7. ÖZET

### **İdrar örneklerinden izole edilen genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) pozitif *Escherichia coli* suşlarındaki GSBL enzim tiplerinin İzoelektrik odaklama ve PCR yöntemleri ile araştırılması**

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimlerinin klinik izolatlarda yaygın olmaları, plazmid aracılığı ile yayılmaları, sağaltım başarısızlığı, mortalite artması gibi ciddi klinik problemlere neden olmaları ve rutin duyarlılık testleri ile tanımlanmalarının güç olması nedeni ile doğru saptanmaları gerekmektedir.

Çalışmamızda Nisan 2004-Mart 2005 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Birimi'nde idrar örneklerinden izole edilen ve fenotipik tarama-doğrulama testleri ile GSBL pozitif olduğu saptanan 56 *E. coli* suşunda, GSBL enzim tipleri izoelektrik odaklama ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile araştırılmıştır.

İzoelektrik odaklama yöntemine göre, izolatların 1-3 ayrı bant içerdiği; bunların arasında pI değeri 8.0-8.4 (%78.5) ve 5.0-5.4 (%50) olan bandın en sık olduğu görülmüştür. Onbir suшта (%19.6) herhangi bir bant oluşumu gözlenmemiştir. PCR yöntemi ile suşların 52'sinde (%92.8) CTX-M; 36'sında (%64.2) TEM; 6'sında (%10.7) SHV, 29'unda (%51.7) CTX-M ve TEM enzimleri birlikte saptanmıştır. IEF yönteminde, CTX-M, TEM ve SHV enzimleri ile uyumlu bant oluşumu gözlenen 43 suşun tümünde ve bant oluşumu görülmeyen 11 suшта PCR yöntemi ile bu enzim genlerinin bir veya birden fazlası pozitif olarak bulunmuştur.

GSBL enzimlerini kodlayan plazmidlerin aynı zamanda beta-laktam antibiyotikler dışında pek çok antibiyotiğe ait direnç genlerini de taşımalarından dolayı GSBL üreten bakterilerde enzim tiplerinin doğru olarak saptanması, tedavide uygun antimikrobiyal seçimine yön vermesi açısından önemlidir.

**Anahtar kelimeler:** Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL), CTX-M, TEM, SHV beta-laktamaz

## 8. ABSTRACT

### **Determination of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) enzyme types in ESBL positive *E. coli* strains which were isolated from urine samples, by using Isoelectric focusing method and Polymerase chain reaction**

Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) enzymes are increasing through the world, commonly found in clinical isolates, easily spread out by plasmids, cause serious clinical problems and difficult to determine by routine antimicrobial susceptibility tests; these enzymes must be detected by the special tests.

The aim of this study is to determine ESBL enzyme types during the period of April 2004-March 2005 at Akdeniz University Hospital Central Laboratory by using isoelectric focusing method and polymerase chain reaction (PCR) in 56 *E. coli* strains which were isolated from urine samples and determined as ESBL positive with the phenotypic screening tests.

By the isoelectric focusing results, the transconjugant enzyme extracts produced 1 to 3 different bands, mostly at the isoelectric points of 8.0-8.4 (78.5%) and 5.0-5.4 (50%). Using PCR, it is found that of the isolates 92.8% included CTX-M, 64.2% included TEM, 10.7% included SHV and 51.7% both of the CTX-M and TEM genes. By using IEF method, 43 isolates having CTX-M, TEM and SHV enzyme bands and 11 isolates having no enzyme bands, include one or more enzyme genes with PCR methods.

Genes encoding ESBL's are usually located on transferable plasmids that may also carry other resistance determinants. Therefore; detection of beta-lactamase enzyme types in ESBL positive bacteria, is important for choosing the appropriate antimicrobial agents.

**Key words:** Extended spectrum beta-lactamases, CTX-M, SHV, TEM beta-lactamase

## KAYNAKLAR

1. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:557-84.
2. Roy C, Foz A, Segura C, Tirado M, Fuster C, Reig R. Plasmid-determined identified in a group of 204 ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 1983;12: 507-510.
3. Jacoby GA, Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:164-169.
4. Sirot D. Extended-spectrum plasmid mediated beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36 (Suppl A): 19-34.
5. Jacoby GA. Genetics of extended-spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13 (1):2-11.
6. [www.lahey.org/studies/webt.htm](http://www.lahey.org/studies/webt.htm)
7. Bush K. Is it important to identify extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:361-364.
8. Mac Kenzie FM, Gould IM. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *J Infect* 1998; 36:255-58.
9. Jacoby GA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino- $\beta$ -lactams. *Antimicrob Resistance* 1997; 11:875-887.
10. Heritage J, M'Zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM. Evolution and spread of SHV extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44:309-318.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7–A5 and informational supplement M100–S10. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne Pa. 2000.
12. Paterson DL, Yu VL. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a call for improved detection and control. *Clin Infect Dis* 1999; 29:1419-1422.
13. Matthew M, Harris AM, Marshall MM, Ross GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. *J Gen*

Microbiol 1975; 88: 169-78.

14. Mabilat C, Goussard S. PCR detection and identification of genes for extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. In: DH, Smith TF, Tenover TC, and White TJ (eds). Diagnostic molecular microbiology. American Society for Microbiology, Washington: D.C. 1993: 553-559.

15. M'Zali FH, Heritage J, Gascoyne-Binzi DM, Snelling AM, Hawkey PM. PCR single strand conformational polymorphism can be used to detect the gene encoding SHV-7 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and to identify different SHV genes within the same strain. J Antimicrob Chemother 1998; 41:123-125.

16. Bradford PA. Automated thermal cycling is superior to traditional methods for nucleotide sequencing of *bla*SHV genes. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:2960-2963.

17. Goussard, S. and P. Courvalin. Updated sequence information for TEM  $\beta$ -lactamase genes. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:367-370.

18. Philippon A, Arlet G, Lagrange PH. Origin and impact of plasmid mediated extended-spectrum beta-lactamases. Eur J clin Microbiol Infect dis 1994; 13(Suppl 1):17-29.

19. Eskitürk A, Korten V, Söyletir G. Akut bakım gerektiren hastalarda gelişen infeksiyonlardan izole edilen *Klebsiella* türlerinde geniş spektrumlu beta-laktamaz (ESBL) direnci sıklığının araştırılması. Aknem Derg 1996;10:14-8.

20. Gür D, Pitt TL, Hall LMC, Akalın HE, Livermore DM. Diversity of *Klebsiella* with extended spectrum beta-lactamases at a Turkish university hospital. J Hosp Infect. 1992; 22:163-178.

21. Gür D.  $\beta$ -laktamazlar. Hacettepe Tıp Dergisi 2002; 33:102-109.

22. Çolak D. Antimikrobiyal ilaçlar ve etki mekanizmaları. In: Mutlu G, Imir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (eds). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi. 1999. 81-89.

23. Lee NLS. Yuen KY, Kumana CR.  $\beta$ -lactam antibiotic and  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations. JAMA 2001;285:386-388).

24. Gür D. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel

tıp kitabevleri, 2000.182-93.

25. Chambers HF. Penicillins. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth edition. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. 261-274.

26. 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. Sixth edition, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone Inc, 2005. 253-70.

27. Gülay Z. Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta-laktamlar ve karbapenemlere direnç. Hastane Enfeksiyonları Dergisi 2001; 5:210-229.

28. Shlaes DM, Gerding DN, John JF et al. Society for healthcare epidemiology of America and infectious diseases society of America joint committee on the prevention of antimicrobial resistance: Guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. Clin Infect Dis 1999; 25:584-599 .

29. Clopra I. The search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics. Antimicrob Agents Chemother March 1997; 41(3):497-503.

30. Martinez LM, Alles SH, Alberti S, Thomas JM, Benedi VJ, Jacoby GA. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and extended-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40(2):342-348.

31. 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.

32. Sanders CC. Beta-lactamases of Gram-negative bacteria: New challenges for new drugs. Clin Infect Dis 1992; 14:1089-1099.

33. Gülay Z. Antimikrobiyal ilaçlara direnç. In: Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (eds). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi. 1999. 91-108.

34. Chambers HF. Penicillin-binding protein mediated resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *staphylococci*. J Infect Dis 1999; 179(Suppl 2):353-259.
35. Bush K. New  $\beta$ -lactamases in Gram negative bacteria, diversity and impact on selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis 2001; 32:1085-1089.
36. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21 st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14:933-51.
37. Gür D. Beta-laktamazlar. Flora Derg 1997; 2(Ek 3):3-18.
38. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:1697–1704.
39. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:1211-1233 .
40. Özsoy MF, Öncül O, Yıldırım A, Pahsa A. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar: klinik önemi ve getirdiği sorunlar. Flora Derg 2001; 6(Ek 1):3-23.
41. Bush K, Jacoby G. Nomenclature of TEM beta-lactamase. J Antimicrob Chemother 1997; 39:1-3.
42. Sanders CC, Sanders WE. Beta-lactam resistance in gram-negative bacteria: Global trends and clinical impact. Clin Infect Dis 1992; 15:824-39.
43. Drusano GL. Infection in intensive care unit:  $\beta$ -lactamase mediated resistance among *Enterobacteriaceae* and optimal antimicrobial dosing. Clin Infect Dis 1998; 27 (Suppl. 1):111-116.
44. Gür D. Hastane infeksiyonlarında önem kazanan gram-negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. Hastane İnfek Derg 1997; 1: 38-45.
45. Yüce A. Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. Klimik Dergisi 2001; 14 (2):42-46.
46. Gür D. ESBL'ların genel özellikleri ve ESBL tipleri. Yeni ve yeniden gündeme gelen infeksiyonlar. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2004: 5-13.
47. Gür D. ESBL ve plazmid kaynaklı AmpC  $\beta$ -laktamazlar. XII.Türk Klinik

Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı, Antalya 2005; 147-151.

48. Knothe H, Shah P, Kremery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; 11:315-317.

49. Gür D. Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar. In: Ulusoy S.(ed) Beta laktamazlar ve klinik önemi. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2005. 70-84.

50. Winokur PL, Brueggemann, DeSalvo DL, et al. Animal and human multidrug resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:2777-2783.

51. Nordmann P, Guibert M. Extended spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42:128-131.

52. Stürenburg E, Mack D. Extended spektrum beta lactamases: İmplications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *J Infect* 2003; 47: 279-95.

53. Chanal C, Sirot D, Romaszko JP, Bret L, Sirot J. Survey of prevalance of extended spectrum  $\beta$ -lactamases among *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38:127-132.

54. De Champs C, Sirot D, Chanal C, Bonnet R, Sirot J. A 1998 survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:3177-79.

55. Marchandin H, Jean-Pierre H, De Champs C, et al. Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:213-216.

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

57. Livermore D. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59(2):165-74.

58. Nordman P, Guibert M. Extended spektrum beta lactamases in

- Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 1998; 42 :128-31.
59. Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages JM. Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents Chemother 2001; 45: 2615-20.
60. Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 1994; 38:104-114.
61. Bauernfeind A, Stemplinger I. Characterization of beta-lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 1996; 40:616-620.
62. Nordman P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:962–969.
63. Paterson DL, Bonomo RA. Extended spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005; 18:657-686.
64. Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, et al. Widespread detection of PER-1 type extended spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicentre study. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:2265-2269.
65. Vahaboglu H, Hall LMC, Mulazimoglu L, Dodanli S, Yildirim I, Livermore DM. Resistance to extended spectrum cephalosporins, caused by PER-1 beta-lactamase in *Salmonella typhimurium* from İstanbul, Turkey. J Med Microbiol 1995; 43:294-299.
66. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi B, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *E. coli* integron gene. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:573-581.
67. Brun-Buisson C, Legrand P. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. Lancet 1987; 8(2):302-306.



68. Gulay Z, Thomson CJ, Yulug N, Amyes SG. High prevalence of extended spectrum beta-lactamase production among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at a University Hospital in Turkey. *J Chemother* 2000;12:145-152.
69. Babini G, Livermore DM. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella spp.* collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000; 45:183-189.
70. Heritage J, M'Zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM. Evolution and spread of SHV extended-spectrum  $\beta$ -actamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44:309-318.
71. Yan JJ, Ko WC, Wu JJ. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo- $\beta$ -lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2368-2371.
72. Nordmann P. Trends in  $\beta$ -lactam resistance among *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis* 1998; 27:100–106.
73. Barroso H, Freitas-Vieira A, Lito LM. Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases at a Portuguese hospital: TEM-10 as the endemic enzyme. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:611–616.
74. Gülay Z. ESBL'lerin tanı yöntemleri. In: Ünal S, Vahaboğlu H, Leblebicioğlu H, Öztürk R, Köksal İ (eds). *Yeni ve yeniden gündeme gelen infeksiyonlar genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004. 13-26.
75. Villa L, Pezzella C, Tosini F, Visca P, Petrucca A, Carattoli A. Multiple antibiotic resistance mediated by structurally related IncL/M plasmids carrying an extended spectrum beta-lactamase gene and class 1 integron. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:2911-2914.
76. Bradford PA, Cherubin CE, Idemyor V, Rasmussen BA, Bush K. Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* from two Chicago hospitals: identification of the extended spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime-hydrolyzing beta-lactamases in a single isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:761-766.

77. Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, Patel JB, Edelstein PH. Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended spectrum beta lactamases producing *E. coli* and *K. pneumoniae*. Clin Inf Dis 2001; 33: 1288-94.
78. Balkan İİ, Gençer S, Batirel A, Özer S. Florokinolonlara karşı direnç gelişimine katkıda bulunan çeşitli risk faktörlerinin analizi. Flora Derg 2005; 10(2): 65-73.
79. Sirot D, Sirot J, Labia R, et al. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta lactamase. J Antimicrob Chemother 1987; 20 :323-34.
80. Quinn JP, Miyashiro D, Sahm D, Flamm R, Bush K. Novel plazmid-mediated betalactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33:1451-6.
81. Jacoby GA, Medeiros AA, O'Brien TF, Pinto ME. Broad-spectrum transmissible beta-lactamases. N Engl J Med 1989; 33:1451-6.
82. Bermudes H, Arpin C, Jude F, El-Harrif Z, Bebear C, Quentin C. Molecular epidemiology of an outbreak due to extended spectrum beta-lactamase producing enterobacteria in a French hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997; 16:523.2.
83. Wu TL, Siu LK, Su LH, et al. Outer membrane protein change combined with co-existing TEM-1 and SHV-1 -lactamases lead to false identification of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Chemother 2001; 47:755-761.
84. Katsanis GP, Spargo J, Ferraro MJ, Sutton L, Jacoby GA: Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended spectrum beta lactamases. J Clin Microbiol 1994; 32(3):691-696.
85. Vercauteren E, Descheemaeker P, Leven M, Sander CC, Goossens H: Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum beta lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in a Belgian training hospital. J Clin Microbiol 1997; 35(9):

2191-2197.

86. Nüesch-Inderbilen MT, Hachler H, Kayser FH: Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method and comparison with the Etest. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15(5):398-402.

87. Chanawong A, M'Zali HM, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM: Characterisation of extended spectrum beta-lactamases of the SHV family using a combination of PCR single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *FEMS Microbiol Lett* 2000; 184(1):85-89.

88. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe the Americans, and the Western Pasific Region. *Clin Infect Dis* 2001; 32 (Suppl. 2): 94-103.

89. Pai H, Lyu S, Lee JH, et al. 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; 37:1758–1763.

90. Bouchillon SK, Johnson BM, Hoban DJ, et al. Determining incidence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Enterobacteriaceae*, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the PEARLS study 2001-2002. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24; 119-24.

91. Goosens H. MYSTIC programme: summary of European data from 1997 to 2000. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 41(4):183-189.

92. Tonkic M., Barisic I. Prevalence and antimicrobial resistance of extended spectrum beta lactamases producing *E. coli* and *K. pneumoniae* strains isolated in a university hospital in Split. *Int Microbiol* 2005; 8:119-124.

93. Jain A, Mondal R. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella spp.* isolated from cases of neonatal septicaemia. *Indian J Med Res* 2007; 125(5):89-94.

94. National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data

summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am J Infect Control 2004; 32: 470-85.

95. Blackmore T. Prevalence of extended spectrum beta lactamases among urinary *Escherichia coli* and *Klebsiella sp.* in New Zealand in 2006. ([www.surv.esr.cri.nz/antimicrobial/esbl.php](http://www.surv.esr.cri.nz/antimicrobial/esbl.php)).

96. Ho PL, Tsang DN, Que TL, Ho M, Yuen KY: Comparison of screening methods for detection of extended spectrum beta-lactamases and their prevalence among *E.coli* and *Klebsiella species* in Hong Kong, APMIS 2000; 108:237-240.

97. De Champs C, Bonnet R, Sirot D, Chanal C, Sirot J. Clinical relevance of *Proteus mirabilis* in hospital patients: A two year survey, J Antimicrob Chemother 2000; 45(4):537-539.

98. Du B, Long Y, Liu H, Chen D, Liu D, Xu Y, Xie X. Extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. Intensive Care Med 2002; 28: 1718-23 .

99. Sheabi AA, Mahafzah A, Baadran I, Qadar FA, Dajani N. High incidence of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to extended-spectrum beta lactam drugs in intensive care units. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 36:53-6.

100. Gür D, Gültekin M, Ögünç D et al: Comparative in vitro activity of piperacillin-tazobactam against Gram-negative nosocomial pathogens, J Antimicrob Chemother 1999; 44:71.

101. Gülay Z. Gram negatif çomaklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası. Ankem Derg 2005; 19(Ek 2):66-77.

102. Koçoğlu E. Toplum kaynaklı üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve bazı antibiyotiklere direnç sıklığının araştırılması. ANKEM Derg 2007; 21(1): 5-9.

103. Eroğlu C, Günaydın M, Birinci A, Esen Ş, Sünbül M, Leblebicioğlu H: İdrardan elde edilen *E.coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamazların

(GSBL) saptanması. XVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Özet Kitabı, Antalya 1998; 12:234

104. Gürdoğan K, Arslan H, Nazlier S: Hastane kökenli ve hastane dışı *E.coli*'lerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz araştırması ve izolatların çeşitli antibiyotiklere duyarlılık durumu, XVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Özet kitabı Antalya 1998;12:234,

105. Tünger A, Hilmioğlu S, Dibek MA, Çavuşoğlu C, Aktaş L, Özkan F, Özinel MA. Hastane infeksiyonu etkeni olarak soyutlanan *Klebsiella pneumoniae* ve *Esheria coli* kökenlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı. İnfeks Derg 1998; 12(2): 165-8.

106. Küçükates E. Antimicrobial resistance among gram negative bacteria isolated from intensive care units in a cardiology institute in Istanbul, Turkey. Jpn J Infect Dis 2005; 58(4): 228-31.

107. Aydemir H, Yalçın A. *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretme ve antibiyotik direnç oranları. Klimik Derg 2006; 19(2):63-68.

108. Mumcuoğlu İ, Gündüz T, Baydur H. *Escherichia sp*, *Klebsiella sp*, ve *Proteus sp* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığı ve çeşitli antibiyotiklere direnç durumu, ANKEM Derg 2004; 18(1): 9-11.

109. Yetkin G. Kan kültürlerinde üreyen *Escherichia coli*'lerin antibiyotik duyarlılıkları, GSBL oranları ve hastane birimlerine göre dağılımı. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg 2006; 13(3):147-150.

110. Taşlı H, Bahar İ. Molecular characterization of TEM and SHV derived extended spectrum beta lactamases in hospital based Enterobacteriaceae in Turkey. J Infect Dis 2005; 58: 162-167.

111. Gülay Z, Amyes SGB, Yuluğ N. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz tanımlanmasında çift disk sinerji testi ve izoelektrik odaklama yöntemi ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması. İnfeks Derg 1999; 13: 381-384.

112. Eroğlu Ö, Beğendik F. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* kökenlerinde enzim tiplerinin izoelektrik odaklama yöntemi ile belirlenmesi. Türk Mikrobiyol Cem

Derg 2007; 37(2):7-84.

113. Akata F, Tatman-Otkun M, Ozkan E. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases produced by nosocomial isolates of Enterobacteriaceae in Trakya University Hospital, Turkey. *New Microbiol* 2003; 26(3):257-262.

114. Romero L, Lopez L, Rodriguez-Bano J, Ramon Herandez J, Martinez-Martinez L, Pascual A: Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11:625-631.

115. Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C. Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended spectrum beta lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(8): 2720-2725.

116. Brigante G, Luzzaro F. Evolution of CTX-M type beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *J Antimicrob Agents*. 2005; 25:157-162.

117. Mugnaioli C, Luzzaro F. CTX-M type extended spectrum beta-lactamases in Italy: Molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(8):2700-2706.

118. Bano RJ, Navarro MD. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42(3): 1089-1094.

119. Gür D. Gram negatif hastane izolatlarında yeni beta laktamlara direnç ve GSBL sıklığı, Hitit Projesi 2005 sonuçları. 7. Febril Nötropeni Sempozyumu 23-26 Şubat 2006, Ankara.

120. Gülay Z, Terek G, Eraç B: High prevalance of CTX-M type extended spectrum beta-lactamases in members of Enterobacteriaceae in Turkey, 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) poster No.752, Prag 2004.

121. Aktaş Z, Gönüllü N, Şalcıoğlu M, Bal Ç: *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*'da genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların isoelectric focusing ve PCR ile araştırılması, 6. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, Poster No.19,

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, İstanbul 2004.

122. Lartigue M, Fortineau N. Spread of novel expanded spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in a university hospital in the Paris area, France. Clin Microbiol Infect 2005; 11:588-591.

123. Bahar G, Eraç B, Mert A, Gülay Z. PER-1 production in a urinary isolate of *Providencia rettgeri*. J Chemother 2004;16(4):343-346.

124. Nathisuawan S, Burgess DS, Lewis JS: Extended spectrum beta-lactamase, epidemiology, detection and treatment, Pharmacotherapy 2001; 21:920-8.

125. Rupp ME, Fey PD. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae*. Considerations for diagnosis, prevention and drug treatment, Drugs 2003; 63:353-65.

126. Kizirgil A, Yakupoğulları Y, Şenol F. Kan kültürü örneklerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten enterik basillerin prevalansı ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması. İnfeksiyon Dergisi 2005; 19(1).111-114.

127. Gültekin M, Ögünç D, Günseren F, Çolak D, Kırbaş İ, Mamıkoğlu L. Hastane infeksiyonu etkeni *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherchia coli* suşlarının genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve antibiyotik duyarlılık özelliklerinin araştırılması. İnfeksiyon Dergisi 1999; 13(4): 515-520.

128. Çetin BD, Gündüz A, Şensoy A, Korkmaz F, Seber E. Hastane infeksiyonu etkeni Gram negatif çomaklarda GSBL üretimi ve antibiyotik duyarlılıkları. İnfek Derg 2002; 16(4):463-70.

129. Bishara J, Livne G, Ashkenazi S. Antibacterial susceptibility of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Isr Med Assoc J.2005; 7(5):298-301.

